ARI EKMEĞİNDEN PROBİYOTİK LAKTİK ASİT BAKTERİLERİN İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE FERMENTE BAL İÇECEĞİ ÜRETİMİNDE KULLANIM POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ

Neslihan ULUBAYRAM

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ARI EKMEĞİNDEN PROBİYOTİK LAKTİK ASİT BAKTERİLERİN İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE FERMENTE BAL İÇECEĞİ ÜRETİMİNDE KULLANIM POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ

Neslihan ULUBAYRAM
0000-0001-5880-4261

Prof. Dr. Sine ÖZMEN TOĞAY
(Danışman)

Doç. Dr. Aycan YİĞİT ÇINAR
(2. Danışman)

DOKTORA TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2026
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

ARI EKMEĞİNDEN PROBİYOTİK LAKTİK ASİT BAKTERİLERİN İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE FERMENTE BAL İÇECEĞİ ÜRETİMİNDE KULLANIM POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ

Neslihan ULUBAYRAM
Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sine ÖZMEN TOĞAY
İkinci Danışman: Doç. Dr. Aycan YİĞİT ÇINAR (Bursa Teknik Üniversitesi)

Bu doktora tez çalışmasında; arı ekmeği örneklerinden laktik asit bakterileri izole edilmiş, probiyotik potansiyele sahip ve ticari ürün üretimine uygun olduğu belirlenen bir izolat ve bu izolatın elde edildiği arı ekmeği kullanılarak fermente bal içeceği üretimi hedeflenmiştir. Ayrıca fermente bal içeceği üretiminde kullanılan bal ve arı ekmeğinin palinolojik tanımlaması yapılmış ve bazı kimyasal özellikleri belirlenmiştir. Toplanan arı ekmeği örneklerinin mikrobiyolojik kalitesi (TMAB, küf/maya ve LAB sayımları) belirlenmiş ve bu örneklerden LAB izole edilmiştir. Elde edilen toplam 101 adet LAB izolatının probiyotik potansiyeli (antimikrobiyal aktivite, antibiyotik direnç, düşük pH ve safra tuzuna karşı direnç, in-vitro sindirim modelindeki davranış) değerlendirilmiştir. Test edilen 16 izolatta antimikrobiyal aktivite tespit edilmiş, bu izolatların seçili antibiyotiklere duyarlı oldukları görülmüştür. Bu izolatlardan dört tanesinin düşük pH ve safra direncine dayanıklı olduğu ve sindirim sisteminde canlılıklarını korudukları tespit edilmiştir. İzolatların hücre-yüzey hidrofobisitesi ile otoagregasyon ve kolesterol asimilasyon kapasitesi probiyotik bakterilerde görülen değerlerle uyumlu bulunmuştur. İzolatların fenotipik olarak patojenite potansiyeli taşımadığı hemoliz testi ile belirlenmiştir. Tür tanımlamasında izolatların *Enterococcus faecalis* türüne ait olduğu tespit edilmiştir. Yapılan ön denemelerde probiyotik potansiyeli bulunan 17YT4 kodlu izolat ile fermente edilen içeceğin duyusal özellikleri diğerlerinden üstün bulunmuş ve çalışmaya bu izolatla devam edilmiştir. İçeceklerin °Brix, toplam/indirgen şeker, antioksidan kapasite ve renk analizleri yapılarak karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Duyusal analizlerinin yanında raf ömrü boyunca pH, asitlik ve LAB sayımı yapılmıştır. Çalışma sonucunda, arı ekmeği alternatif bir probiyotik kaynak ve fonksiyonel bileşen olarak değerlendirilmiş; geliştirilen fermente bal içeceklerinin, fonksiyonel ve duyusal özellikleri bakımından ticari potansiyele sahip ve geliştirilmeye açık ürünler olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Arı ekmeği, probiyotik, laktik asit bakterileri, fermente, bal, içecek
2026, xvii+170 sayfa

ABSTRACT

PhD Thesis

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PROBIOTIC LACTIC ACID BACTERIA FROM BEE BREAD AND DETERMINATION OF THE POTENTIAL USAGE IN FERMENTED HONEY BEVERAGE PRODUCTION

Neslihan ULUBAYRAM
Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Sine ÖZMEN TOĞAY
Second Supervisor: Doç. Dr. Aycan YİĞİT ÇINAR (Bursa Technical University)

In this doctoral thesis, lactic acid bacteria were isolated from bee bread, and a strain exhibiting probiotic and commercial potential was used, along with its source, bee bread, to produce fermented honey-based beverages. The palynological identification and chemical analyses of honey and bee bread used in beverage production were performed. The microbial analyses of bee bread samples included TMAB, mold/yeast, and LAB counts. Among 101 isolated LAB strains, probiotic potential was evaluated through antimicrobial activity, antibiotic resistance, tolerance to low pH and bile salts, and performance in an in-vitro digestion model. Antimicrobial activity was detected in the 16 tested isolates, and these isolates were found to be susceptible to selected antibiotics. Four of these isolates were found to be resistant to low pH and bile, maintaining their viability under simulated gastrointestinal conditions. The isolates' cell surface hydrophobicity, aggregation ability, and cholesterol assimilation capacity were consistent with probiotic criteria. Hemolysis testing showed no phenotypic pathogenic potential in the isolates. The isolates were identified as Enterococcus faecalis. Preliminary sensory evaluation showed 17YT4 as the optimal strain for fermented beverage production. The beverages were characterized for °Brix, total/reducing sugars, antioxidant activity, and color. The overall acceptability of the beverages was evaluated. Throughout the shelf-life, pH, titratable acidity, and LAB counts were monitored. As a result, bee bread was assessed as an alternative probiotic source and functional ingredient; the developed fermented honey beverages were found to have commercial potential and be open to further development regarding their functional and sensory properties.

Key words: Bee bread, probiotic, lactic acid bacteria, fermented, honey, beverage
2026, xvii+170 pages.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince beni yönlendiren ve her konuda yardımcı olan, öneri ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli danışman hocalarım Sayın Prof. Dr. Sine ÖZMEN TOĞAY'a ve Sayın Doç. Dr. Aycan YİĞİT ÇINAR'a en içten dileklerimle teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim ve tez çalışmama bilgi ve tecrübeleriyle katkı sağlayan Sayın Prof. Dr. Yasemin ŞAHAN'a ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ufuk BAĞCI'ya, laboratuvar çalışmaları sırasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Gamze DÜVEN'e, desteklerinden ötürü Sayın Prof. Dr. Aycan TOSUNOĞLU ve Dr. Ömer SOLAK-AMET'e ve arı ekmeği örneklerimin teminindeki yardımlarından dolayı arıcılığa gönül vermiş tüm emekçilere teşekkür ederim.

Bu doktora tez çalışmasını, FDK-2024-1827 numaralı "Arı Ekmeğinden Probiyotik Laktik Asit Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Fermente Bal İçeceği Üretiminde Kullanım Potansiyelinin Belirlenmesi" başlıklı Doktora Tez Projesi ile destekleyen Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince bana maddi ve manevi olarak destek verenlere, akademik yolculuğumun her aşamasında sabır ve anlayış gösteren değerli eşime ve sevgili oğluma teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca, her daim yanımda olan ve varlığını hissettiren aileme teşekkür ederim.

Neslihan ULUBAYRAM
…/…/…….

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET vii
ABSTRACT viii
TEŞEKKÜR ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ xvii
1.GİRİŞ 1
2.KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI 6
2.1.Arı Ekmeği 6
2.1.1.Arı ekmeğinin fiziksel ve kimyasal yapısı 7
2.1.2.Arı ekmeği hasadı, üretim ve muhafazası 11
2.1.3.Arı ekmeğinin gıda olarak önemi ve sağlık üzerine olumlu etkileri 14
2.1.4.Arı ekmeği mikrobiyotası 17
2.2.Probiyotikler 22
2.2.1.Probiyotiklerin tarihçesi 22
2.2.2.Probiyotik olarak bilinen mikroorganizmalar 23
2.2.3.Probiyotik kaynaklar 23
2.2.4.Probiyotiklerin özellikleri 24
2.2.5.Probiyotiklerin sağlık üzerine olumlu etkileri 25
2.2.6.Probiyotiklerin güvenliği 26
2.2.7.Probiyotiklerin karakterizasyonu 28
2.2.8.Probiyotiklerin üretimi 28
2.2.9.Ticari probiyotik ürünler 29
2.2.10.Probiyotiklerin etki mekanizması 31
2.3.Probiyotik Suşların Belirlenmesinde Kullanılan In-Vitro Testler 33
2.3.1.Antimikrobiyal aktivite 33
2.3.2.Antibiyotik direnç 36
2.3.3.Safra tuzu ve düşük pH'ya direnç 40
2.3.4.In-Vitro sindirim modelindeki davranış 41
2.3.5.Otoagregasyon ve hücre-yüzey hidrofobisitesi 42
2.3.6.Kolesterol düşürücü etki 43
2.4.Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Potansiyeli 43
2.5.Arı Ekmeğinin Probiyotik Potansiyeli 45
2.6.Fermente Bal İçeceği 49
3.MATERYAL ve YÖNTEM 53
3.1.Arı Ekmeği ve Bal Temini 53
3.2.Arı Ekmeği ve Bal Örneklerinin Palinolojik İncelemesi ile Kimyasal Analizler 54
3.2.1.Bal ve arı ekmeği örneğinde polen tür tayini 54
3.2.2.Balda Kimyasal Analizler 55
3.2.3.Arı ekmeği örneklerine uygulanan kimyasal analizler 57
3.3.Arı Ekmeği Örneklerinde Uygulanan Mikrobiyolojik Analizler 58
3.3.1.Toplam mezofilik aerobik canlı bakteri sayımı 58
3.3.2.Toplam maya/küf sayımı 58
3.3.3.Laktik asit bakterisi (LAB) sayımı 58
3.4.Örneklerden Potansiyel Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu 59

3.5.LAB İzolatlarının Probiyotik Potansiyellerinin Belirlenmesi 60
3.5.1.LAB İzolatlarının antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi 60
3.5.2.LAB İzolatlarının antibiyotik direncinin belirlenmesi 61
3.5.3.LAB İzolatlarının tuz ve mide asidine direncinin incelenmesi 62
3.5.4.LAB İzolatlarının in-vitro sindirim modelindeki davranışının incelenmesi 62
3.5.5.LAB izolatlarının otoagregasyon ve hücre-yüzey hidrofobisitesinin belirlenmesi 63
3.5.6.LAB izolatlarının kolesterol asimilasyon kabiliyetinin değerlendirilmesi 64
3.6.İzolatlarının Cins ve Tür Düzeyinde Tanımlanması 64
3.7.İzolatların Hemolitik Aktivitesinin Değerlendirilmesi 64
3.8. E. faecalis İzolatının Fermentasyon Özelliklerinin Belirlenmesi..... 65
3.9.Fermente Bal İçeceği Üretimi 65
3.9.1.Arı ekmeğinden elde edilen probiyotik potansiyeli E. faecalis (17YT4) izolatı ile fermente bal içeceği üretimi 66
3.9.2.Arı ekmeği ile fermente bal içeceği üretimi 67
3.9.3 Farklı kültür kombinasyonları ile fermente bal içeceği üretim denemesi..... 67
3.10.Fermente Bal İçecek Örneklerinin Mikrobiyolojik Özellikleri..... 68
3.10.1.Toplam mezofilik aerobik canlı bakteri 68
3.10.2.Küf ve maya sayımı 68
3.10.3.Canlı laktik asit bakterisi sayımı 68
3.11.Fermente Bal İçeceklerinin Fizikokimyasal ve Fonksiyonel Özellikleri 68
3.11.1.pH ölçümü ve titrasyon asitliği..... 68
3.11.2.Brix ölçümü..... 68
3.11.3.Renk tayini 68
3.11.4.Toplam şeker /indirgen şeker 69
3.11.5.Toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite 70
3.12.Fermente Bal İçecek Örneklerinin Duyusal Özellikleri..... 70
3.13.Fermente Bal İçeceği Raf Ömrü Takibi 70
3.14.İstatiksel Analizler 70
4.BULGULAR VE TARTIŞMA 71
4.1. Bal ve Arı Ekmeği Örneklerinin Palinolojik İncelemesi ile Kimyasal Analizler 71
4.1.1.Balın palinolojik özellikleri..... 71
4.1.2.Balın pH ve serbest asitlik sonuçları 72
4.1.3.Balın iletkenliği 73
4.1.4.Balın şeker profili..... 73
4.1.5.Balın prolin miktarı 76
4.1.6.Balın toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivite 77
4.1.7.Arı ekmeğinin palinolojik özellikleri 77
4.1.8.Arı ekmeğinin toplam protein miktarı..... 79
4.1.9.Arı ekmeğinin yağ asidi kompozisyonu..... 81
4.1.10.Arı ekmeğinin toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasitesi..... 84
4.2.Toplanan Arı Ekmeklerinin Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları 85
4.2.1.Toplam mezofilik aerobik canlı bakteri sayısı 85
4.2.2.Toplam maya/küf sayısı 87
4.2.3.Laktik asit bakterisi (LAB) sayısı 88
4.3.Arı Ekmeklerinden Potansiyel Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu 90
4.4.LAB İzolatlarının Probiyotik Potansiyellerinin Belirlenmesi..... 91
4.4.1.LAB izolatlarının antimikrobiyal aktivitesi 91
4.4.2.LAB izolatlarının antibiyotik direnci 98

4.4.3.LAB izolatlarının tuz ve mide asidine direnci 104
4.4.4.LAB izolatlarının in-vitro sindirim modelindeki davranışı 107
4.4.5.LAB izolatlarının otoagregasyon ve hücre-yüzey hidrofobisitesi 109
4.4.6.LAB izolatlarının kolesterol asimilasyon kabiliyeti 112
4.5.İzolatlarının Cins ve Tür Düzeyinde Tanımlanması 114
4.6.İzolatların Hemolitik Aktivitesinin Değerlendirilmesi 114
4.7. *E. faecalis* İzolatının Fermentasyon Özelliklerinin Belirlenmesi 116
4.8.Fermente Bal İçeceği Üretimi 117
4.9.Fermente Bal İçeceği Mikrobiyolojik Kalite Özellikleri 117
4.10.Fermente Bal İçeceği Fizikokimyasal ve Fonksiyonel Özellikleri 119
4.10.1.Fermente bal içeceği örneklerinde pH ölçümü ve titrasyon asitliği 119
4.10.2.Brix 121
4.10.3.Toplam şeker /indirgen şeker 123
4.10.4.Toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite 124
4.10.5.Renk tayini 126
4.11.Fermente Bal İçeceği Duyusal Özellikleri 127
4.12.Fermente Bal İçeceği Raf Ömrü 129
5.SONUÇ 133
KAYNAKLAR 138
ÖZGEÇMİŞ 170

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
a*	CIELab renk uzayında kırmızı-yeşil renk koordinatı
b*	CIELab renk uzayında sarı-mavi renk koordinatı
β	Beta
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
g	Gravite kuvveti
γ-	Gama
kg	Kilogram
L	Litre
L*	CIELab renk uzayında aydınlık değeri
log	Logaritmik değer
mEq	Miliequvalant değeri
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mmol	Milimol
mS	Milisiemens
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µmol	Mikromol
µg	Mikrogram
µS	Mikrosiemens
nm	Nanometre
p	İstatistiksel anlamlılık değeri
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonunun negatif logaritması
rpm	Dakikadaki devir sayısı
v	Hacim
°Brix	Brix derecesi
°C	Santigrat derece

Kısaltmalar	Açıklama
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-etilbenzotiyazol-6-sülfonik asit)
ANOVA	Varyans analizi
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
Ar-Ge	Araştırma ve Geliştirme
Ax	Amoksisilin
A	Ampisilin
C	Kloramfenikol
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
COVID-19	Coronavirus Disease 2019
Cp	Siprofloksasin
DHA	Dokosahekzaenoik asit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikali
DNA	Deoksiribonükleik asit
DRBC	Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar
E	Eritromisin
EFSA-QPS	European Food Safety Authority - Qualified Presumption of Safety
EPA	Eikosapentaenoik asit
EPS	Ekstrasellüler polisakkarit
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FE	Demir (Iron) elementi
FLAB	Fruktozdan türeyen Laktik Asit Bakterileri
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
GABA	Gamma-aminobutirik asit
GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
GC-MS	Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi
GRAS	Generally Recognized As Safe
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC_{50}	Yarı maksimal inhibitör konsantrasyonu
IgA	İmmünoglobulin A
KAA	Kanamycin Aesculin Azide Agar
LAB	Laktik Asit Bakterileri
LOD	Gözlenebilme sınırı
LOQ	Tayin sınırı
M17	Laktik asit bakterilerinin izolasyonu için kullanılan besiyeri.
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MLTS	Multi-Lokus Sekans Tiplenmesi
MRS	Man, Rogosa, Sharpe agar
MS	Mass Spectrometry
NaOH	Sodyum hidroksit
n	Numune sayısı
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
OD	Optik yoğunluk
P	Penisilin

PCA	Plate Count Agar.
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
QE	Quercetin Equivalent
SPP	Species (Tür)
TE	Trolox Equivalent
TE	Tetrasiklin
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TMAB	Toplam mezofilik aerobik bakteri
TMACB	Toplam mezofilik aerobik canlı bakteri
TPS10	Baldaki toplam polen sayısını gösteren parametre
VA	Vankomisin
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 1.1.	Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmaların şematik gösterimi	5
Şekil 2.1.	Arı ekmeği örnekleri	6
Şekil 3.1.	Fermente içecek üretimi şematik gösterimi	66
Şekil 4.1.	Bal örneğine ait kromatogram	74
Şekil 4.2.	Arı ekmeği örneğinin yağ asidi kromatogramı	81
Şekil 4.3.	Ekim sonucu oluşan farklı morfolojideki koloniler	90
Şekil 4.4.	Mikroskobik inceleme görüntüleri; A) Gram pozitif kok morfolojisindeki bakteriler B) Gram pozitif streptokok morfolojisindeki bakteriler	91
Şekil 4.5.	Farklı izolatların spot agar difüzyon testi (A; 17YT4 ve 17YT5) ve kuyucuk difüzyon testinde (B;17YT4 ve BHÇG5) oluşturdukları inhibisyon zonları	92
Şekil 4.6.	İzolatların koyun kanlı agarda hemoliz aktivitesi	115
Şekil 4.7.	Fermente içecek örneklerinin raf ömrü boyunca pH değerlerindeki değişim	130
Şekil 4.8.	Fermente içecek örneklerinin raf ömrü boyunca asitlik değerlerindeki değişim	130
Şekil 4.9.	Fermente içecek örneklerindeki laktik asit bakteri (LAB) sayısının raf ömrü boyunca değişimi	131

ÇİZELGELER DİZİNİ

		Sayfa
Çizelge 3.1.	Arı ekmeğinin toplandığı bölgeler ve numune kodları	53
Çizelge 3.2.	Antibiyotik direnç testinde kullanılan antibiyotikler ve zon çapları * (mm)	61
Çizelge 4.1.	Bal örneğinde belirlenen bitki taksonlarının polen yüzdeleri (%)	71
Çizelge 4.2.	İçecek üretiminde kullanılan balın kimyasal özellikleri	73
Çizelge 4.3.	Arı ekmeği örneğinde belirlenen bitki taksonlarının polen yüzdeleri	78
Çizelge 4.4.	Arı ekmeği örneğinin yağ asidi kompozisyonu (%)	83
Çizelge 4.5.	Arı ekmeği örneğine ait sayım sonuçları (log kob/g)	86
Çizelge 4.6.	Spot agar difüzyon test sonuçları	93
Çizelge 4.7.	Kuyucuk agar difüzyon testine göre *L. monocytogenes* üzerinde oluşan inhibisyon zonları (n=3)	96
Çizelge 4.8.	İzolatların antibiyotik direnç zonları	101
Çizelge 4.9.	İzolatlara ait antibiyotik direnç profilleri	102
Çizelge 4.10.	Arı ekmeğinden elde edilen izolatların düşük pH ve %0,3 safra tuzu konsantrasyonuna dirençleri	104
Çizelge 4.11.	İzolatların mide ve bağırsak ortamı sonrası hayatta kalma yüzdeleri ve sayım sonuçları	108
Çizelge 4.12.	Otoagregasyon kapasitesi ve hücre-yüzey hidrofobisitesi test sonuçları	109
Çizelge 4.13.	Kolesterol asimilasyon testi sonuçları	112
Çizelge 4.14.	Fermente bal içeceği örneklerine ait sayım sonuçları (log kob/mL)	118
Çizelge 4.15.	Fermente bal içeceği örneklerine ait kimyasal analiz sonuçları	119
Çizelge 4.16.	Ballı içecek örneklerinin toplam fenolik madde ve antioksidan kapasitesi	125
Çizelge 4.17.	Ballı içecek örneklerinin renk tayini sonuçları	126
Çizelge 4.18.	İçecek örneklerinin duyusal test sonuçları	127
Çizelge 4.19.	İçecek örneklerinin pH, titrasyon asitliği ve LAB sayım sonuçları	129

1. GİRİŞ

Probiyotik gıdalara eski zamanlardan beri birçok kültürde rastlanmakta ve sahip oldukları olumlu sağlık etkilerine ilişkin farkındalığın artışı ile bu ürünlere olan talep artmaktadır. Probiyotik gıda takviyelerine yönelik kazanılan farkındalık, tüketicilerin diyetlerine bilinçli bir şekilde probiyotik gıdaları eklemelerine sebep olmuş, ayrıca günlük beslenmede yer alan birçok gıda ürününde probiyotik özellik aranmaya başlanmıştır. Sonuç olarak katma değeri yüksek fonksiyonel ürünler gıda endüstrisinde artan bir pazar payına sahip olmakta ve piyasadaki ürün çeşitliliğini arttırmak için farklı probiyotik kaynaklara ihtiyaç duyulmaktadır.

Yoğurt, kefir ve peynir gibi hayvansal kaynaklı fermente gıdalar probiyotik potansiyelli izolatlar için yaygın bir kaynak özelliğindedir. Alternatif olarak meyve suları, sebze salamuraları, turşu ve boza gibi geleneksel gıdalardan da izolasyon çalışmaları yapılmakta ve izolatlardan yeni ürün üretiminde yararlanılmaktadır (Fontana vd., 2013; Gawkowski ve Chikindas, 2013). Son yıllarda sağlık üzerine olumlu etkileri artarak dikkat çeken bir arı ürünü olan arı ekmeğinin de yeni probiyotik kültürler ve ürünler için iyi bir kaynak olabileceği düşünülmektedir.

Bal genel olarak günlük diyette kullanılmakta, diğer arı ürünleri ise gıda takviyesi şeklinde tüketilmektedir. Bu ürünler gıda ürünlerinin besin değerini arttırmak amacıyla fonksiyonel bileşen olarak da kullanılmaktadır (Viuda-Martos vd., 2008). Gıda takviyesi olarak tüketimlerinin yanı sıra ilaç benzeri ürün kategorisinde, özellikle kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinin üretiminde arı ürünlerinden yararlanılmaktadır (Kurek-Górecka vd., 2020). Yapılan çalışmalar biyolojik yararları ve farmakolojik özellikleri ortaya koymaktadır. Bu durum, nutrasötikler ve fonksiyonel ürün pazarında arı ürünlerinin tercih edilmesine yol açmaktadır (Pasupuleti vd., 2017).

Arı ekmeği, arı poleni ve nektar karışımının tükürük bezi salgısı ve mide enzimleri kullanılarak dönüştürülmesiyle oluşan fermente bir kovan ürünüdür (Anderson vd., 2011). Proteinler, lipitler, mikro elementler ve vitaminlerce zengin bir içeriğe sahip olup

arıların beslenmesinde kullanılmaktadır. Besleyici içeriğinin yanı sıra birçok fonksiyonel özelliği bulunmakta ve değerli bir gıda takviyesi olarak kabul edilmektedir.

Sahip olduğu fonksiyonel özellikler arı poleni ile benzerlik göstermekle birlikte arı ekmeğinin fonksiyonel içeriği daha yüksektir. Çünkü arı ekmeğindeki bileşenler kısmen fermentedir ve organizmada daha kolay asimile edilebilmektedir (Bogdanov, 2011). Arı ekmeği, arı polenine kıyasla daha az protein içermekte ancak proteinlerinin sindirimi daha kolay gerçekleştirilmektedir. Arı polenine nazaran 6 kat daha fazla laktik asit içermekte ve bu özelliği kovanda daha uzun süre bozulmadan kalmasına neden olmaktadır. Ayrıca, arı poleni kadar maya gelişimine açık olmaması raf ömrünü uzatmaktadır (Silici, 2019). Bahsedilen bu yararları ve vücutta emiliminin kolay olması yeni fonksiyonel ürünler için potansiyelinin ne kadar yüksek olduğunu göstermektedir.

Arı ekmeğinin antioksidan, antimikrobiyal ve antitümoral aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca probiyotik potansiyeli bulunan mikrobiyotaya sahiptir. İçeriğinde yer alan makro ve mikro bileşenlerin yanı sıra yapısında bulunan çeşitli özellikteki mikroorganizmaların, ürüne tedavi edici etkiler kazandırabileceğine dair bilimsel görüşler bulunmaktadır (Khalifa vd., 2020; Bakour vd., 2022). Arı ekmeğinin mikrobiyotasının incelendiği çalışmalar bulunmasına rağmen probiyotik potansiyele dair çalışmaların sınırlı olduğu görülmektedir.

Yapılan çalışmalar arı ekmeğinin zengin bir mikrobiyotaya sahip olduğunu göstermekte ve ürünün probiyotik potansiyeli de son yıllarda dikkat çekmektedir. Arı ekmeğinin mikrobiyotasının incelendiği çalışmalarda; *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. cinsi laktik asit bakterilerinin yanı sıra Acetobacteriaceae familyasına ait cinsler ile patojenite göstermeyen *Enterococcus* spp. ve *Bacillus* spp. türlerine rastlandığı bildirilmiştir (Anderson vd., 2011). Kovan ve arı mikrobiyotası kaynaklı bakterilerin yanı sıra, yeni nesil probiyotik olarak tanımlanan *Akkermansia muciniphila* da bu ürünlerde tanımlanmıştır (Kahraman-Ilıkkan, 2023).

Literatürde arı ekmeğinin fonksiyonel mikrobiyotasının incelendiği ve sahip oldukları laktik asit bakterilerinin probiyotik potansiyelinin değerlendirildiği sınırlı sayıda

çalışma bulunmaktadır. Arı ekmeğinin kökeni ve çevresel faktörler ürünün mikrobiyotasını etkilemekte, ülkemizde yetiştirilen Avrupa bal arısına (*Apis mellifera*) ait arı ekmeğinin fonksiyonel mikrobiyotası ve sahip olduğu probiyotik potansiyelin gösterilmesi önem arz etmektedir.

Arı ekmeği arı poleninin fermente hali olup, fermentasyonla birlikte gelen birçok faydayı bünyesinde barındırmaktadır. Propolis gibi arıcılık ürünleri ile yeni tanışılmışken, arı ekmeği gibi kıymetli bir kovan ürününün de tüketiciyle buluşturulması gerekmektedir. Arı ekmeğinin diğer arıcılık ürünleri kadar bilinirliğe sahip olmaması, üretim koşularının zorluğundan kaynaklanmaktadır. Ayrıca piyasadaki arı ekmeğinin uygunsuz üretim ve muhafaza koşullarının, kıymetli bileşenlerden yararlanım oranını azalttığı bilinmektedir. Bu nedenlerle, arı ekmeğinin fonksiyonel özelliklerini korumak amacıyla doğru şekilde işlendiği takdirde endüstriyel ölçekte fermente gıda üretimi için yüksek tekno-fonksiyonel özelliklere sahip umut verici bir kaynak olabileceği düşünülmektedir. Tüm bunlar göz önüne alındığında arı ekmeğinden yüksek düzeyde fayda sağlanabilmesi adına yapılan çalışmaların arttırılması ve yenilikçi ürünler tasarlanması bir gereklilik halini almıştır. Ayrıca bilimsel çalışmalar ile ortaya konulacak faydanın, ürünün üretimi ve tüketimi hakkında farkındalığı arttıracağı öngörülmektedir.

Arı ekmeğinin mikrobiyotasındaki laktik asit bakteri izolatlarının probiyotik potansiyelinin incelenmesi ile bu fonksiyonel ürün hakkındaki bilgilerin literatüre katkı sağlayacağı öngörülmektedir. Ayrıca arı ekmeğinden elde edilen probiyotik potansiyele sahip izolatlar ve arı ekmeği örneği kullanılarak fermente bal şerbeti üretimi denenmiş, probiyotik içeren yeni bir ürün geliştirme çalışması yapılmıştır.

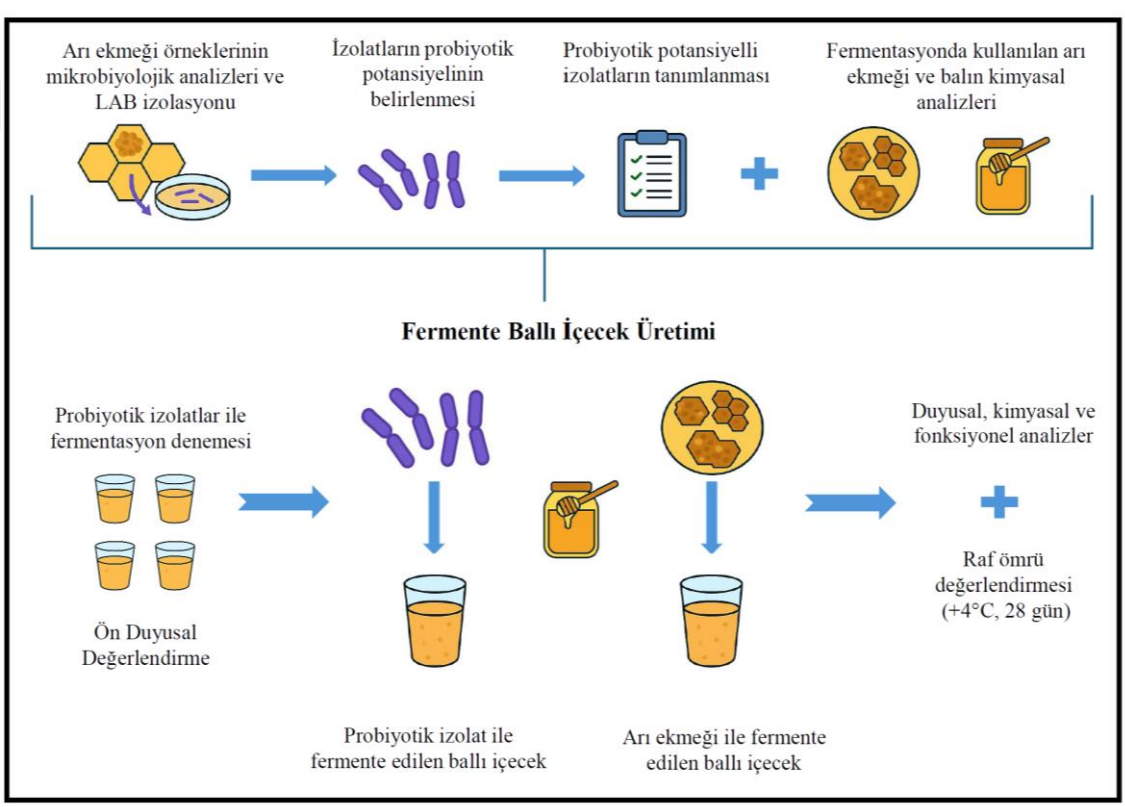
Literatürde baldan üretilen içeceklerin serinletici, hazmı kolaylaştırıcı özellikleri üzerinde durulmuş ve boğaz rahatsızlıkları ile gribal enfeksiyonlarda tüketimi tavsiye edilmiştir (Sarıoğlan ve Cevizkaya, 2016; İzol vd., 2023). Fakat bal sirkesi dışında hammaddesi bal olan fermente özellikte içeceklere rastlanmamıştır. Bal birçok çalışmada tatlandırıcı bir lezzet unsuru olarak kullanılmıştır. Yine bir arıcılık ürünü olan arı ekmeğinden izole edilen ve probiyotik potansiyel sergileyen bakterilerin kullanıldığı

fermente bir bal içeceğinin, asitli veya birçok katkı maddesi içeren içeceklere kıyasla kıymetli bir alternatif olacağı düşünülmektedir.

Probiyotik potansiyele sahip suşların kullanıldığı çeşitli fermente gıdaların üretiminin incelendiği çalışmalara rastlanırken, arı ürünleri kaynaklı çalışmaların kısıtlı olduğu görülmektedir. Literatürde yer alan çalışmalarda, arı ekmeğinden laktik asit bakterileri izole edilmiş ve probiyotik potansiyelleri belirlenmiştir. Ancak arı ürünlerinden izole edilen probiyotik laktik asit bakterileri ile kapsamlı bir fermente ürün üretiminin yapıldığı çalışmalara rastlanmamıştır. Yapılan bir çalışmada, arı midesinden izole edilen *Lactobacillu*s sp. Makhdzir Naser-1 (GQ451633) isimli suş kullanılarak bal şerbetinin Gama aminobütirik asit (GABA) yönünden zenginleştirilmesi için optimum şartlar belirlenmiştir (Gharehyakheh vd., 2019). Arı ekmeğinden izole edilen probiyotik karakterli mikroorganizmalar ile fermente bal şerbeti üretim potansiyelinin incelendiği bir çalışmanın literatürde yer almaması, tez çalışmasının bu yönüyle özgünlüğünü ortaya koymaktadır. Değerli bir arı ürününün probiyotik potansiyelinin incelenmesi ve bu kaynağı kullanarak fonksiyonel ürünler üretilmesi yeni probiyotik kaynaklar hakkında ufuk açıcı olacaktır. Yapılan çalışma ile arı ekmeğinden elde edilecek probiyotiklerin beslenme rutinine kazandırılabileceği ve yeni fonksiyonel gıda üretiminde kullanılabileceği ön görülmektedir.

Bu çalışmada; ülkemize has arı ekmeği örneklerinin fonksiyonel mikrobiyotasının belirlenmesi, elde edilecek izolatların probiyotik potansiyelinin değerlendirilmesi ve probiyotik özellik gösteren suşların fonksiyonel ürün ve gıdalarda kullanılabilmesi için ürün denemesi gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, Avrupa bal arısına (*Apis mellifera*) ait arı ekmeği örnekleri toplanıp mikrobiyolojik (toplam mezofilik aerobik canlı bakteri, küf/maya ve laktik asit bakteri sayımı) analizler yapılarak, laktik asit bakteri suşları izole edilmiştir. İzolatların probiyotik potansiyeli; antimikrobiyal aktivite, asit ve tuz toleransı, gastrointestinal sistemde canlı kalma, kolonizasyon gibi özellikleri ve kolesterol düşürücü etkileri incelenerek belirlenmiştir. İzolatlara antibiyotik direnç ve hemoliz testleri uygulanarak güvenilirlikleri değerlendirilmiştir. Probiyotik potansiyele sahip olduğu belirlenen suşun MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) analizi ile tür

düzeyinde tanımlaması gerçekleştirilmiştir. Probiyotik özellikli izolat ve elde edildiği arı ekmeği fermente bal şerbeti üretiminde kullanılmış ve tüketici beğenisine uygun fonksiyonel ürün üretimi denenmiştir. Tez çalışması sonucunda arı ekmeği kaynaklı yeni probiyotik izolatların gıda endüstrisine kazandırılması yolunda adımlar atılmıştır. Arı ekmeği gibi fonksiyonel özellikler yönünden zengin, ancak değerlendirme imkânı kısıtlı olan ürünlerinin beslenme ve sağlıklı yaşam pratiklerinde yer alması hedeflenmiştir. Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışma başlıkları Şekil 1.1'de özetlenmiştir.



Şekil 1.1. Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmaların şematik gösterimi

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Arı Ekmeği

Arı ekmeği, bal arısının topladığı polen ve nektar karışımını tükürük bezi salgısı ve mide enzimleri kullanarak dönüştürmesi ile ortaya çıkmış bir kovan ürünüdür (Anderson vd., 2011). "Perga" adı ile de bilinen arı ekmeği genellikle arı poleni ile karıştırılmaktadır. Perga, arı tarafından özel olarak fermente edilmiş polen kaynaklı kıymetli bir arıcılık ürünüdür (Şekil 2.1). Arı ekmeğinin temel bileşenlerinden nektar enerji kaynağı iken; arı poleni protein, yağ ve vitamin yönünden oldukça zengindir. Bu karışım, arının salgısı ile gelen özel enzimler, mikroorganizmalar, nem ve sıcaklığın etkisiyle fermente olmakta ve besin değeri artmaktadır. Zengin besleyici içeriği nedeniyle arıların beslenmesinde arı ekmeğinden yararlanılmaktadır (Karaman vd., 2017).



Şekil 2.1. Arı ekmeği örnekleri

Polen arılar tarafından bahar ve yaz aylarında toplanmakta olup tedariki büyük ölçüde mevsimsel koşullara bağlıdır. Arıların düzenli beslenebilmesi için toplanan polenin yeterli olması ve tüketime uygun şekilde yıl boyu muhafazası gereklidir. Arı poleninin yüksek nem içeriği (%20-30), bakteri ve fungusların gelişmesi için uygun koşullar sağlamaktadır (Janashia vd., 2018). Bu da arı poleninin kovan içinde mikrobiyal bozulmadan korunmasını güçleştirmektedir. Kovanın patojen bakteri ve küf ve mayaların gelişimini engelleyecek şekilde evrimleşmesi ve kullanılan balmumunun mikrobiyal gelişimi desteklemeyen bir ortam oluşturmasına rağmen bozulmanın önüne geçilememektedir (Anderson vd., 2011). Bu noktada arıların salgıları ve çeşitli

mikroorganizmalar aracılığıyla başlatılan fermentasyon ürünün muhafazası ve besleyici içeriğinin arttırılmasında kilit rol oynamaktır. Arı ekmeği, arı kolonisinin sağlığını korumak ve bal üretimini artırmak için ideal bir gıdadır.

2.1.1. Arı ekmeğinin fiziksel ve kimyasal yapısı

Arı ekmeği, çeşitli bitkilerden toplanan polen tanelerini içermekte bu nedenle rengi ve tadı floral kaynağa göre değişiklik göstermektedir. Arı ekmeğinin açıktan koyuya genellikle amber renklerde olduğu, ayrıca meyve çiçeği orijinli arı ekmeklerinin kaynağa bağlı olarak farklı renk katmanlarını da içerdiği bilinmektedir. Arı ekmeğinin tadı büyük ölçüde flavonoidlerin ve aromatik bileşiklerin etkileşimi ile oluşmaktadır. Bu bileşenler arı ekmeğine buruk, ekşi, meyvemsi tatlar vererek koku ve tat profiline katkıda bulunmaktadır. Floral kaynağın yanı sıra arı ırkının da lezzet profili üzerinde önemli bir etkisi olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Örnekler tatlı ya da acı gibi görece zıt tanımlamalarla nitelendirilmiştir (Şimşek vd., 2023). Oluşum sürecinde gerçekleşen fermentasyon, içeriğinde yer alan bileşenler ve kovandaki peteklerin ince bir balmumu tabakasıyla sarılmış olması arı ekmeğinin reolojik özelliğini belirlemiştir. Taze ürün genelde yapışkan bir dokuya sahipken, aynı zamanda yer yer kırılganlık göstererek dağılabilmektedir. Bu özellikler, arı ekmeğinin su aktivitesi, polen türü, fermentasyon süresi ve sıcaklık gibi birçok faktörden etkilenmektedir (Kieliszek vd., 2018).

Arı ekmeği farklı oranlarda karbonhidrat, protein, lipid yanında mineraller, vitaminler, esansiyel amino asitler ve fenolik bileşikler gibi diğer mikro besinleri içermektedir. Birçok kaynakta besinsel zenginliği nedeniyle "mükemmel ve eksiksiz gıda" olarak adlandırılmıştır. Ürünün nem içeriği arı poleninin higroskopik özelliği ve biyokimyasal süreçte arı tükürüğü ve balın eklenmesi nedeniyle yüksektir. Anadolu bal arısına ait arı ekmeklerinde nem içeriğinin 11,54-23,07 g/100 g (Mayda vd., 2020; Kalaycıoğlu vd., 2023) aralığında olduğu tespit edilmiştir. Su aktivitesi 0,60-0,92 arasında değişkenlik göstermektedir, bu durum ürünü mikrobiyal bozulmaya elverişli hale getirmekte ve muhafazasını zorlaştırmaktadır. Arı ekmeği asidik özellikte olup, 3,28-4,13 arasında farklı pH değerlerine sahip olduğu görülmüştür (Mohammad vd., 2021).

Coğrafi köken, bitki örtüsü, iklim ve toprak tipine göre değişmekle birlikte arı ekmeğinde ortalama %24-35 karbonhidrat, %20-22 protein, %2,43 mineral, %3,5 laktik asit ve %1,6 oranında lipid bulunmaktadır (Karaman vd., 2017; Vásquez ve Olofsson, 2009). Yapısındaki mikro besinler ise; vitaminler A, B1, B2, B3, B6, B12, C, E, D, K, H, PP, folik asit, nikotinik asit, riboflavin, pantotenik asit; mineraller P, S, CI, K, Ca, Na, Fe, Mg, Cu, Zn, Co, Mo, Se, Cr, Ni, Si; amino asitler ise fenilalanin, valin, arginin, histidin, lizin, lösin, izolösin, metionin, treonin ve triptofan'dır (Nakilcioğlu ve Nurko, 2022).

Arı ekmeğinin protein içeriğinin arı poleni ve arıya ait salgılardan kaynaklandığı bilinmektedir. Kaplan vd. (2016) yaptıkları çalışmada farklı botanik kökenli arı ekmeklerinin protein içeriklerinin 14,82-24,26 g/100 g aralığında olduğu ve bu miktarın kökene göre değişebildiğini bildirmiştir. Arı poleni ile kıyaslandığında protein içeriği düşük olmasına rağmen, mevcut proteinin sindirilebilirliği arı poleninin çok üstündedir (Karaman vd., 2017). Arı ekmeği proteinin yanı sıra çok çeşitli enzimler içermekte ve bu durumun gerçekleşen biyokimyasal süreç kaynaklı olduğu belirtilmektedir. Bu enzimler, sindirimi kolaylaştırmanın ötesinde, arı ekmeğinin besin değerini ve biyoyararlanımını artırmaya yardımcı olmaktadır. İçeriğindeki enzimlerden, asit fosfataz, lösin aminopeptidaz ve β-glukozidaz karbonhidratları; selülobioz, salisin, amigdalin ve gentibiyoz kitini; β-galaktozidaz laktozu hidrolize ederken α-glukozidaz ise sukroz, maltoz, trehalozu hidrolize etmektedir. Bu durum karbonhidrat ve parçalanma ürünlerine dair çeşitliliği arttırmakta, arı ekmeğini diğer arı ürünlerinden ayırmaktadır.

Karbonhidratlar, arı ekmeğinin temel bileşenidir ve arı polenine nektar eklenmesiyle yüksek seviyelere ulaşmaktadır. İğnesiz arı kovanından temin edilen arı ekmeği üzerine yapılan çalışmalarda karbonhidrat miktarı %10,85'ten %59,94'e kadar değişkenlik göstermekte ve bu farklılığın bölgelerin özelliklerine, kaynağın floral niteliğine göre şekillendiği belirtilmektedir. Aynı çalışmada arı ekmeğinde fruktoz, glukoz ve sakkaroz gibi temel şekerlerin yanı sıra mannitol gibi şeker alkollerinin de dikkate değer miktarda bulunduğu belirtilmiştir (Mohammad vd., 2021). Arı ekmeğindeki şekerlerin en büyük

kısmını fruktoz (%57,51) oluştururken, bunu glukoz (%42,59) ve maltoz (%3,37) takip etmektedir. Arı poleninin laktik asit fermentasyonu sırasında monosakkaritlere ayrışması nedeniyle sakkaroz içeriğinin daha düşük kaldığı (%0,12) bildirilmiştir (Urcan vd., 2017).

Arı ekmeğinde yapılan analizler sonucunda oksalik asit, sitrik asit, malik asit, süksinik asit, tartarik asit, laktik asit ve asetik asit gibi yedi farklı organik asitin varlığı tespit edilmiş ve laktik asit ortalama olarak 21,07 mg/g olarak belirlenmiştir (Aksoy vd., 2024). Kalaycıoğlu vd., (2023) glukonik asitin (43,6–63,2 g/kg) arı ekmeğinde baskın organik asit olduğunu, laktik asitin (17,6–21,7 g/kg) ise ikinci en yüksek organik asit olarak tespit edildiğini belirtmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda farklı miktarlarda organik asit içeriğine rastlandığı, bu durumun çevresel faktörlere bağlı olduğu aynı zamanda yüksek organik asit içeriğinin iyi bir fermentasyonun göstergesi olduğu bildirilmiştir (Aksoy vd., 2024)

Literatürde arı ekmeğinin lipit içeriğinin özellikle insan beslenmesi için çok önemli olan çoklu doymamış yağ asitleri söz konusu olduğunda önemli bir kaynak olduğu vurgulanmaktadır. Üründe bulunan toplam lipit miktarın arı ekmeğinde bulunan polenin yağ asidi, karoten ve vitamin içerikleri nedeniyle farklılık göstermektedir. Monofloral arı ekmeği örneklerinde yapılan bir çalışmada örneklerin lipit içeriğinin 5,93-11,55 g/100 g arasında değiştiği, ayçiçeği ve pamuk gibi yağlı tohumlara sahip bitkileri orijinli arı ekmeklerinde toplam lipit içeriğin en yüksek seviyede olduğu bildirilmiştir (Kaplan vd., 2016). Güney Amerika'da yapılan farklı bir çalışmada 15 farklı arı ekmeğinin lipit içerikleri 1,65-5,50 g/100 g arasında tespit edilmiştir (Zuluaga vd., 2015). Arı ekmeğinde şimdiye kadar 39 farklı yağ asidi tespit edilebilmiştir (Čeksteryte vd., 2016). Kütle spektrometresi ile birleştirilmiş Gaz kromatografisi (GC-MS) kullanılarak yapılan bir çalışmada 37 adet farklı yağ asidi tanımlanabilmiş, yine benzer yöntemler kullanılarak incelenen Güney Afrika, Fas, Türkiye orijinli arı ekmeklerinde sırasıyla 18, 25 ve 37 adet yağ asidi belirlenmiştir. Bu yağ asitleri arasında linolenik asit ile palmitik asit öne çıkmakla birlikte oleik asit, kaprilik asit, laurik asit, heptadekanoik asit ve lignoserik asit gibi yağ asitleri tanımlanmıştır (Human ve Nicolson, 2006; Bakour vd., 2019; Kaplan vd., 2019; Aylanc vd., 2023). Mevcut farklılıkların yağ fraksiyonunun

ekstraksiyonu ve kullanılan yöntemlerden de kaynaklanabileceği, ayrıca ekstrakte edilemeyen farklı lipit bileşenlerinin de olabileceğinin göz önünde bulundurulması gerektiği rapor edilmiştir.

Arı ekmeği, besleyici bileşenleri ve biyoaktif bileşikleri ile öne çıkan fonksiyonel bir gıdadır. Yağ, protein, vitamin ve mineralin yanı sıra fenolik içeriği de oldukça dikkat çekicidir. Fenolik içeriği, organik asitleri ve antioksidan kapasitesi diğer bileşenlerde olduğu gibi çevresel koşullara, arı ırkına, üretim ve muhafaza koşullarına göre değişkenlik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda toplam fenolik madde içeriğinin 4,4-84,0 mg GAE/g aralığında çok farklı değerlerde olduğu görülmüştür (Aylanc vd., 2021). Anadolu bal arısına ait örneklerde 13,26 ve 32,45 mg GAE/g ile 11,90 ve 14,77 mg GAE/g gibi farklı aralıklarda fenolik madde içeriği tespit edilirken Romanya ve Hindistan orijinli örneklerde 5,67 ve 12,83 mg GAE/g aralığında belirlenmiştir (Urcan vd., 2017; Kalaycıoğlu vd., 2023). Bu durumun sadece polenin botanik kökenine bağlı olmayıp ve ekstraksiyon metodolojisinde kullanılan çözücüyle de ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Flavonoidler arı ekmeğinde bulunan fenolik bileşiklerin ana grubu olup, ürünün lezzetini ve görünümünü etkilerler. Bu nedenle toplam flavonoid miktarının bilinmesi, dahası flavonoid bileşenlerin tanımlanması arı ekmeğinin hem biyolojik aktivitesi hem de kalitesinin belirlenmesi açısından önemlidir. Yapılan çalışmalarda toplam fenolik bileşen miktarına benzer şekilde flavonoid miktarının da (1,7-96 mg QE/g) oldukça değişken olduğu görülmüştür (Aylanc vd., 2021). Ukrayna'da yapılan bir çalışmada 5 arı ekmeği örneğinin toplam flavonoid içeriği 13,56-18,24 µg QE/g kuru ağırlık arasında değişen seviyelerde tespit edilmiştir (Ivanišová vd., 2015). Kolombiya arı ekmeğindeki toplam flavonoid içeriğinin 1,9-4,5 mg QE/g arasında değiştiğini belirlemiştir (Zuluaga vd., 2015). Arı ekmeğinin su, etanol ve metanol ekstraktlarındaki toplam flavonoid içeriği sırasıyla 3,88, 24,58 ve 16,30 mg QE/g olarak bildirilmiştir (Borycka vd., 2015). Türkiye'de yapılan bir başka çalışmada arı ekmeği örneklerinin toplam flavonoid içeriği 1,81 ila 3,74 mg QE/g olarak ölçülmüştür. Arı ekmeğindeki flavonoid bileşikler tanımlandığında kaempferol (31,25 mg/L), mirisetin (3,15 mg/L), luteolin (1,17 mg/L), isorhamnetin, apigenin ve kuersetin ön plana çıkmakta, farklı

bölge ve floral kaynağa bağlı olarak bu bileşikler çeşitlenmektedir (Bakour vd., 2019; Dranca vd., 2020; Suleiman vd., 2021).

2.1.2. Arı ekmeği hasadı, üretim ve muhafazası

Arı ekmeği birçok aşamayı barındıran, arıların ve mikroorganizmaların ortaklaşa yürüttüğü karmaşık bir süreç sonucu oluşmaktadır. Bu aşamalar polenin toplanması, fermentasyon, olgunlaşma ve kuruma şeklinde özetlenebilmektedir. Arılar tarafından toplanan polen, nektar ve diğer salgılar ile karıştırılarak ince bir balmumu tabakasıyla kaplanmış petek gözlerine sıkıca doldurulmaktadır. Peteklere doldurulmuş bu karışım arılar tarafından arı sütü ile ıslatılmakta ve belli bir nem içeriğinde kalması sağlanmaktadır. Ortamda bulunan laktik asit bakterileri (LAB) ve mayalar fermentasyonu başlatarak şekerin laktik asit vb. organik asitlere dönüşümünü sağlamaktadır. Fermentasyon sürecinde polen taneleri parçalanmakta, ürünün pH, renk ve tadında değişiklikler meydana gelmekte ve besin içeriği değişmektedir. Oluşan bileşenler arı ekmeğine karakteristik tadını ve kokusunu vermektedir. Arı poleninin arı ekmeğine dönüşüm mekanizması hala tam olarak açıklanamamıştır. Arıların salgı bezlerinden gelen amilaz enzimleri ile çeşitli bakteriler ve polen yüzeyinden gelen bazı mayaların bu dönüşümde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Şimşek vd., 2023). Arı ekmeğinin fermentasyon süresinin ortalama 2 hafta sürdüğü belirtilmektedir (Vásquez ve Olofsson, 2009). Olgunlaşan arı ekmeği besin değeri yüksek bir fonksiyonel gıdaya dönüşmekte, arılar tarafından kovandaki havanın sirkülasyonu ile kurumakta ve sertleşmektedir.

Peteklere depolanmış arı ekmeğinin peteklere zarar vermeden, bir bütün halinde çıkarılması oldukça zordur. Bu nedenle diğer kovan ürünlerine kıyasla üretimi ikinci plana atılmıştır. İşçilik gerektirmesi, hassas çalışma zorunluluğu, ürün kaybı gibi nedenler ile arıcılar tarafından uzun süre üretimi yapılmamıştır. Arı ekmeğinde yapılan çalışmalar bu kıymetli ürüne olan ilgiyi arttırmış, sağlık üzerine faydaları ortaya konuldukça talep edilen arı ekmeği arıcılar tarafından ticari bir ürün olarak değerlendirilmeye başlanmıştır. Önceleri çeşitli aparatlar ile tek tek petekten toplanan arı ekmeği son yıllarda farklı teknikler ve teknolojiler kullanılarak kovandan

alınmaktadır. Arı ekmeğinin hasadı sırasında petek içerisinde yer alan arı poleni, mum ve diğer materyallerden arındırılması ve saflığının korunması oldukça önemlidir.

Geçmişte ticari arı ekmeği üretiminde kullanılan yöntemler suya daldırma, elle veya aparatla titreşim ile petekten ayırma, kurutma, vakumlu kurutmadan yararlanma şeklinde olmuştur (Akhmetova vd., 2012). Bu yöntemler ürün ve besin değeri kaybı, işçilik maliyeleri nedeniyle bırakılmış olup bazı bölgelerde az sayıda koloniye sahip arıcılar tarafından hala kullanılmaktadır. Günümüzde peteklerin dondurulması, parçalanması, balmumunun ayrılması, arı ekmeğinin kurutulması ve son olarak ince kirleticilerin uzaklaştırılmasını içeren kapsamlı bir yöntem kullanılmaktadır. Arı ekmeği içeren petekler nem içerikleri %14 -15 olacak şekilde ortalama 40°C sıcaklıkta 8-10 saat veya vakum altında 5-7 saat boyunca kurutulmaktadır. Sonrasında -1°C sıcaklığa soğutularak segmentasyon işlemine tabi tutulmakta ve öğütülerek toz haline getirilmektedir. Ticari üründe, bozulmayı önlemek amacıyla gama ışınları, etilen oksit ve metilen gazı kullanılabilmektedir (Khalifa vd., 2020). Teknik olarak bahsi geçen yöntem geliştirilerek otomasyona dayalı bir üretim süreci oluşturulabilir gibi görünse de çoğu ülkede arıcılık faaliyeti ile uğraşan kişilerin sahip olduğu kovan sayılarının düşük olması buna engel olmaktadır. Yine de iyi bir kovan bakımı, dondurucu ve kurutucu gibi ekipmanlar ile sezonda bir koloniden 0,51 ile 1,23 kg arası arı ekmeği hasat etmek mümkün olmaktadır. Başka bir çalışmada tek kovandan ortalama 0,7 kg arı ekmeği elde edildiği ve toplam arı ekmeği hasadının yılda 20 kg olduğu belirtilmiştir (Semkiw ve Skubida, 2021).

Arı ekmeğinin üretimi kadar muhafazası da özen gerektirmektedir. Ürünün tüketimi için gerekli raf ömrünü sağlamak ve bu süre içerisinde üründeki fizikokimyasal ve biyoaktif özellikleri korurken mikrobiyolojik kalitenin devamlılığını gözetmek büyük önem taşımaktadır. Arı ekmeği su aktivitesi, içeriğindeki bileşenler ve ısı, ışık gibi çevresel etmenler nedeniyle kolayca bozulabilmekte, küflenebilmekte ve besleyici özelliğini kaybedebilmektedir. Kullanılacak muhafaza yöntemleri ürünün tazeliği ve kalitesini koruyacak şekilde seçilmelidir. En sık kullanılan ve nispeten kolay ve ucuz olarak nitelenen yöntemler; arı ekmeğinin kurutulması ve bal vb. içerikler ile karıştırılması şeklindedir. Balın sahip olduğu antioksidan ve antimikrobiyal aktivite arı ekmeğinin

muhafazasını kolaylaştırmakta, diğer arıcılık ürünleri de sıklıkla bal içinde muhafaza edilmektedir. Kurutma yöntemi ile arı ekmeğinin su aktivitesi düşürülerek mikrobiyal bozulmanın önüne geçilebilmekte ve genellikle arı ekmeğinin muhafazasında bu yöntem yaygın olarak kullanılmaktadır. Arı ekmeğinin kurutulmasında şartların kontrol kolaylığı, makul bir sürece sahip olunması ve daha iyi hijyen koşulları nedeniyle kurutma fırınları tercih edilmektedir. Besinsel kalitenin korunması için fırının düşük sıcaklıklarda çalıştırılması gerektiği vurgulanmaktadır. Yapılan çalışmalarda 35°C ile 45°C arasındaki sıcaklıklarda mikrobiyolojik ve besinsel kalitede büyük değişikliklere rastlanmadığı bildirilmiştir (Smati, 2021).

Arı ekmeğinin bir diğer muhafaza şekli dondurarak muhafazadır. Hava geçirmeyen bir ambalajda -18 °C de bir yıla kadar muhafaza edilebileceği belirtilmiştir. Dondurulan ürünlerde mikrobiyal yükün arttığı görülmüştür (Combey, 2017). Teknolojik yöntemlerden dondurarak kurutma metodu ile üretilen örneklere ait sonuçlar da mikrobiyal, kimyasal ve besinsel kalitenin korunmasında etkili bulunmamıştır. Ayrıca yüksek enerji ihtiyacı ve işletme maliyetleri nedeniyle pahalı bir yöntem olarak nitelendirilmiştir. Arı ekmeğinin kurutularak oda sıcaklığında 6 ay süre ile saklanabileceği belirtilmiştir (Smati, 2021). Vakum ya da gazlı atmosferde paketleme gibi teknolojilerinin ürünün raf ömrünü uzatma ve besinsel kaliteye katkıda bulunacağı bilinmekle birlikte bu uygulamalara az sayıda ticari üründe rastlanmaktadır.

Literatürde uzun süreli muhafaza ve depolama sürecindeki değişikliklere dair yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bunun temel sebebi arı ekmeğinin bilinirliğinin az ve üretim miktarının düşük olması ayrıca kullanılacak teknolojinin yüksek maliyet gerektirmesidir. Az sayıda kovan ile bölgesel üretim yapan arıcıların bu gibi maliyetlere katlanması oldukça zordur. Aynı durum arı ekmeğinin kalite standartlarının belirlenmesinde de benzer rol oynamaktadır. Dünya çapında uygulanan belirli bir standart olmamakla birlikte arıcılık faaliyetinin yaygın olduğu ve arıcılık ürünlerini yoğun olarak ithal eden ülkelerde bazı standartlar bulunmaktadır. Rusya'da arı ekmeğinin fizikokimyasal parametrelerini tanımlayan standarda göre, nem içeriği %15'i, artık balmumu %5'i ve diğer mekanik kirleticilerin içeriği %0,1'i aşmamalıdır.

Bu şartları sağlayan ürünlerin 0-15 ºC'de 1 yıl güvenli depolanabileceği belirtilmektedir (Semkiw ve Skubida, 2021).

2.1.3. Arı ekmeğinin gıda olarak önemi ve sağlık üzerine olumlu etkileri

Besleyici içeriği ve biyoaktif bileşenleri sayesinde arı ekmeği sadece arılar için değil insanlar için de kıymetli bir gıda olmuştur. Eksiksiz bir besin olarak kabul edilmiş ve tarih boyunca çeşitli kültürlerde geleneksel tıp ve beslenme uygulamalarında kullanılmıştır. Geçmiş çağlardan günümüze kadar değerli bir kaynak olarak kabul görmüş ve çeşitli sağlık faydalarıyla ilişkilendirilmiştir. Düzenli olarak tüketiminin hastalıkların önlenmesi, vücut gelişiminin desteklenmesi ve genel olarak vücut bütünlüğünün korunmasında etkili olduğu belirtilmiştir. Günümüzde rutin beslenmenin tamamlayıcısı olarak gıda takviyesi veya fonksiyonel gıda olarak tüketimi söz konusudur. Tüketim miktarı bireyin beslenme alışkanlıkları ve ihtiyaçları gibi faktörlere bağlı olarak değişmekle birlikte günlük 20-40 g tüketiminin yeterli olduğu belirtilmektedir. Arı ekmeğinde doz aşımının olmadığı, fakat arı polenine göre biyoaktivitesinin yüksek olması nedeniyle daha düşük dozlarda ya da daha kısa süreli kullanılabileceği bildirilmektedir (Kieliszek vd., 2018).

Arı ekmeği genellikle ham halde ayrıca bal, yoğurt ve reçel benzeri ürünlerle birlikte tüketilmektedir. Fakat son yıllarda fonksiyonel gıdalara olan ilginin artması ve bu bileşenlerin gıdaların biyoaktif özelliklerini arttırması nedeniyle arı ürünleri kaynaklı fonksiyonel ürünlerin üretimi yaygınlaşmaktadır. İçeriğinde bulunan fenolik asitler, flavonoidler, karotenoidler veya vitaminler gibi çok çeşitli fitokimyasallar arı ekmeğini fonksiyonel gıda pazarında popüler bir kaynak haline getirmektedir. Ayrıca biyoyararlılığının yüksek olması bu ürünün arı polenine tercih edilmesini sağlayacaktır.

Biyoyararlılık, gıdanın sindirim sistemi tarafından ne kadar iyi emildiğini ve hücrenin enerji ihtiyacını karşılamak, dokuların yenilenmesini desteklemek gibi yaşamsal faaliyetleri sürdürmekte ne kadar yarayışlı olduğunu gösteren bir ölçüttür. Arı ekmeğinin biyoyararlılığının belirlenmesi, bu gıdanın sağlık üzerine etkilerini anlamak ve beslenme stratejisi geliştirmek amacıyla atılacak ilk adımdır. Arı ekmeğinin sindirimi

ve içeriğindeki değerli bileşenlerin sağlık üzerine etkilerini göstermek amacıyla çok sayıda çalışma yapılmıştır. Sağlık üzerine olumlu etkilerin temel kaynağının arı poleni olduğu fakat arı poleninin sindiriminde sorunlar yaşandığı bilinmektedir. Polen tanesini çevreleyen kompleks yapının parçalanması ile sindirimin kolaylaştığı ve ürünün biyoyararlılığının arttığı görülmüştür. Arı ekmeğinin oluşumunda etkili olan fermentasyonun hem arı poleninin sindirilebilirliğini hem de makro moleküllerin parçalanması ile emiliminin kolaylaştığı belirlenmiştir (Aylanc vd., 2021). Arı poleninin midede sindirimi %60 ile sınırlı kalırken, arının özel enzimleriyle eritilmiş kabuk nedeniyle arı ekmeğinin midede %100 sindirildiği bildirilmiştir (Karaman vd., 2017). 2023 yılında yayınlanan bir çalışmada arı ekmeğinin protein içeriğinin sindirimi ortalama %76 olarak tespit edilirken bu oranın çözünebilen şekerlerde daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Aylanc vd., 2023). Arı ekmeğinin biyoaktif bileşenleri ve sağlık özelliklerinin değerlendirildiği birçok çalışmada biyoyararlanım oranları da değerlendirmeye alınmıştır.

Yapılan çalışmalarda arı ekmeğinin antioksidan, antimikrobiyal, hepatoprotektif, immünomodülatör özellikte olduğu bu sayede genel vücut sağlığının korunmasına, hastalıkların önlenmesine, fiziksel ve zihinsel dayanıklılığın arttırılmasına katkı sağladığı belirtilmiştir (Khalifa vd., 2020). Ayrıca vücutta oluşan toksik bileşikleri azalttığı, dokuları yenileyerek bağışıklık sistemini güçlendirdiği ve anti-aging etki yarattığı bildirilmiştir (Bakour vd., 2019). Karaciğer, sinir ve endokrin sistem fonksiyonları üzerinde olumlu etkisiyle farmasötik tedaviyi desteklediği, içeriğindeki sağlığa yararlı bakteriler ile antibiyotik tedavisinin yan etkilerini azalttığı gösterilmiştir (Nagai vd., 2004).

Özellikle karaciğerin arındırılmasında yaygın olarak kullanılmakta, koruyucu ve detoksifiye edici etkisi ile bilinmektedir (Nakilcioğlu ve Nurko, 2022). Besin eksikliğinden kaynaklanan hastalıkların oluşumunu engellediği, sağlıklı bireylerde performans ve kondisyonu arttırmak amacıyla kullanılabileceği belirtilmektedir. Bu nedenle gelişme çağındaki çocuklar ve özellikle sporcu beslenmesinde arı ekmeğinden yararlanılmaktadır. Üstelik konsantrasyonu ve hafızayı arttırması sebebiyle zihinsel çaba gerektiren durumlarda da kullanılması önerilmektedir (Nagai vd., 2004). Arı

ekmeğinin antimikrobiyal özelliklerinden dolayı özellikle bağışıklığın azaldığı kış ayları gibi dönemlerde kullanılması tavsiye edilmektedir (Didaras vd., 2020).

Arı ekmeğinin sağlık üzerine faydaları daha önce de belirtildiği gibi sahip olduğu biyoaktif bileşenlerden, özellikle fitokimyasallardan kaynaklanmaktadır. Toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan kapasitenin belirlenmesi ürünün yararları hakkında genel bir çerçeve çizmek ve çalışmalara alt yapı oluşturmak için oldukça kıymetlidir. Yapılan çalışmaların çoğu ürünün antioksidan kapasitesi ve buna bağlı olarak ortaya çıkan etkilere odaklanmış durumdadır. Bu çalışmalarda 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radikal süpürücü kapasite yöntemi, ABTS radikal katyonu kullanılarak troloks eşdeğeri antioksidan kapasite tayin yöntemi (TEAC) ve demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP) gibi yöntemler tercih edilmiştir.

Ülkemizde toplanan arı ekmeklerinin antioksidan kapasitesine dair yapılan çalışmalarda; Mayda vd. (2020), örneklerin ABTS ve DPPH antioksidan kapasite değerlerinin sırasıyla 0,37-1,55 ile 1,29-3,82 mg TE/g aralığında olduğunu, Beykaya vd. (2021) ise Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan örneklerde antioksidan kapasitelerinin 20,03-35,43 mg TEAC/g aralığında değiştiğini belirtmiştir. Yine Anadolu'nun farklı bölgelerinden toplanan örneklerde en yüksek DPPH radikal temizleme kapasitesi %77,80 olarak tespit edilmiş ve FRAP testleri (0,28- 2,40 mmol Fe (II)/g) ile yüksek derecede anlamlı pozitif bir korelasyon gözlemlendiği bildirilmiştir (Kalaycıoğlu vd., 2023). Dünya genelinde antioksidan kapasitenin değerlendirildiği çalışmalarda DPPH, FRAP ve ABTS yöntemleri kullanılarak yapılan çalışmalarda arı ekmeğinin bölgelere, bitkisel orijine ve analiz yöntemlerine göre farklı kapasiteler sergilediği tespit edilmiştir. Çalışmaların çoğunda antioksidan kapasite toplam fenolik madde içeriğiyle uyumlu bulunmuştur. Fas'ta yapılan bir çalışmada arı ekmeğinin DPPH değeri 0,43 mg/mL, FRAP değeri 0,71 mg/mL ve ABTS'nin IC50 değeri 1,52 mg/mL olarak belirlenmiştir. Kolombiya arı ekmeği örneklerinde 35-70,1 µmol trolox/g arasında FRAP değerleri; 46,1-76,3 µmol trolox/g arasındaki TEAC değerleri tespit edilmiştir. Aynı çalışmada; toplam flavonoid içeriği 1,9-4,5 mg QE/g ve toplam fenolik madde içeriği 2,5-13,7 mg eşdeğer gallik asit/g arasında bulunmuştur. Litvanya'da toplanan örneklerin %85-%93 arasında değişen DPPH radikal temizleme yeteneklerinin

bulunduğu ve 306-394 mg GAE/100g arasında değişen toplam fenolik madde içeriğine sahip olduğu bildirilmiştir. Malezya'da yapılan bir başka çalışmada ise sırasıyla en yüksek DPPH değeri %93,60 (etanol ekstraktı), ABTS değeri %97,95 (etanol) ve FRAP değeri 0,85 mM FE/g (etanol) ile 2,41 mM FE/g (hekzan) olarak ölçülmüştür (Bakour vd., 2022).

Arı ekmeğinin antioksidan kapasitesi ürünün fonksiyonel gıda olarak tercih edilmesinin başlıca nedenlerindendir. Vücuttaki genel iyilik halinin devamı, hastalıklardan korunma, gençlik ve zindelik sağlama konusundaki potansiyeli ilerleyen yıllarda ürünün bilinirliğini arttıracaktır. Bu konuda yapılacak çalışmalar ve arıcılara verilecek teşvikler üretimin artması ve tüketimin yaygınlaşmasını kolaylaştıracaktır. Arı ekmeği gıda takviyesi ve fonksiyonel gıda olarak raflarda yerini alacaktır.

Arı ekmeğinin gıda takviyesi olarak kullanımında bazı endişeler mevcuttur. Bunlar içinde en önemlisi alerjik reaksiyonlardır. Bugüne kadar arı ekmeği tüketimine bağlı ciddi sağlık sorunları bildirilmemiş olmasına rağmen alerjik bünyeye sahip bireylerin ürünün tüketiminde dikkatli olması gerekmektedir. Diğer risk faktörleri mikrobiyal kontaminasyon, ağır metal ve pestisit kalıntılarıdır. Bu risklerin ortadan kaldırılması arıcılık faaliyetinin ekolojik olarak temiz alanlarda, iyi tarım ve iyi üretim uygulamaları kullanılarak gerçekleştirilmesine bağlıdır.

2.1.4. Arı ekmeği mikrobiyotası

Arı ekmeğinin mikrobiyotası basit bir mikroorganizma topluluğu olmayıp, ürünün besin değerini, antimikrobiyal özelliklerini ve tıbbi potansiyelini belirleyen karmaşık bir ekosistemdir. Temelde arıların bağırsak sistemi ve çevreden toplanan polenlerden gelen bakteriler, küf ve mayalardan oluşmaktadır. Bu mikroorganizmalar, polen fermentasyonu ile arı ekmeğine dönüşümü içeren farklı görevlerde yer almaktadır. Polen arılar için zararlı olarak nitelendirilebilecek mikroorganizmaları da içermekte ve sağlık riski barındırmaktadır. Dolayısıyla polenin peteklerde arı ekmeğine dönüştürülmesi bu riski ortadan kaldırarak, ürünün uzun süreli muhafazasını sağlamaktadır.

Arı ekmeğinin mikrobiyotasının incelendiği çalışmalarda; *Lactobacillus* spp., ve *Bifidobacterium* spp. cinsi laktik asit bakterilerinin yanı sıra patojenite göstermeyen *Acetobacteraceae, Enterococcus* spp., *Bacillus* spp. cinsi bakterilere rastlandığı bildirilmiştir (Anderson vd., 2011). Son yıllardaki çalışmalarda ise bakteriyel taksonomik birimin çoğunluğunun (>%95) beş filuma, yani *Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes* ve *Proteobacteria*'ya ait olduğu belirtilmiştir. Özellikle *Proteobacteria* ve *Firmicutes* ailesine ait bakterilerin ön plana çıktığı görülmüştür (Ghosh vd., 2022; Ben-Miled vd., 2023b). Arı ekmeğinde tespit edilen bir diğer filum Acidobacteria olmuştur, aynı çalışmada *Pseudomanas* spp., *Lactobacillus* spp., *Serratia* spp., *Bacillus* spp. ve *Sphingomonas* spp. cinsi bakteriler bulunurken, bakterilerin önemli bir kısmının cins düzeyinde tespit edilemediği belirtilmiştir (Y. Wang vd., 2023).

Şimdiye kadar tespit edilen bakteriler arasında *Enterococcus durans, Apilactobacillus kunkeei, Lactiplantibacillus plantarum, Apilactobacillus apinorum, Lacticaseibacillus helsingborgensis, Lactobacillus kimbladii, Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis, Lacticaseibacillus kullabergensis, Weissella paramesenteroides, Fructilactobacillus fructosus, Levilactobacillus brevis, Limosilactobacillus mucosae* olmak üzere *Bifidobacterium* spp., *Acinetobacter* spp., *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Oenococcus* spp.ve *Carnimonas* spp. cinsine ait türler bulunmaktadır (Barta vd., 2022). Kahraman-Ilıkkan (2023) tarafından yapılan bir başka çalışmada arı ekmeğinde ağırlıklı olarak *Lactobacillaceae* olmak üzere *Oscillospiraceae* (*Hungateiclostridiaceae*), *Bacteroidaceae* ve *Prevotellaceae* ailelerine ait bakteri suşlarına rastlanmıştır. Örneklerde *Lactobacillus delbrueckii* ile *Faecalibacterium prausnitzii* gibi probiyotik özellikteki bakteriler tespit edilmiştir. Kovan ve arı mikrobiyotası kaynaklı bakterilerin yanı sıra, yeni nesil probiyotik olarak tanımlanan *Akkermansia muciniphila* da ilk kez bu çalışmada tespit edilmiştir. 2023 yılında arı emeğinin farklı katmanlarında yapılan incelemede gen dizilimi sonuçlarına göre *Bartonella apis, Megalopta genalis, Frischella perrara, Gilliamella apicola, Lactobacillus kunkeei* türleri ile *Pantoea* spp., *Bdellovibrio* spp., *Aquabacterium* spp., *Exiguobacterium* spp., *Microvirga* spp., *Pelomonas* spp., *Patulibacter* spp., *Geobacillus* spp., *Myroides* spp., *Metallobacterium*

spp. ve *Melissoccus* spp. cinsine ait türler tespit edilmiştir. Bu farklı bakterilerin arıların sindirim sistemi ve çevreden toplanarak gelen arı poleni ile nektar kaynaklı olduğu bildirilmiştir (Y. Wang vd., 2023).

Arı ekmeğinin sahip olduğu fungal mikrobiyotada *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp. ve *Zygosaccharomyces* spp. cinsine ait mayalar gözlemlenmiş olup, oluşum ve depolama sürecinde farklı mayaların ortamı domine ettiği belirtilmiştir (Janashia vd., 2018). Taze ve olgunlaşmış arı ekmeğinin değerlendirildiği bir başka çalışmada; tanımlanan 252 izolatın çoğunun *Starmerella* spp., *Metschnikowia* spp. ve *Zygosaccharomyces* spp. cinslerine ait olduğu bildirilmiştir. Taze arı ekmeğinde *Starmerella* spp. cinsi mayalar, olgun arı ekmeğinde ise *Zygosaccharomyces* spp. cinsi mayaların ortamda hakimiyet kurduğu ifade edilmiştir (Detry vd., 2020). Arı ekmeğinde *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Curvularia* spp., *Eupenicillium* spp., *Fusarium* spp., *Gibberella* spp., *Mucor* spp., *Penicillium* spp., *Pestalotiopis* spp. ve *Rhizopus* spp. gibi küflerin varlığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Tanımlanan türler arasından baskın türlerin *Cladosporium* spp., *Aspergillus* spp. ve *Penicillium* spp. olduğu bildirilmiştir (Gilliam vd., 1990; Sinpoo vd., 2017).

Gıda teknolojisi açısından değerlendirildiğinde; bu çeşitli mikrobiyotanın içerisinde arı ekmeğinin oluşum sürecinde yer alan bakterilerin ön plana çıktığı ifade edilmektedir. Fermentasyon; kovandaki belli bir nem içeriğinde ve anaerobik koşullarda kolonileşen mikroorganizmaların, özellikle LAB'ın ortaya çıkarak görevini yerine getirmesi ve kaybolması şeklinde ilerlemektedir. Aynı zamanda arı salgıları ile gelen enzimler aracılığıyla gerçekleşen biyokimyasal proses ile dönüşüm tamamlanmaktadır. Arı polen fermentasyonunun ortalama 15 günde gerçekleştiği ve olgunlaşarak arı ekmeğine dönüştüğü belirtilmektedir. Fermentasyonun LAB, indol üreten bakteriler (*Escherichia* spp.), aerobik bakteriler ve mayaların gelişimi ile başladığı, sonrasında anaerobik LAB'ın (*Streptococcus* spp.) bakteri ve mayalar tarafından oluşturulan besin maddelerini kullanarak pH'ı düşürdüğü bildirilmektedir. *Streptococcus* spp. cinsi bakterilerin azalması ve bazı mayaların kaybı sonucunda ortamda *Lactobacillus* cinsi bakterilerin hâkim olduğu vurgulanmaktadır (Barta vd., 2022).

Arı ekmeğindeki bu dönüşümün 15 gün ile sınırlı kaldığını düşünmek doğru olmayacaktır. Dönüşüm oldukça karmaşıktır ve birçok farklı yönden ilerlemektedir. Mikroorganizmaların aktivitesi sonucu ortam pH'sı değişirken aynı zamanda arı poleni yapısı değişmekte, parçalanma reaksiyonları sonucu yeni ürünler oluşmakta, eş zamanlı olarak enzimatik prosesler gerçekleşmektedir. Örneğin, *Lactobacillus* spp. cinsi bakteriler ile ortam pH'sı düşürülerek patojen mikroorganizmaların gelişiminin kısıtlandığı, ayrıca *Pseudomonas* spp. ve *Saccharomyces* spp. cinsleri ile arı poleninin sahip olduğu koruyucu kılıfın degradasyonunun gerçekleştirildiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Pain ve Maugenet, 1966). *Bacillus* spp. cinsi bakterilerin de lipitlerin, karbonhidratların ve proteinlerin parçalanmasını katalize eden enzimleri salgıladığı arı ekmeği oluşumunda rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Gilliam vd. 1985;1990). *Lactobacillus* spp. ve *Bifidobacterium* spp. cinsine ait türlerin arıların mide salgısı ile arı ekmeğine transfer edildiği ve fermentasyonda aktif görev aldıkları ifade edilmiştir (Vásquez ve Olofsson, 2009). *Lactobacillus* spp. ve *Bifidobacterium* spp. cinsi bakterilerin ürettiği bakterisidal maddeler, karbonhidratlar ve laktik asit sayesinde *Clostridium difficile, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes* ile *Escherichia coli, Campylobacter jejuni* gibi bazı Gram-negatif bakteri suşlarının gelişiminin sınırlandırabileceği belirtilmiştir. Ayrıca *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp., *Klebsiella* spp. bakteriler ile *Candida* spp. cinsine ait maya türlerinin gelişiminin inhibe edilebileceği bildirilmiştir (DeGrandi-Hoffman vd., 2016; Kieliszek vd., 2018).

Fermentasyon sürecinin izlendiği bir çalışmada 15. günde *L. plantarum, L. kunkeei, Fructobacillus fructosus, L. lactis, Leuconostoc citreum* ve *L. curvatus* tespit edilmekle birlikte 30. gün örneklerinde yalnızca *L. kunkeei* ve *F. fructosus* gözlemlenebilmiştir (Di Cagno vd., 2019). *L. kunkeei* gibi aside dayanıklı ve ozmotolerant bakteriler ile kovana özgü *Parasaccharibacter apium* gibi bakterilerin arı ekmeği üzerinde varlığını sürdürebildiği belirtilmiştir (Anderson vd., 2014). Ortamdaki asit artışının fermentasyonun başlangıç aşamasında ortamda bulunan Enterobacteriaceae familyasına ait bakterilerin (Shiga-toksin üreten *E. coli, Panteoa, Pseudomonas* spp.) sayısında azalmaya eden olduğu, buna karşın *Acinetobacter* spp. cinsi bakterilerin koşullara uyum sağladığı bildirilmiştir (Disayathanoowat vd., 2020).

Enterococcus türleri toprak, su, bitki yüzeyi ve arıların bağırsak mikroflorasında yaygın olarak bulunmaktadır. Arıların polen toplarken çevreden taşıdığı bu bakterilerin peteklerde depolanan arı poleninde kolonize olarak fermentasyon sürecine katıldığı bilinmektedir. Belhadj ve diğerleri (2009) tarafından yürütülen bir çalışmada arı polen örneklerinden toplam 90 LAB izolatı elde edilmiş ve bu izolatlar fenotipik özelliklerine göre sınıflandırılmıştır. İzolatların %52,2'sinin *Enterococcus* cinsine ait türlerden oluştuğu bildirilmiştir. Özellikle *E. faecalis* suşları baskın tür olarak belirlenmiş; toplamda 38 izolat *E. faecalis,* 8 izolat *E. faecium* ve 1 izolat *Enterococcus* spp. olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, izole edilen *bazı Enterococcus* suşlarının, özellikle *Enterococcus* spp. PS2B01 örneğinin, *Salmonella* Typhi, *E. coli, S. aureus* ve *B. cereus* gibi patojen mikroorganizmalara karşı anlamlı düzeyde antimikrobiyal aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Elzeini ve diğerleri (2021) tarafından yürütülen bir çalışmada, *Apis mellifera L.* türü bal arılarının bağırsak mikrobiyotası incelenmiş ve izole edilen laktik asit bakterileri tür düzeyinde tanımlanmıştır. 50 işçi arıya ait bağırsak örneklerinden elde edilen izolatlar *E. faecalis* MG890204, *E. faecalis* KX073783, *E. faecalis* EU594564, *Lactobacillus brevis* ve *Lactobacillus casei* olarak belirlenmiştir. İzole edilen enterokokların, özellikle *E. faecalis* EU594564 suşunun, üç farklı patojen bakteriye karşı (*Staphylococcus aureus, Salmonella* Typhimurium ve *E. coli* O157:H7) yüksek düzeyde antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçların, *E. faecalis*'in arı bağırsak mikrobiyotasında sadece kommensal bir mikroorganizma olarak değil, aynı zamanda potansiyel bir biyokoruyucu ajan olarak da değerlendirilebileceği vurgulanmıştır.

Arı ekmeğinin bakteri ve fungusları içeren mikrobiyal ekosistemi hakkındaki bilgilerimizde hala önemli boşluklar mevcuttur. Bu mikroorganizmaların bir arada bulunma şekilleri, olgunlaşan üründeki rolleri ve mikrobiyal bozulmayı önleyici etkileri yeterince aydınlatılmamıştır. Arı ekmeğine ait mikrobiyotanın hem arılar hem de insanlar için hayati bir öneme sahip olduğu düşünülmektedir. Eldeki veriler, nektar ve arı poleni gibi hammaddelerden arıların sindirim sistemine kadar uzanan farklı kaynakların mevcut ekosistemin çeşitlenmesindeki temel unsurlar olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu mikrobiyal ekosistemde ortaya çıkan antimikrobiyal ajanların, arı ve insan sağlığı üzerinde söz sahibi olabilecek etkileri bulunmaktadır.

Antimikrobiyal ajanlar mikroorganizmaların yaşamsal rekabette kullandıkları temel silahlardandır. Mikroorganizmalar farklı yöntemler kullanarak birbirlerinin hücresel işlevlerini hedef alarak hayatta kalırlar. Arı ürünlerinin mikrobiyotasını oluşturan mikroorganizmalar tarafından üretilen sekonder metabolitler arasında; antimikrobiyal peptitler, bakteriyosinler, yüzey aktifleştiriciler, sideroforlar, proteolitik ve hücre duvarı yıkıcı enzimler yer almaktadır (Pełka vd., 2021). Bu bileşenler sayesinde arı ekmeği farmasötik ürünler için iyi bir hammadde olma potansiyeli taşımaktadır. Gelecekte arı ekmeğinden izole edilen mikroorganizmalar ve antimikrobiyal ajanlar ile inovatif ürünler tasarlanabileceği öngörülmektedir.

2.2. Probiyotikler

Probiyotikler yeterli miktarda kullanıldığında konağa sağlık açısından fayda sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (Terpou vd., 2019). Bu canlılar fermente ürünlerin beslenme ve tedavi amacıyla kullanıldığı eski çağlardan beri hayatımızın ayrılmaz bir parçasıdır. Günümüzde bağırsak ve vücut sağlığının korunması, bağışıklığın güçlendirilmesi ve hastalıklarla mücadelede gösterdikleri olumlu etkiler sebebiyle probiyotiklerden yararlanılmaktadır.

2.2.1. Probiyotiklerin tarihçesi

Probiyotik terimi, etimolojik olarak, Yunanca "pro-bios" kelimesinden gelmektedir ve "yaşam için" anlamı taşımaktadır. Bilimsel olarak 1899 yılında anne sütü ile emzirilen çocuklarda *Bifidobacterium* spp. tespiti ve bebek ishal vakalarına fayda görülmesi ile keşfedildiği bilinmektedir. 1907 yılında bağırsak florasının yararlı mikroorganizmalarla değiştirilmesinin sağlığa faydalı olabileceği hipotezinin geliştirilmesi, yine 1930'larda bağırsak bakterilerinin sindirimde hayatta kalabildiğinin gösterilmesi bu canlıların keşfi açısından önemli adımlardır. 2000'li yıllarda Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü ve Dünya Sağlık Örgütü'nün (FAO/WHO) probiyotikleri tanımlaması ve kılavuz hazırlaması bu konudaki çalışmaları hızlandırmıştır (Mishra ve Acharya, 2021).

2.2.2. Probiyotik olarak bilinen mikroorganizmalar

Her geçen gün yeni probiyotiklerin keşfedilmesi sağlık alanındaki gelişmelere ve fonksiyonel beslenmeye katkı sağlamaktadır. Günümüzde çok çeşitli ve yeni nesil probiyotik olarak tanımlanan birçok mikroorganizma bulunmasına rağmen *Lactobacillus* spp. ve *Bifidobacterium* spp. cinsine ait bakteriler probiyotiklerin öncüleri olarak kabul edilmektedir. Bu bakteriler insan bağırsağında önemli bir popülasyona sahiptirler. Asidik koşullarda hayatta kalma ve bağırsak epiteline tutunma kabiliyetleri yüksek olan *Lactobacillus acidophilus, L. rhamnosus, L. bulgaricus, L. reuteri, L. casei, L. johnsonii, L. pantarum* gibi türler en yaygın kullanılan probiyotik *Lactobacillus* spp. cinsine ait türlerdir. En sık rastlanan probiyotik *Bifidobacterium* spp. cinsine ait türler ise *B. animalis, B. bifidum, B. breve, B. infantis, B. lactis, B. longum* örnek verilebilir. Ayrıca *Streptococcus thermophilus, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Pediococcus* spp. gibi bakteriler ve *Saccharomyces boulardii* ile *Saccharomyces cerevisiae* gibi mayalar da probiyotik özellikler sergilemektedirler (Stavropoulou ve Bezirtzoglou, 2020).

2.2.3. Probiyotik kaynaklar

Probiyotiklerin ilk kaynağı bağırsak mikrobiyotası ve ağırlıklı olarak süt ürünleri olmuştur. İnsan mikrobiyomu hakkındaki bilgi birikimi arttıkça, mikroorganizmaların izolasyon ve tanımlama çalışmaları kolaylaştıkça gelecek vadeden yeni probiyotik organizmalar keşfedilmiştir. İnsan bağırsağından izole edilmiş *Roseburia intestinalis, Faecalibacterium prausnitzii, Eubacterium* spp., *Bacteroides* spp. ve *Akkermansia muciniphila* bunlara örnektir. Bu mikroorganizmaların bütirat, propiyonat gibi biyoaktiflerin üretimiyle, *Lactobacillus* spp. ve *Bifidobacterium* spp. bakterilerinin sunamadığı bazı fizyolojik faydalar sergiledikleri gösterilmiştir (Cunningham vd., 2021). Bu türleri endüstriyel olarak uygun probiyotiklere dönüştürmek ciddi iş yükü ve maliyet gerektirmekte bu nedenle süreç uzamaktadır. Ancak, *A. muciniphila* yeni nesil probiyotik konusunda umut vadeden adaylardan biridir (Cani ve de Vos, 2017). Yeni nesil probiyotik araştırmalarında ürogenital sistem, ağız boşluğu, nazofarenks ve cilt

bölgeleri bu mikroorganizmaların izolasyonu için yeni alanlar olarak belirlenmiştir (Cunningham vd., 2021).

Probiyotiklerin insan bağırsakları ve mukozal yüzeyleri dışında izole edilebildiği kaynaklar arasında anne sütü ve domuz, sıçan, kümes hayvanları da dahil olmak üzere birçok hayvan türünün bağırsakları bulunmaktadır. Ayrıca karides gibi su canlıları ve balıkların bağırsaklarından probiyotikler izole edilebilmiştir (Ringø vd., 2022). Son yıllarda *A. mellifera* cinsi arı bağırsağından izole edilen *L. johnsonii* CRL 1647'nin bal arısı kolonileri üzerinde olumlu bir etki sergilediği gösterilmiştir (Carina Audisio vd., 2011).

Probiyotiklerin bir diğer önemli kaynağı fermente gıdalar olmuştur. En bilinen kaynakları arasında yoğurt, kefir ve peynir gibi fermente süt ürünleri yer almaktadır. Buna ek olarak; bira, ekşi mayalı ekmek, zeytin ve turşu gibi fermentasyonla üretilen gıdalar da iyi birer probiyotik kaynağıdır (Anandharaj vd., 2014). Ayrıca miso, tempeh, kimchi, kombucha, natto gibi farklı ülkelere özgü geleneksel fermente ürünler de probiyotikler yönünden oldukça zengindir. Son yıllarda yapılan araştırmalar, probiyotiklerin süt ürünü dışındaki gıdalarda da bol miktarda bulunduğunu göstermiştir. Bu gıdalar arasında soya bazlı ürünler, tahıllar, baklagiller, lahana, darı, sorgum gibi bitkiler bulunmaktadır (Syngai vd., 2016). Oluşum sürecinde fermentasyona uğrayan arı ekmeği de bu alternatif kaynaklar içerisinde yer almaktadır. Yeni probiyotiklerin keşfi için niş bir gıda ve sıra dışı bir kaynak olacağı düşünülmektedir.

2.2.4. Probiyotiklerin özellikleri

Probiyotikler insan ve hayvanlarda sağlık üzerine olumlu etkileri ile bilinen canlılardır. Bu mikroorganizmaların konağa zarar vermemeleri ve teknolojik işleme süreçlerine dayanıklı olmaları gerekmektedir. Probiyotik özellikler birkaç başlık altında değerlendirilmektedir. Birincisi, probiyotik suşun insan vücudu için güvenli olması gerekliliğidir. İkinci koşul ise probiyotik suşun sağlık yararlarına yönelik kanıtlı etkilerinin bulunmasıdır. Beklenen faydanın sergilenebilmesi için yeterli sayıda olmalı, sindirim sisteminde dayanıklı kalmalıdır. Son olarak, probiyotik suşun stabilitesi ve

üretim sürecinde kolaylıkla işlenebilir olması gerekmektedir. Tüm bu kriterler, etkili ve güvenilir probiyotik suşlarının seçilmesinde önemli bir rol oynamaktadır ve bu kriterlerin dikkatlice değerlendirilmesi probiyotik preparatların ve gıdaların başarıyla üretilmesine yardımcı olmaktadır.

2.2.5. Probiyotiklerin sağlık üzerine olumlu etkileri

Sağlığın korunması ve hastalıkların önlenmesinde insan bağırsağındaki mikrobiyomun etkisi her geçen gün daha iyi anlaşılmaktadır. Bağırsak mikrobiyotasındaki dengenin bozulması ile inflamatuar bağırsak hastalığı, irritabl bağırsak sendromu, obezite gibi hastalıkların ortaya çıktığı görülmektedir. Hatta bu dengesizliğin ilerleyen süreçte diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve hatta bazı kanser türlerinin oluşumunda rol oynadığı düşünülmektedir. Bu bağlamda probiyotiklerin bağırsak mikrobiyotasının dengesini koruyarak gastrointestinal sistem sağlığını iyileştirdiği bilinmektedir. Ayrıca immün yanıtı düzenleme, inflamasyonu azaltma ve enfeksiyonlara karşı koruyucu etki gibi çeşitli mekanizmalar aracılığıyla genel sağlığı olumlu yönde etkilediği kanıtlanmıştır.

Son yıllarda yapılan araştırmalar probiyotiklerin bağırsak sağlığının ötesinde mental sağlık, cilt hastalıkları ve alerjiler gibi farklı alanlarda kullanılabileceğini ortaya koymuştur. Probiyotiklerin beyin fonksiyonlarını etkileyerek depresyon ve anksiyete gibi mental bozuklukların tedavisinde yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Hatta bu probiyotikler “psikobiyotik” olarak tanımlanmıştır (Misra ve Mohanty, 2019). Ayrıca atopik dermatit ve alerjik rinit gibi alerjik hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde de probiyotiklerin faydalı olabileceğine dair umut verici bulgular elde edilmiştir (Rather vd., 2016; Luo vd., 2022).

Das ve diğerleri (2022) yayınladıkları çalışmada probiyotiklerin günümüze kadar ortaya konan yararlarını yirmi beş farklı başlık altında toplamışlardır. Probiyotiklerin sahip olduğu biyoaktif özellikler; epitel bariyerinin güçlendirilmesi, rekabetçi etkiler oluşturma, antimikrobiyal madde üretimi, immünomodülatör etki, çeşitli reseptörler üzerine olumlu etkiler ile bağırsak sağlığının korunması, laktoz intoleransının

azaltılması, ishal tedavisi ve inflamatuar bağırsak sendromunun önlenmesi şeklinde sıralanmıştır. Bağırsak sağlığı dışındaki etkiler kısa zincirli yağ asidi üretiminin artışı, mide ülseri tedavisi, kanser, karaciğer hastalıkları ve ürogenital enfeksiyonların önlenmesi, gıda alerjileri, obezite yönetimi, hipo-kolesterolemik etki ve ağız sağlığının korunması şeklinde devam etmiştir. Bu bulgulara ek olarak probiyotiklerin vücuttaki kalsiyum dengesinin korunmasına yardımcı olduğu, yaşa bağlı kemik erimesinin yavaşlatılmasına katkı sunduğu, ayrıca gastrointestinal sistemde yerinde vitamin üretme potansiyeline sahip oldukları rapor edilmiştir (LeBlanc vd., 2015; Rizzoli ve Biver, 2020).

Probiyotiklerin sağlık üzerindeki etkilerine ilişkin araştırmalar devam etmektedir. Bu etkileri daha iyi anlamak ve yeni probiyotik suşların potansiyel faydalarını ortaya çıkarmak için multidisipliner yaklaşımlar gereklidir. Şimdiye kadar elde edilen veriler probiyotiklerin sağlıklı olma halinin devamı için kıymetli bir kaynak olduğunu göstermektedir.

2.2.6. Probiyotiklerin güvenilirliği

Probiyotiklerin sağlık üzerine olumlu etkileri açıkça görülmektedir fakat bu mikroorganizmaların sağlık üzerindeki olumsuz etkileri de değerlendirilmeli ve olası güvenlik problemleri karakterize edilmelidir. Probiyotiklerin günlük hayatımıza girmesi ilk defa fermente gıdalar ile olmuş ve gıda matriksinin içinde diğer birçok bileşenle birlikte tüketilmişlerdir. Bu nedenle açıkça bir sağlık riski ile ilişkilendirilmemiş, mevcut riskler üzerine çalışmalar kısıtlı kalmıştır. Sağlık üzerine olumlu etkilerinin belli bir sayıda ve bazı suşların etkileşimi ile arttığı görüldüğünde ise hedefe yönelik preparatlar ve takviyeler üretilmeye başlanmıştır. Bu durum probiyotiklerin olası risklerinin değerlendirilmesini ve probiyotik ürünlerin üretim süreçlerinin kontrolünü gerekli kılmıştır.

Güvenlik bir mikroorganizmanın probiyotik olarak tanımlanması ve kullanılması için en önemli parametrelerden olmuştur. Güvenlik değerlendirmesi için evrensel olarak kabul edilmiş tek bir yaklaşım bulunmamakla birlikte Avrupa Birliği (EFSA-QPS

kriterleri), Dünya Sağlık Örgütü (FAO/WHO) ve ülkelerin düzenleyici kuruluşları probiyotiklerin güvenliğini değerlendirmeye yönelik farklı kılavuzlar sunmaktadır. Bu kılavuzlarda güvenlik değerlendirmesinin ilk adımı olarak suşun tanımlanması, sonrasında antibiyotik direnç gibi *in-vitro* testler, hayvan modelleri üzerinde translokasyon ya da enfeksiyon oluşturma potansiyellerinin değerlendirilmesi yer almaktadır. Yapılan genomik tarama ile virülans ve antibiyotik direnç genlerinin varlığının araştırılması da gizli risk faktörlerinin erken tespitini sağlamaktadır (Pradhan vd., 2020).

Antibiyotik direnci güvenilir probiyotiklerin seçiminde önemli bir adımdır. Direnç, bakterinin doğal yapısının bir parçasıysa kromozomal kodludur, yatay olarak aktarılamaz ve patojen olmayan bakterilerde risk oluşturmaz. Buna karşılık, "edinilmiş" direnç ise antibiyotiğe normalde duyarlı türler arasında bulunur ve bakteriler arasında yayılabilir. Probiyotiklerdeki antibiyotik direncinin asıl endişe verici yönü, canlının bağırsak ortamında bu direnci patojen mikroorganizmalara aktarabilme potansiyelidir. Bu nedenle probiyotiklerin seçiminde aktarılabilir antibiyotik direnç belirteçlerinin varlığı aranmalıdır (Colautti vd., 2022).

Probiyotiklerde virülans gen taraması güvenlik için yapılabilecek bir diğer kontroldür. Hemolitik aktivite patojenlerde görülen yaygın bir virülans faktörüdür, mikroorganizmaya demir sağlarken konakta anemiye neden olabilir. Bu nedenle probiyotiklerin seçim sürecinde hemolitik aktivite gözlemlenebilir (Pradhan vd., 2020). Aynı zamanda probiyotiklerin oluşturduğu biyojen aminler ve diğer zararlı metabolik enzimler de test edilebilir (Barbieri vd., 2019). Özellikle yeni nesil probiyotik olarak tanımlanan suşların kullanımı söz konusu olduğunda güvenliklerinin titizlikle incelenmesi gerekmektedir. Yeni probiyotik suşların güvenliği, güvenli olduğu kanıtlanmış bilindik suşlarınkine eşdeğer olmalıdır.

2.2.7. Probiyotiklerin karakterizasyonu

Probiyotiklerin doğru bir biçimde karakterize edilebilmesi için öncelikle suşun tanımlanması ve isimlendirilmesi gerekir. Hangi cins ve türe ait olduğu ve bu türün alt türlerinin varlığı söz konusu ise, ayrıca alt türü de belirtilmelidir. Bazı probiyotik etkilerin suşa özel olabileceği göz önünde bulundurularak suşun tam tiplendirmesi yapılmalıdır.

Tanımlama amacıyla kullanılacak yöntemler mikroorganizmaya göre değişmekte ancak fenotipik tekniklerin tek başına yetersizliğinden dolayı günümüzde moleküler yöntemler yaygın olarak tercih edilmektedir. İyi bilinen ve güvenilir yöntemlerden 16S ribozomal DNA dizilimi ve MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time of Flight Mass Spectrometry) kullanılarak türler tespit edilmektedir. Elde edilen dizinin, bilinen tüm bakteriyel çeşitliliği kapsayan geniş referans veri tabanları ile eşleştirilmesi başarılı sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır. Suş tanımlamasının daha kapsamlı yapılabilmesi için tam genom dizilimi kullanılabilmektedir. Bu yöntem probiyotiğin güvenilirlik açısından risk faktörlerinin değerlendirilmesini kolaylaştırmaktadır. Multi-lokus sekans tiplemesi (MLTS) veya pulsed-field gel elektroforezi (PFGE) gibi yöntemler bireysel suşların karşılaştırılmasına olanak tanımaktadır (Binda vd., 2020).

2.2.8. Probiyotiklerin üretimi

Probiyotiklerin üretim süreci birkaç aşamadan oluşmaktadır. İlk aşama fermentasyondur ve mikroorganizmaların üretimi için oksijen düzeyi, pH ve sıcaklık gibi parametreler ayarlanarak optimum çoğalma koşullarının sağlanması şarttır. Fermentasyon sonrası oluşan probiyotik biyokütlenin yoğunlaştırılması gerekir. Bunun için santrifüj yönteminin yanı sıra günümüzde membran filtrasyon tercih edilmektedir. Kullanılan yöntemin probiyotiğe zarar vermeyecek şekilde olmasına özen gösterilmelidir. Biyokütleyi oluşturan hücrelerin korunması amacıyla kriyoprotektanlar kullanılabilmektedir. Bunlar membranı stabilize ederek hücrelerin canlı kalma oranını arttırmaktadır. Son olarak biyokütle dondurarak kurutulmakta, uygun partikül boyutuna

sahip ürün eldesi için öğütme ve karıştırma işlemleri yapılmaktadır. Kurutma işlemi sıcaklık ve nem düzeyi göz önüne alınarak optimize edilmelidir (Forssten vd., 2011). Mikroorganizmaların kurutulması için sprey kurutma, vakumla kurutma ve akışkan yatak gibi çeşitli alternatifler bulunmaktadır, hangi yöntemin kullanılacağı genellikle maliyetler göz önünde alınarak belirlenmektedir (Sionek vd., 2023). Tüm aşamalarda hücre bütünlüğünün korunması amaçlanarak işlemler titizlikle ve ideal koşullarda gerçekleştirilmelidir. Kullanılacak ambalajında bu doğrultuda seçilmesi ve raf ömrü boyunca ürünü en iyi şekilde muhafaza etmesi beklenmektedir.

Üretim sürecinde probiyotiklerin farklı su aktivitesi ve oksijen varlığında; ayrıca değişken pH ve sıcaklıklarda hayatta kalabilmeleri gerekmektedir. Starter kültür olarak kullanıldıklarında ya da gıda matriksinin içinde stabilitenin ve fonksiyonel özelliklerin değişkenlik gösterdiği bilinmektedir. Dolayısıyla, probiyotik suşların üretim ve depolama koşulları bu veriler ışığında tasarlanmalı ve süreç sonunda bu canlıların etkinlikleri değerlendirilmelidir (Sionek vd., 2023). Seçilecek mikroorganizmalar uzun süreli depolama sonrasında bile gastrointestinal sistemden geçiş sırasında dayanıklı olmalıdır.

Son yıllarda probiyotiklerin üretiminde mikrokapsülasyon yöntemine sık rastlanmaktadır. Yapılan çalışmalar mikroorganizmaların asit toleransı, safra toleransı, yüzey hidrofobikliği ve enzim aktiviteleri gibi fonksiyonel özelliklerinde önemli bir kayıp yaşanmadığı göstermektedir. Bu yöntemin kurutma işlemi sırasında bakteriyel stabiliteyi sağlama ve depolama sırasında canlılığı koruma konusunda umut verici bir teknoloji olduğu düşünülmektedir (G. Wang vd., 2022).

2.2.9. Ticari probiyotik ürünler

Günümüzde probiyotikler üç farklı kategori altında pazarlanmaktadır. Birinci grup GRAS (Generally Regarded As Safe) statüsünde olduğu iddia edilen ve genellikle fermente ürünlerden oluşan gıdalardır. İkinci grup reçetesiz olarak satılan gıda takviyeleri ve üçüncü grup ise ilaç olarak reçetelenen farmasötiklerdir. Bu

kategorizasyon; üreticilere, ürünlerin kullanım şekline, sağladıkları yarar ve olası risklerine göre düzenleyici otoritelerin hükümlerine dayanmaktadır.

Fermente gıdalar probiyotiklerin temel kaynaklarındandır fakat her fermente ürün probiyotik değildir. Fermente gıdanın probiyotik olarak değerlendirilebilmesi için fermentasyon sırasında probiyotik bakterilerin baskın olmaları ve son üründe canlı kalmaları gereklidir. Probiyotik gıdaları doğal fermentasyon ile üretilenler, starter kültürle zenginleştirilenler ve sonradan probiyotik eklenen fonksiyonel gıdalar şeklinde sınıflandırmak daha doğru bir yaklaşım olacaktır. Piyasada bulunan probiyotik özelliği ile ön plana çıkan gıdalar yoğurt, süt, ayran, kefir gibi süt ürünleri; bunun yanı sıra ülkemize özgü turşu ve boza ile uzak doğuya özgü lahana turşusu kimchi gibi fermente sebzeler olarak sıralanabilir. Fermentasyon teknolojisinin kullanıldığı çoğu üründe starter kültür olarak probiyotiklerden yararlanılmakta böylece probiyotik özellik gösteren yiyecek ve içecekler tasarlanabilmektedir. Ayrıca probiyotiklerin doğrudan ilavesi ile üretilen meyve suları, çikolata gibi atıştırmalıklar ve sporcu gıdaları fonksiyonel gıda pazarında dikkat çeken ürünler olmaktadır.

Probiyotiklerin uygulandıkları bölgede etki gösterebilmeleri için canlılıklarını korumaları ve belli sayıda olmaları (yaklaşık 10^9 kob/mL) gerekmektedir (G. Wang vd., 2022). Gıda takviyeleri bu ihtiyaca uygun ürünler olarak ön plana çıkmaktadır. Takviyelerle yüksek miktarda canlı probiyotik hücre vücutta taşınabilmektedir. Benzer etkinin gıdaların muhafazası ve sindirim sitemindeki engellerden dolayı sağlanması güçtür.

Probiyotikler piyasada toz, tablet, pastil, süspansiyon, vajinal fitil gibi formlarda bulunmaktadır. Yine de hedef bölge genellikle kolon olduğundan dolayı çoğunluğu oral yollarla alınmaktadır. Ağız yoluyla alınacak ürünlerde etki gücü ve stabilitesi daha yüksek olması nedeniyle çoğunlukla kapsüllerden yararlanılmaktadır. Probiyotiklerin aktivitesinin arttırılması ve tüketiminin kolaylaştırılması için çeşitli seyrelticiler, bağlayıcılar, tatlandırıcılar ve kaplama materyalleri kullanılmaktadır (Mishra vd., 2020).

Probiyotikler çoğu ülkede gıda ve diyet takviyeleri başlığı altında takip edilmektedir. Gıda takviyeleri ürüne dair iddiaları itibariyle ilaçlardan farklılaşmaktadır. İlaçların bir hastalığın tedavisinde etkili olduğu iddia edilirken, gıdalar ve besin takviyeleri genel sağlık iddiaları barındırmaktadır. Probiyotik ilaçlar akut diyareyi önlemek veya tedavi etmek, inflamatuar bağırsak hastalığı ve irritabl bağırsak sendromu semptomlarını iyileştirmek ve yenidoğanlarda görülen nekrotizan enterokolit riskini azaltmak için hali hazırda kullanılmaktadır (Y. Wu vd., 2022).

2.2.10. Probiyotiklerin etki mekanizması

Probiyotiklerin sağlık üzerine olumu etkileri farklı mekanizmalar yoluyla gerçekleşmektedir. Bu çok yönlü etkiyi nasıl gerçekleştirdikleri hala tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen, yapılan çalışmalar sayesinde bu alanda ilerleme kaydedilmiş ve etki mekanizmaları birkaç başlık altında toplanmıştır.

Sağlığa yararlı bu bakterilerin epitel bariyerin fonksiyonunu arttırması ve yüksek tutunma kabiliyeti, patojen mikroorganizmaların ortamda varlığını sürdürmesine engel olmaktadır. Probiyotik bakteriler bulundukları yüzeyde mukus üretimini arttırarak zararlı bakterilerin bağırsak epiteline tutunmasını önlerken aynı zamanda salgıları ile ortamdaki klorür ve su dengesini düzenlerler. Sıkı bağlantı sinyalleri göndererek bariyer bütünlüğünü güçlendirmekte ayrıca zararlı bakterilerin neden olduğu hasar sonrası bariyer onarımını teşvik etmektedirler (Syngai vd., 2016). Bağırsak epiteline güçlü bir şekilde yapışarak salgıladıkları bileşenler ile konağın bağışıklık sistemini harekete geçirebilirler. Probiyotikler tutunma sonrasında sitokin ve kemokin gibi bileşenler salgılayarak immün sistemin tetiklenmesini ve bağışıklığın arttırılmasını sağlamaktadır (Syngai vd., 2016).

Probiyotikler patojenlerle sınırlı besin kaynakları için rekabet ederler ve laktik asit üreterek ortamın pH değerini düşürürler (Mousavi Khaneghah vd., 2020). Organik asitler, hidrojen peroksit ve özellikle bakteriyosin adı verilen antimikrobiyal maddeler salgılarlar. Bakteriyosinler mikroorganizmalar tarafından üretilen antimikrobiyal peptitlerdir. En bilinen bakteriyosinler nisin, laktokosin, pediosin, asidosin, enterosin,

enterolizin ve lizostafindir. Etki mekanizmaları değişse de patojen bakterilerin hücre bütünlüğünü bozmak ve biyokimyasal süreçleri durdurmak temel görevleridir, bu sayede konak zararlı mikroorganizmalardan korunmaktadır (Mousavi Khaneghah vd., 2020)

Bağışıklık sisteminin modülasyonu, probiyotiklerin etki mekanizmalarından bir diğeridir. Probiyotikler genellikle fagositoz ve doğal öldürücü hücreleri tetikleme, IgA üretiminin desteklenmesi, sitokin salınımlarının düzenlenmesi gibi farklı yöntemler kullanmaktadır. Örneğin, *Lactobacillus acidophilus* La1'in fagositlerin patojenleri yok etme yeteneğini arttırdığı bildirilmiştir. Aynı etki *Bifidobacterium lactis* Bb12'de de gözlenmiştir (Delcenserie vd., 2008). Benzer şekilde IgA antikorlarının üretimini arttırdıkları gösterilmiştir. Suşa özgü etkileriyle, sitokin salınımını düzenleyerek bağışıklık yanıtlarını etkiledikleri, özellikle laktobasillerin bağışıklığı uyarıcı bifidobakterilerin ise düzenleyici özellikler sergilediği belirtilmiştir (Syngai vd., 2016).

Bakteriler, "Quorum Sensing (QS)" adı verilen bir mekanizma ile kendilerine özgü sinyal molekülleri sayesinde birbirleri ve çevreleriyle iletişim kurarlar. QS sırasında sinyal molekülleri olan otoindüktör (AI) üretilir; bunlar LuxIR tipi (Gram-negatif), Agr tipi (Gram-pozitif), ya da AI-2/LuxS tipi iletişim sistemleri aracılığıyla algılanır (Falà vd., 2022). Yoğunluk arttığında sinyal eşik değeri geçer ve hedef genlerin ifadesi başlatılır, böylece biyofilm, virülans veya spor formasyonu gibi davranışlar senkronize edilir (Yao vd., 2025). Bu mekanizmanın, özellikle patojen bakterilerde virülans faktörleri çoğalttığı (Venturi, 2006), biyofilm oluşumunu arttırdığı (Davies vd., 1998) ve antibiyotik direnç (Cui ve Kim, 2024) üzerinde etkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

Probiyotik *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerinde QS-regülasyon sistemleri, biyofilm oluşumu, stres toleransı, gastrointestinal adaptasyon ve immünmodülasyon üzerinde etkilidir. Özellikle AI-2/LuxS sistemi; suşların adezyon, kolonizasyon ve epitel bariyere tutunmasında kritik rol oynamaktadır (Yao vd., 2025). Ayrıca bazı probiyotik suşlar patojen QS yollarını bozan metabolitler üretmekte, bu sayede gıda bozulmasını ve enfeksiyon riskini azaltmaktadır (Salman vd., 2023). Laktik asit

bakterileri biyofilm oluşumu ve virülans özelliklerin baskılanması gibi yeteneklerinden ötürü patojenlere karşı kullanılmaktadır. *Lactobacillus* türleri tarafından üretilen doğal peptit veya küçük metabolitlerin QS sinyal gidericiler gibi davranarak virülans gen ekspresyonunu azalttığı ve *Staphylococcus aureus* gibi patojenlerde hem biyofilm oluşumu hem de hemolizin gibi virülans faktörlerinin üretimi düşürdüğü belirtilmiştir (Cella vd., 2023). *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. ve *Bacillus cereus* gibi probiyotiklerin salgıladıkları enzimler veya ürettikleri antagonistik maddelerle patojenlerin oto-indükleyicilerini etkisiz kıldıkları bildirilmiştir (Syngai vd., 2016; Salman vd., 2023).

Probiyotiklerin etki mekanizmalarının aydınlatılması bu canlıların sahip oldukları etkilerin ve kullanım alanlarının artmasını sağlayacaktır. Bağırsak sağlığını destekleme, bağışıklık sistemini güçlendirme, sindirim sağlığını iyileştirme ve çeşitli hastalıkların önlenmesindeki rollerinin daha derinlemesine incelenmesi probiyotiklerin potansiyel faydalarını ortaya koyacaktır. Ayrıca yeni uygulama alanlarının ve terapötik yaklaşımların keşfedilmesine olanak tanınacaktır.

2.3. Probiyotik Suşların Belirlenmesinde Kullanılan *In-Vitro* Testler

Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak kullanılabilmesi için; mide asidine ve safra tuzuna dayanıklı olması, bağırsak yüzeyine tutunabilmesi, gastrointestinal sistemde yaşamını devam ettirebilmesi, antimikrobiyal aktivitesinin olması, antibiyotik direncinin olmaması, bağışıklık sistemini uyarması, metabolik etkiler gösterebilmesi, (kolesterol asimilasyonu, laktaz aktivitesi, vitamin üretimi) ve teknolojik süreçlere dayanıklı olması beklenmektedir (Bilginer ve Çetin, 2019). Probiyotik potansiyeli olduğu düşünülen mikroorganizmalar, bahsi geçen tüm inceleme ve değerlendirmeler geçirilerek tüketicinin kullanımına sunulmalıdır.

2.3.1. Antimikrobiyal aktivite

Probiyotik bakterilerde görülen en önemli özelliklerden biri antimikrobiyal aktivitedir. Probiyotik bakteriler ürettikleri organik asitler, enzimler, hidrojen peroksit,

bakteriyosinler ve diğer metabolitler sayesinde antimikrobiyal aktivite sergiledikleri ve patojen mikroorganizmaların çoğalmasını önlemektedir. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen başlıca antimikrobiyal kimyasallar bakteriyosinler, hidrojen peroksit (H_2O_2), laktik asit ve diğer organik asitler ile fenolik bileşikler gibi farklı kimyasal özelliklere sahip metabolik yan ürünlerdir. Bakteriyosinler hedefe yönelik antagonistik aktivite sergilerken, ikinci grup moleküller genellikle rakip türlerin çoğalmasını daha spesifik olarak engelleyen maddeleri içerir. Artan dirençli enfeksiyon etkenlerinin dünya genelindeki artışı göz önüne alındığında, özellikle bakteriyosinler, geleneksel antibiyotiklere alternatif olabilir ve bu nedenle birçok biyomedikal uygulamada kullanılabilirler (Rocchetti vd., 2021). Bir mikroorganizmanın antagonistik etkisinin belirlenmesi amacıyla genellikle disk difüzyon, kuyu difüzyon ve minimal inhibisyon konsantrasyon testlerinden yararlanılmaktadır (Balouiri vd., 2016).

Yapılan çalışmalarla probiyotiklerin antibakteriyel ve antifungal etkileri kanıtlanmıştır ve virüs kaynaklı hastalıklarda tedaviye ek olarak kullanılabileceklerini gösterilmiştir. Farklı probiyotik suşlarının (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp.) *S. aureus'*un gelişimini engelleyebildiği, bazı *Bacillus* spp. cinsine ait türlerin "quorum sensing" mekanizmasını bloke ettiği belirtilmiştir. *Pediococcus acidilactici* HW01'in *P. aeruginosa'*nın hareketliliğini, toksin ve biyofilm üretimini azalttığı tespit edilmiştir (Silva vd., 2020). *L. reuteri, L. rhamnosus GG, Propionibacterium freudenreichii, P. acnes, L. paracasei, L. casei, L. plantarum, L. bulgaricus* ve *L. fermentus'un* metisiline dirençli *S. aureus'ta* biyofilm oluşumunu engellediği gösterilmiştir (Sikorska ve Smoragiewicz, 2013). *L. plantarum* CIRM653'ün *Klebsiella pneumoniae* üzerinde biyofilm oluşumunu engellediği ayrıca *Bifidobacterium longum*'un farelerdeki enfeksiyonunu azalttığı bildirilmiştir. *Lactobacillus* spp. türlerinin *Candida albicans'*ta biyofilm oluşumunu bozduğu ve hif üretimini azalttığı tespit edilmiştir. *Streptococcus salivarius, Enterococcus faecalis* ve *L. plantarum* akne etkeni *P. acnes*'i baskıladığı belirtilmiştir (Silva vd., 2020).

Son yıllarda çeşitli probiyotik suşların hem gıda kaynaklı hem de klinik öneme sahip patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteleri kapsamlı biçimde ortaya konmuştur. Sharma ve Lee (2025) bitkilerden izole edilen laktik asit bakterilerinin geniş

spektrumlu antimikrobiyal etkileri incelendiğinde *Lactobacillus, Leuconostoc* ve *Weissella* gibi suşların, bakteriyosinler, organik asitler ve hidrojen peroksit üreterek *E. coli, Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes* gibi patojenlere karşı inhibisyon sağladığı belirtilmiştir. Sornsenee vd. (2025) tarafından yayımlanan bir araştırmada, fermente palm özütünden izole edilen *L. paracasei* lizatlarının, *E. coli, B. cereus* ve *Acinetobacter baumannii*'ye karşı güçlü inhibitör etki göstererek potansiyel doğal antibiyotik alternatifleri arasında yer aldığı belirtilmiştir. Çiğ süt örneklerinden elde edilen *Enterococcus durans* suşlarının geniş spektrumlu bakteriyosin üretimi ve organik asit salgılamaları sayesinde Gram pozitif patojenlere (ör. *Bacillus subtilis, S. aureus*) karşı güçlü inhibisyon sağladıkları bildirilmiştir (Arafat vd., 2025). Güney Kore'ye özgü geleneksel fermente soya ürününden izole edilen *Enterococcus faecium* suşunun özellikle *Listeria monocytogenes* üzerinde güçlü inhibitör etkiye sahip olduğu ifade edilmiştir. Antimikrobiyal aktivitenin esas olarak yaklaşık 4,6 kDa büyüklüğündeki bakteriyosin (enterosin P ve entorosin Q) üretimine dayandığı vurgulanmıştır (Kim vd., 2023).

İnek sütünden izole edilen *Enterococcus faecalis* suşunun incelendiği bir başka çalışmada, bakteriosin üretimi ile özellikle *Listeria monocytogenes, Prevotella intermedia* ve *Fusobacterium nucleatum* gibi önemli gıda kaynaklı ve periodontal patojenlerin inhibe edildiği gösterilmiştir (Elnar ve Kim, 2025). İnsan kaynaklı bir diğer probiyotik *E. faecalis* suşunun gıda takviyesi olarak değerlendirilmesi konulu bir çalışmada, *Bacillus cereus* ATCC 11778 suşuna karşı dikkate değer antimikrobiyal aktivite sergilediği bildirilmiştir. Aynı çalışmada, *Klebsiella pneumoniae, Salmonella* Typhimurium ATCC 13311, *Salmonella* Paratyphi A ve B, *Proteus vulgaris* ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 gibi yaygın gastrointestinal patojenlerin de inhibe edildiği belirtilmiştir (Tinrat vd., 2018).

Bazı çalışmalar, probiyotiklerin COVID-19 hastalarında ikincil enfeksiyonları önlemeye destek olabileceğini düşündürmektedir. Örneğin, *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* spp. cinsine ait türlerin anti-rotavirüs yanıtını arttırdığı, enfeksiyon süresi ve şiddetini azalttığı belirtilmiştir (Silva vd., 2020).

2.3.2. Antibiyotik direnç

Antibiyotik direnci, halk sağlığı açısından küresel bir tehdit oluşturmaktadır çünkü enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmakta ve enfeksiyona bağlı ölüm oranlarını arttırmaktadır. Antibiyotik direncinin artmasındaki başlıca nedenler arasında gereksiz ve yanlış antibiyotik kullanımı yer almaktadır. Özellikle viral enfeksiyonlarda (soğuk algınlığı, grip gibi) antibiyotik kullanımı, reçetesiz antibiyotik alımı ve hastaların tedaviyi erken kesmesi gibi faktörler, bakterilerin direnç geliştirmesine yol açmaktadır (Lajunen vd., 2023).

Antibiyotik direncin ardındaki bir diğer önemli sebep tarım ve hayvancılıkta kontrolsüz antibiyotik kullanımıdır. Bu durum dirençli bakterilerin gıda zincirine (et, süt, yumurta vb.) dahil olmasına neden olmaktadır. Özellikle çiftlik hayvanlarında yaygın antibiyotik kullanımı, direnç genlerinin bakteriler arasında yayılmasını hızlandırarak, gıda kaynaklı enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmaktadır (Gülmez, 2022).

Antibiyotik direnci; doğal direnç, kazanılmış direnç ve adaptif (geçici) olmak üzere üçe ayrılmaktadır (Bo vd., 2024). Doğal direncin bakterinin genomik yapısından kaynaklandığı ve tür düzeyinde sabit olduğu belirtilmektedir. Buna Gram-negatif bakterilerin β-laktam grubu antibiyotiklere olan direnç örnek verilmiştir (Galgano vd., 2025). Kazanılmış direncin mutasyonlar ya da yatay gen transferi (plazmid, transpozon gibi) aracılığıyla kazanılan yeni genlerden kaynaklandığı ve ciddi klinik sorunlara neden olduğu bildirilmiştir (Blair vd., 2015). Adaptif direncin ise çevresel stres koşullarına (sub-inhibisyonel antibiyotik konsantrasyonu, pH stresi, besin fakirliği vb.) yanıt olarak geçici biçimde geliştiği ve uyarı ortadan kalkınca kalıcılığını yitirdiği görülmüştür (Bo vd., 2024).

Bakteriler antibiyotiklere karşı çeşitli biyokimyasal ve moleküler mekanizmalar geliştirir. En yaygın mekanizmalar arasında ilaç hedefinin modifikasyonu, antibiyotiğin hücre içine alınmasının engellenmesi, efluks pompalarıyla dışarı atılması ve antibiyotiğin enzimatik yıkımı yer almaktadır (Bo vd., 2024). Gram-negatif bakterilerde dış membrandaki porin kanallarının azalması ya da modifikasyonu antibiyotik girişini

kısıtladığı, özellikle 3. nesil sefalosporinlere fenotipik direnç oluşturduğu belirtilmektedir (Galgano vd., 2025). *E. coli* ve *K. pneumoniae* klinik izolatlarında yapılan bir çalışmada, %90'a yakın olguda ese porin bozukluğu saptandığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada fluks pompa sistemlerinin de antibiyotik birikimini düşürerek ß-laktam, kinolon ve aminoglikozitlere karşı çoklu direnç oluşturduğu, ayrıca ß-laktamaz enzimlerinin antibiyotiği doğrudan inaktive ederek klinik tedavi başarısızlığına yol açtığı ifade edilmiştir (Khalifa vd., 2021).

Bakteriler geliştirdikleri bu direnç mekanizmalarını çeşitli yollarla diğer bakterilere aktarmaktadır. Bunun en yaygın ve bilinen yolu yatay gen transferidir. Antibiyotik direncinin patojen bakteri toplulukları arasında yayılmasını; plazmid, transpozon ve integron gibi mobil genetik elemanlar sağlamaktadır (Bo vd., 2024). Plazmidler, konjugasyon yoluyla geniş konakçı aralığına sahip gen transfer üniteleri olarak, direnç genlerini farklı türler arasında hızla yayabilmektedir (Kumar vd., 2024). Transpozonlar ise genom içindeki farklı lokasyonlara hareket edebilme yetenekleri sayesinde direnç genlerini hem kromozomlara hem de plazmidlere yerleştirerek yatay gen transferini kolaylaştırır (Galgano vd., 2025). Entegre gen kasetleri taşıyan integronlar ise spesifik rekombinasyon mekanizmaları ile direnç genlerini sistematik olarak ekleyebilmekte ve özellikle gram-negatif patojenlerde önemli yayılma modülleri oluşturabilmektedir (Bhat vd., 2023).

Antibiyotik direnci doğru probiyotiğin seçiminde ayırt edici bir güvenlik kriteridir. Laktik asit bakterileri, fermente gıdalarda sıkça kullanılan ve genellikle GRAS statüsünde değerlendirilen mikroorganizmalardır (Plavec ve Berlec, 2020). Ancak bazı LAB türleri çeşitli antibiyotiklere karşı doğal ya da kazanılmış direnç gösterebilmektedir. Örneğin, sito-krom destekli membran transport sisteminin eksikliği nedeniyle streptomisin, gentamisin veya kanamisin gibi ajanlar LAB hücresine yeterince girememekte ve sonuçta doğal dirence neden olmaktadır (Duche vd., 2023). *Lactobacillus* ve benzeri laktik asit bakterilerinde vankomisine karşı doğal direnç görülmektedir. Bunun nedeninin, hücre duvarı peptidoglikan öncüllerinin sentezi sırasında klasik D-Ala–D-Ala yerine D-Ala–D-Lac (depsipeptid) şeklinde modifiye bileşenler olduğu düşünülmektedir. Bu modifikasyon, vankomisinin hedef bölge olan

peptit sonuna bağlanma verimliliğini azalttığı bildirilmiştir (Deghorain vd., 2007). Ayrıca, LAB hücrelerinde aktif efflux pompa mekanizmaları bulunduğu, böylece hücre içi antibiyotik konsantrasyonunu azaltarak pek çok antimikrobiyale karşı sürekli düşük seviyede direnç sağladıkları belirtilmektedir (Pumbwe vd., 2006).

Probiyotiklerin doğal dirence sahip olması bazı koşullarda özellikle istenen bir durumdur. Antibiyotik tedavisine eşlik eden veya tedavi sonrasında uygulanan probiyotiklerde bu türden bir direnç tedavi edilen veya baskılanan mikrobiyota ortamında istenmeyen patojenlerin çoğalmasını engellemek ve mikrobiyal dengeyi sağlamak adına faydalı olabilmektedir. Bununla birlikte, kazanılmış ve mobil direnç genleri içeren suşların kullanılmasından kaynaklanabilecek riskler güvenlik değerlendirmelerini zorunlu kılmaktadır (Zheng vd., 2017).

Probiyotiklerde doğal direnç yanında kazanılmış antibiyotik dirence de rastlanmaktadır. Örneğin *Enterococcus faecium* gibi bazı probiyotik olarak önerilen türlerde, eritromisin veya tetrasilin gibi antibiyotiklere karşı kazanılmış direnç genleri plazmitler üzerinde taşınabildiği belirtilmiştir (Kim vd., 2025). Özellikle kazanılmış direnç genlerinin mobil olması, bu türlerin kullanımı konusunda ciddi güvenlik endişeleri doğurmaktadır. Bu direnç genleri, konjugasyon ve transpozonlar aracılığıyla potansiyel olarak patojen bakterilere aktarılabilir, bu da halk sağlığı açısından endişe yaratmaktadır. Bu nedenle, gıda zincirinde yer alan LAB türlerinin direnç profilleri detaylı şekilde incelenmeli ve güvenlik değerlendirmeleri bu kapsamda güncellenmelidir (Verraes vd., 2013).

Literatürde probiyotik bakterilerde en sık gözlenen antibiyotik direnç türlerinin protein sentez inhibitörlerine (özellikle tetrasiklin ve eritromisin) ve hücre duvarı sentez inhibitörlerine (özellikle vankomisin) karşı olduğu belirtilmektedir. Örneğin, Shahali ve diğerleri (2023) tarafından yapılan sistematik derlemede *Lactobacillus* cinsi probiyotiklerinde en yüksek direnç oranlarının bu üç antibiyotik sınıfında saptandığı; ayrıca buna dair genlerin transfer edilebilir potansiyele sahip olduğu vurgulanmıştır. Gueimonde ve diğerleri (2013) çalışmalarında vankomisine karşı doğal direnç mekanizmalarının, D-Ala–D-Lac modifikasyonu ve 23S rRNA mutasyonları aracılığıyla açıklanabileceğini belirtmiştir. Ayrıca, Imperial ve Ibana (2016) tarafından

vankomisin direnç genlerinin fare sindirim sistemi üzerinden plazmit aracılığıyla probiyotik türler arasında yatay olarak transfer edilebildiği bildirilmiştir.

Antibiyotik direnç profili bir bakterinin güvenilirliği, probiyotik olarak tanımlanması ve kullanılması için doğrulanması gereken özelliklerin başında gelmektedir. Özellikle probiyotik ve gıda kaynaklı bakterilerin direnç genlerini taşıması, bu genlerin patojenlere geçmesine zemin hazırlayabilir. Böyle bir genetik aktarım, antibiyotiklerin etkinliğini daha da düşürebilir. Bu nedenle direnç profillerinin belirlenmesi hem klinik hem de gıda güvenliği açısından elzemdir. Bu amaçla sıklıkla *in-vitro* testlerden yararlanılmaktadır. Ayrıca yapılan genomik taramalar ve *in-vivo* testler ürünün güvenli kullanımı açısından tüketicileri rahatlatmakta ve özellikle yeni nesil probiyotiklerin üretimi için gereklilik arz etmektedir.

Bu yönde kullanılacak suşların, plazmite bağlı kazanılmış antibiyotik direnç genleri bakımından kontrol edilmesi gerekmektedir (Salminen vd., 1998). Antibiyotik duyarlılık testlerinde genellikle disk difüzyon ya da sıvı mikrodilüsyon yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Bu testlerde genellikle klinik açıdan önemli antibiyotikler olan ampisilin, gentamisin, kanamisin, eritromisin, klindamisin, tetrasiklin, vankomisin, streptomisin, kloramfenikol kullanılmaktadır.

Yapılan çalışmalar farklı türlerde seçilen antibiyotik cinsine bağlı olarak direnç özelliklerinde değişim olduğunu ortaya koymaktadır. Örneğin, *Lactobacillus* spp. cinsi türlerin basitrasin, sefoksitin, siprofloksasin, fuzidik asit, kanamisin, gentamisin, metronidazol, streptomisin, sülfadizin ve vankomisine karşı dirençli iken, penisilin ve ampisilin gibi hücre duvarı sentezini inhibe eden antibiyotiklere hassasiyet gösterdikleri bildirilmiştir (Sharma vd., 2014). Aynı çalışmada *Bifidobacterium* spp. suşlarının ampisilin, sefotaksim ve eritromisine duyarlı iken streptomisin ve gentamisine dirençli oldukları, *Lactococcus* spp. cinsi türlerin ise tetrasikline ve eritromisine direnç gösterdikleri vurgulanmıştır. *Enterococcus* spp. suşlarının genel olarak B-laktamlara, sefalosporinlere, linkozamidelere ve polimiksinlere karşı direnç gösterdikleri ayrıca bazı suşlarda tetrasiklinlere, kloramfenikole, penisiline ve ampisiline karşı kazanılmış direnç görülebildiği belirtilmiştir (Sharma vd., 2014).

2.3.3. Safra tuzu ve düşük pH'ya direnç

Bir probiyotik adayının etkinliği öncelikle uygun olmayan koşullarda hayatta kalma becerisiyle doğru orantılıdır. Benzer zorlayıcı şartlar gıda matriksinde tutuklu mikroorganizmalar için de geçerlidir. Gıdalar birçok farklı bileşenden oluşmaktadır, farklı pH ve su aktivitelerine sahiptir. Dolayısıyla probiyotik olarak seçilecek mikroorganizmanın bu koşullarda varlığını uzun süre devam ettirmesi gerekmektedir. Probiyotik suşların belirlenmesinde tuz ve aside direnç mikroorganizmaların teknolojik açıdan kullanışlı ve olası sağlık etkileri bakımından yarayışlı olduğunu göstermektedir.

Probiyotiklerin asidik koşullara dayanıklılığı türden türe önemli ölçüde değişkenlik göstermektedir. Örneğin, *Lactobacillus* spp. suşları genel olarak dirençliyken, *Bifidobacterium* spp. suşlarının asitlere karşı son derece hassas olduğu, pH 2 ve pH 3' te düşük hayatta kalma oranları sergilediği bildirilmiştir (Pereira ve Gibson, 2002). Çeşitli kaynaklardan izole edilen çok sayıda bakteri bu direnç farklılıkları ve dayanıksızlıkları nedeniyle değerlendirmeye bile alınmamaktadır. Lim ve diğerleri (2004) yaptıkları çalışmada, *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp. ve *Bifidobacterium* spp. dahil 100 bakteri suşundan sadece 51 tanesinin pH 2,5' te hayatta kalabildiğini göstermişlerdir.

Benzer şekilde safra tuzuna karşı gösterilen direnç bakterinin türüne ve teste alınan safra tuzu konsantrasyonlarına göre değişmekte, suşlar farklı direnç profilleri sergilemektedir. Birçok *Lactobacillus* spp., *Lactiplantibacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lacticaseibacillus* spp., *Levilactobacillus* spp., *Latilactobacillus* spp., *Ligilactobacillu*s spp., *Weissella* spp. ve *Enterococcus* spp. cinsine ait tür %0,3 safra tuzu konsantrasyonunda sağ kalmayı başarmıştır. Belirli *Lactobacillus* spp. ve *Lactiplantibacillus* spp. suşları %0,5-%1 safra tuzuna tolerans göstermiştir. Bazı *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Lacticaseibacillus* spp. cinsi türlerin seçili suşlarının %1 ve üzeri safra tuzu konsantrasyonlarda bile hayatta kalabildikleri ifade edilmiştir (Ayyash vd., 2021).

2.3.4. *In-Vitro* sindirim modelindeki davranış

Probiyotiklerin yüksek asitlik ve tuz konsantrasyonunda hayatta kalabilmelerinin ötesinde, bu zorlayıcı şartların bir arada bulunduğu bir sistem içinde varlıklarını sürdürebilmeleri ve bunun gözlemlenebilmesi esastır. Beklenen faydanın sağlanabilmesi için, bu canlıların öncelikle gastrointestinal sistemdeki zorlu koşullarda hayatta kalması ve kolonda varlığını sürdürebilmesi gerekmektedir. Mevcut durumun tespiti için, *in-vivo* çalışmaların diğer faktörlere bağlı ve oldukça kompleks yapıda olması nedeniyle *in-vitro* testler tercih edilmektedir.

Bu testler mikroorganizmaların sindirim sisteminde izledikleri yol ve bağırsak ortamının özellikleri göz önüne alınarak tasarlanmaktadır. Farklı pH değerlerine, çeşitli enzimlere ve safra tuzlarına maruz bırakılarak hayatta kalma oranları ölçülmektedir. Bakteriler ilk olarak amilaz ve lizozim gibi sindirim enzimleriyle karşılaşmakta sonrasında midedeki düşük pH ve pepsin gibi güçlü enzimlere maruz kalmaktadırlar. Gram-pozitif bakterilerin lizozime duyarlı olmasına rağmen bazı LAB türlerinin bu enzime karşı daha dirençli olduğu hatta ağız boşluğundaki doğal mikrobiyotanın bir parçası haline gelebilecekleri belirtilmektedir (Pereira ve Gibson, 2002).

Midede yüksek asitliğe maruz kalan bakteriler, bağırsakta safra tuzları ve pankreas enzimleri gibi antimikrobiyal etkiye sahip bileşenlerle de temas ederler. Burada da direnç gösterebilmeleri ve kolonize olabilmeleri için farklı mekanizmalara sahip olmaları gerekmektedir. Safra tuzları hücre zarındaki lipitleri değiştirerek hem hücre geçirgenliğini hem de zarın etrafındaki ortamla etkileşimini etkiler. Bazı LAB türlerinin safra tuzu hidrolaz enzimi salgılayarak safra etkisine karşı dayanıklılık geliştirdikleri bilinmektedir. Ayrıca hücreden safra tuzunun atılması ve hücre duvarında modifikasyon ile gibi başka mekanizmalar da geliştirdikleri belirtilmektedir (Wendel, 2022).

Probiyotiklerin mide ve bağırsak ortamındaki zorluklara direnci bakteri türüne göre farklılık göstermektedir. Bununla birlikte pH 2-5 arasında ve safra tuzu konsantrasyonları %0,3-%2 arasında değişen koşullardaki canlılık probiyotik mikroorganizmaların seçimi için kritiktir (Pereira ve Gibson, 2002).

2.3.5. Otoagregasyon ve hücre-yüzey hidrofobisitesi

Mikroorganizmaların yeterli yoğunla sahip olmaları ve otoagregasyon kabiliyetleri, hücreye tutunmalarını ve baskın şekilde kolonize olmalarını sağlayacağı için probiyotik özellik açısından önemli bir diğer kriterdir. Agregasyon, otoagregasyon ve koagregasyon olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir. Probiyotikler otoagregasyon yetenekleri ile bağırsak epitel hücrelerine tutunabilmekte, koagregasyon yetenekleriyle de patojenlerin kolonizasyonunu önlemektedirler (Keller vd., 2011; Janković vd., 2012). Agregasyon yeteneklerinin belirlenmesinde absorbans ölçümü ile temel koloni oluşumunun incelenmesinin yanı sıra kolon hücre hatlarının kullanıldığı hücre kültürü çalışmaları da kullanılmaktadır (Maragkoudakis vd., 2006; Janković vd., 2012).

Hidrokarbonlara mikrobiyal yapışma, bakterilerin hücre yüzeyi hidrofobikliğini ölçmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu amaçla ksilen, kloroform, etil asetat, hekzadekan gibi hidrokarbonlara tutunum yüzdesi belirlenmektedir. İncelenen probiyotik suşlarda farklı tutunma yüzdeleri ile karşılaşmak mümkündür ve otoagregasyon ile yüzey hidrofobisitesi sıcaklık gibi değişkenlerden de etkilenmektedir. *Bifidobacterium longum* B6, *L. acidophilus* ADH, *L. paracasei, L. rhamnosus* GG, *L. brevis, L. casei, L. mesenteroides* ve *P. acidilactici* isimli probiyotik suşların incelendiği bir çalışmada *Bif. longum* B6 (%53,6) ve *L. rhamnosus* GG (%46,5) görece yüksek hidrofobisite sergilerken, *P. acidilactici* (%10,4) ksilene karşı düşük afinite göstermiştir (H. Xu vd., 2009).

Substrat konsantrasyonu, pH ve sıcaklık bakteri türlerinin otoagregasyonu ve yüzey hidrofobisitesi üzerinde farklı etkiler göstermektedir. Bu kapsamda yapılan bir çalışmada, substrat konsantrasyonu ve sıcaklığın otoagregasyonu artırdığı, asidik ortamdan alkaliye geçişin ise otoagregasyonu azalttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada yüzey hidrofobisitesinin substrat konsantrasyonu ile arttığı, sıcaklık ve pH'ın düşmesi ile azaldığı belirtilmiştir (Muda vd., 2014). Bu bulgular, probiyotiklerin sindirim sisteminde kolonize olma ve işlev görme yeteneklerini etkileyen faktörlerin anlaşılması ve konuya daha derinlemesine bakılmasına olanak sağlamaktadır.

2.3.6. Kolesterol düşürücü etki

Bireylerde görülen yüksek kolesterol, kalp hastalığı ve felç gibi kardiyovasküler komplikasyonların temelini oluşturmaktadır. Kolesterolü kontrol altına tutmak için sağlıklı beslenme, düzenli egzersiz, gerekirse ilaç tedavisi esastır. Yapılan çalışmalar probiyotiklerin kolesterol seviyesinin düzenlenmesinde oldukça başarılı olduklarını göstermektedir. Özellikle belirli *Lactobacillus* türleri içeren probiyotik ürünlerin kandaki yüksek kolesterol seviyelerini azalttığı belirtilmiştir (Khare ve Gaur, 2020). Probiyotik bakterilerin, safra tuzu hidrolizi aktivitesi, 3-hidroksi-3-metilglutaril, koenzim A gibi inhibe edici enzimler üretmeleri ve kolesterol asimilasyonu sayesinde kolesterol seviyesini düşürme potansiyeline sahip oldukları ifade edilmiştir (Alp ve Ertürkmen, 2017). Kolesterol asimilasyonunu sağlayan mekanizma tam olarak belirlenememiştir fakat çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür. Bu mekanizmalar kolesterolün bakterinin hücre duvarına bağlanması ya da kolesterolün bağırsaklardan emilemeyen bir molekül olan koprostanol molekülüne dönüşmesi şeklindedir (Ishimwe vd., 2015).

Probiyotiklerden sağlık üzerine olumlu etkiler göstermesi beklenmektedir, bu nedenle probiyotik olarak tanımlanacak mikroorganizmalarda aranacak ilk parametre sağlık üzerine en az bir pozitif etkiye sahip olmalarıdır. Probiyotiklerin seçim ve tanımlanma süreçlerinde kolesterol düşürücü etkinin *in-vitro* sistemlerle gösterilmesi bu konuda atılacak en kolay ve hızlı adımlardan biridir. Yine de probiyotiklerin diğer faydaları göz önüne alınarak farklı mekanizmalar ve kriterler üzerinden değerlendirme yapılması yararlı olacaktır. Probiyotiklerin sağlık üzerine olumlu etkilerinin günümüzde hala tanımlanamamış kısımları olduğu düşünülmekte her geçen gün probiyotiklerle ilgili yeni keşifler yapılmaktadır.

2.4. Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Potansiyeli

Laktik asit bakterileri toprak, gıdalar, canlıların gastrointestinal sistemi gibi çok farklı kaynakta bulunan ve gıdaların üretiminde sıklıkla kullanılan, ekonomik açıdan önemli mikroorganizmalardır. Laktik asit bakterileri Gram-pozitif ve katalaz negatif özellikte

olup, spor oluşturmayan çubuk ve kok morfolojisine sahip bakterilerdir. *Lactobacillus Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Bifidobacterium* spp., *Vagococcus* spp., *Aerococcus* spp., *Tetragenecoccus* spp., *Weissella* spp. ve *Carnobacterium* spp. en iyi bilinen laktik asit bakterileridir. Organik asitler, diasetil, hidrojen peroksit, etanol, asetaldehit, bakteriyosin ve bazı antifungal bileşenler üreterek gıdaları biyolojik olarak dönüştürmekte ve muhafaza etmektedirler (Enan vd., 2018). Bu özellikleri sayesinde fermente gıdaların üretiminde starter kültür olarak kullanılmaktadırlar.

Laktik asit bakterileri fermente gıda ve içeceklerin üretiminde kritik öneme sahiptir ve insanlık tarihi boyunca bu bakterilerden yararlanılmıştır. Fakat sahip oldukları spesifik sağlık yararlarının ortaya çıkarılmasıyla birlikte bilinilirlikleri ve değerleri bir kat daha artmıştır. Sağlık üzerine olumlu etkileri yanı sıra üretimleri düşük maliyetlidir, işleme ve depolama sırasında canlılığı korurlar, ürünlere uygulaması kolaydır ayrıca üst gastrointestinal geçişte canlı kalma oranları yüksektir (Evivie vd., 2017). Bu özellikleri onları bir numaralı probiyotik mikroorganizma grubu haline getirmektedir.

Lactobacillus spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp. ve *Leuconostoc* spp. cinsine ait türler probiyotik laktik asit bakterileri olarak bilinmektedir. En yaygın kullanılan probiyotik formları *Lactobacillus* spp. ve *Bifidobacterium spp.* cinsine ait türlerdir (Coelho vd., 2022). Günümüzde yaygın olarak kullanılan ilk probiyotiklerin çoğu LAB grubuna aittir. Bunun nedeni, laktik asit bakterilerinin sağlıklı gastrointestinal sisteminin doğal mikrobiyotasının bir parçası olmasıdır.

Laktik asit bakterilerinin hali hazırda insan mikrobiyotasında yer alması mevcut koşullarda hızla üreyerek kolonize olmalarını kolaylaştırmaktadır. Yüzyıllardır gıdalarla birlikte tüketilmeleri ve buna karşın ciddi bir olumsuz etkinin gözlemlenmemiş olması güvenilir olarak nitelendirilmelerini sağlamıştır. Probiyotiklerden beklenen konağa zarar vermemeleri ve teknolojik işleme süreçlerine dayanıklı olmalarıdır. Ayrıca sağlık yararlarına yönelik kanıtlı etkilerinin bulunması gereklidir. Beklenen faydanın sergilenebilmesi için yeterli sayıda olmalı ve sindirim sisteminde dayanıklı kalmalıdır.

Tüm bu sayılan özellikler laktik asit bakterilerinin çoğunda doğal olarak bulunmaktadır. Laktik asit bakterilerinin probiyotik potansiyeli yüksektir, bu nedenle çalışmada arı ekmeğinden elde edilecek olası probiyotik suşun laktik asit bakterilerinden seçilmesi uygun bulunmuştur.

2.5. Arı Ekmeğinin Probiyotik Potansiyeli

Arının cinsi, yetiştirildiği bölge ve botanik köken gibi etkenlerin arı ekmeği mikrobiyotası üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar mikrobiyotadaki çeşitliliği ve probiyotik potansiyeli ortaya koymaktadır. Buna rağmen probiyotik mikroorganizma varlığının incelendiği çalışmalar oldukça sınırlıdır. Literatürde, bazı farklı orijine sahip arı ekmekleri ve belirli bazı mikroorganizma grupları üzerinden veya sadece mikroorganizmaların cins düzeyinde tanımlandığı çalışmalar bulunmaktadır.

Probiyotik potansiyelin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar incelendiğinde özellikle Anadolu arısına ait arı ekmeklerinin kapsamlı bir şekilde incelenmediği görülmüştür. Yapılan çalışmalar aşağıda sırasıyla verilmiştir.

Mathialagan ve diğerleri (2018) tarafından *A. ceranaindica, A. mellifera, A. florea, A. dorsata* ve *T. iridipennis* gibi farklı arı cinslerine ait arı ekmeğinde bulunan potansiyel laktik asit bakterileri incelenmiştir. Çalışmada *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Streptococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Micrococcus* spp. cinsine ait laktik asit bakterilerinin varlığı ve konsantrasyonları belirlenebilmiştir. İzole edilen LAB sayısının $9{,}11x10^5$- $2{,}51x10^6$ kob/mL arasında değiştiği gösterilmiştir. Morfolojik analizde kok (küresel) şekilli bakterilerin baskın olduğu belirtilmiştir. İdentifikasyonda kültürel ve morfolojik özelliklerden yararlanılması sebebiyle sadece cins düzeyinde tanımlama yapılabilmiştir. *Heterotrigona itama* türü iğnesiz arılara ait arı ekmeği örneğinde yapılan bir diğer incelemede moleküler teknikler kullanılarak tanımlama yapılmış ve izole edilen bakterilerin probiyotik potansiyeli değerlendirilmiştir (Mohammad vd., 2020b). İncelenen örneklerde *Bacillus safensis, B. amyloliquefaciens, B. megaterium, B. cereus, B. pumilus, Lactobacillus musae, Lactobacillus crustorum,*

Lb. mindensis, Leuconostoc mesenteroides, Enterococcus faecalis ve *Fructobacillus fructosus* olmak üzere toplam on bir bakteri türü tespit edilmiştir. Bu bakterilerin asit ve safra toleransı, sindirim enzimleri toleransı, otoagregasyonu, hemolitik aktivite, antibakteriyel aktivite ve antibiyotik duyarlılığı gibi probiyotik potansiyelini gösteren parametreleri ölçülmüştür. Çalışmada elde edilen *L. musae* SGMT17 ve *L. mindensis* SGMT22, probiyotik özellikli *L. rhamnosus* GG ile karşılaştırıldığında patojenlere karşı benzer antibakteriyel etkinlik sergilemiştir. *F. fructosus* suşları dışındaki tüm izolatlar pH 3'e ile %0,3 safra, pepsin ve pankreatine karşı yüksek tolerans göstermiştir. *L. crustorum, L. mindensis* ve *L. musae*, suşa bağlı olarak sırasıyla %52,09-%80,52 oranında hidrofobisite ve %57,47- %92,77 arasında değişen otoagregasyon göstermiştir. Tüm suşlar kloramfenikol, ampisilin ve tetrasikline duyarlı bulunmuştur. *L. musae* SGMT17 ve *L. crustorum* SGMT20'nin test edilen probiyotik özelliklere sahip olduğu, böylece hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için nutrasötik bileşikler olarak kullanılma potansiyelinin bulunduğu ifade edilmiştir (Mohammad vd., 2020b).

Arı ekmeğinin fruktofilik laktik asit bakterilerinin (FLAB) varlığı açısından karakterize edildiği bir çalışmada; *Lactobacillus kunkeei, Fructobacillus fructosus, Lactobacillus plantarum* ve *Leuconostoc mesenteroides* suşları tespit edilmiştir. Tüm FLAB suşları yüksek seviyelerde otoagregasyon ve hidrofobiklik özellikleri sergilerken, *L. kunkeei* ve *F. fructosus* suşlarının safra tuzlarını ve düşük pH koşullarını tolere etmediği görülmüştür. FLAB suşları arasında düşük düzeyde bir antibiyotik direnci gözlemlenmiş, öte yandan FLAB suşlarının yüksek düzeyde antibakteriyel ve antifungal aktiviteler sergilediği bildirilmiştir. FLAB suşlarının arı ürünleri üretiminde starter kültür olarak değerlendirilebileceği belirtilmiştir (Ispirli ve Dertli, 2021). Fruktofilik laktik asit bakterileri grubuna ait olan *Apilactobacillus kunkeei* üzerine yapılan bir diğer çalışmada; çeşitli suşların enzimatik profilleri, karbonhidrat asimilasyon modelleri, antibiyotiklere duyarlılık, antimikrobiyal aktivite ve kolesterol asimilasyon özellikleri değerlendirilmiştir. İzole edilen bakterilerin suşa bağlı olarak düşük antibiyotik direnci gösterdiği, belirli patojen bakterileri inhibe etme ve yüksek şeker konsantrasyonlarında yaşama kabiliyeti bulunduğu ayrıca sindirim sisteminde hayatta kalabildiği gösterilmiştir. Test edilen suşların %20 ile %50 oranında kolesterolü düşürdüğü, kolesterol asimilasyon kabiliyetinin suşa bağlı olduğu bildirilmiştir. *A. kunkeei*

suşlarının probiyotik özelliğe sahip meyveli ürünler için kullanılabileceği belirtilmiştir (Vergalito vd., 2020).

Arı ekmeğinden elde edilen *Bacillus* spp. cinsine ait bakterilerin probiyotik potansiyelinin değerlendirildiği bir çalışmada elde edilen suşların antibakteriyel etki gösterdiği bununla birlikte antibiyotik direnç sergiledikleri için detaylı incelenmeleri gerektiği belirtilmiştir. Arı ve arıcılık ürünlerinin probiyotik özellik gösterebilecek *Bacillus* spp. için potansiyel bir kaynak olabileceği iletilmiştir. Aynı çalışmada, *Bacillus* spp. cinsine ait türlerinden bazılarının hemolitik aktivite ve antibiyotik direnci gibi virülans faktörlerini barındırdığını, patojen olmayan *Bacillus* spp. izolatlarının tamamının probiyotik olarak sınıflandırılamayacağı belirtilmiştir (Toutiaee vd., 2022). Bir başka çalışmada 5 arı ekmeği ve 3 arı poleni örneğinden izole edilen 10 adet *Bacillus* spp. suşunun probiyotik potansiyeli değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmenin ilk adımı olarak, izolatların *S. aureus* ve *E. coli* ile olan antagonistik etkileşimleri göz önünde bulundurulmuştur. On suşun içinden, bir adet arı poleni ve iki adet arı ekmeği olmak üzere üç suşta probiyotik potansiyel tespit edilmiştir. Bu suşların insanlar için güvenli kabul edilebilecek özelliklere sahip olduğu, ayrıca safra tuzları ve asit koşullarına dayanıklı oldukları görülmüştür. Ayrıca, bu izolatlar 24 saatlik inkübasyon sonrasında kolesterolün %30'dan fazlasını asimile etmişlerdir. İzolatlar penisiline dirençli olup, dokuz antibiyotiğe karşı duyarlı veya orta düzeyde direnç göstermektedirler. Genom dizileme sonuçlarına dayanarak, arı ekmeğinden izole edilen suşların *B. subtilis* olarak sınıflandığı ve arı poleninden izole edilen suşun *B. velezensis* olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, genom analizleri, bu izolatların çeşitli antimikrobiyal bileşikler, bakterisitler ve ikincil metabolitler üretebileceğini göstermektedir. Bu çalışmanın sonuçları, arı poleni veya arı ekmeğinden izole edilen bazı *Bacillus* spp. suşlarının potansiyel probiyotikler olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır (Pełka vd., 2023; Bin Hafeez vd., 2024).

Letizia ve diğerleri (2022) arı ekmeğinden beş farklı *Lactiplantibacillus plantarum* suşu izole ederek bunların antioksidan, antimikrobiyal ve β-glukozidaz aktiviteleri, ekzopolisakkarit (EPS) üretimi ve GABA sentezleme yeteneklerini değerlendirmiştir. Elde edilen suşların değişen oranlarda antimikrobiyal aktivite sergilediği; bu aktivitenin

organik asitlerin, protein bileşiklerinin veya diğer antimikrobiyal metabolitlerin üretiminden kaynaklandığı belirtilmiştir. Sonuçların *L. plantarum* suşunun iyi EPS üreticileri olduğunu doğruladığı vurgulanmıştır. Ayrıca bu suşlarının GABA'yı sentezleyebildiği iletilmiştir. Bazı LAB suşlarının hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidan kapasiteye sahip olduğu belirtilmiştir. Seçilen *L. plantarum* suşları aralarında önemli bir fark olmaksızın β-glukosidaz aktivitesi sergilemiştir. Probiyotik özellikler açısından potansiyel barındırdıkları ve bu durumun suşa özgü olduğu belirtilmiş, daha kapsamlı incelemelerle ilaç sektöründe ya da fonksiyonel özellik geliştirici gıda mikrobiyal kültürü olarak kullanılabilecekleri bildirilmiştir.

Literatürde yer alan çalışmalar, arı ekmeğinin probiyotik potansiyelini yeterince ortaya koyamamakla birlikte gelecek çalışmalar için temel oluşturmaktadır. Bal, propolis gibi arı ürünlerinden elde edilen izolatların probiyotik potansiyelinin değerlendirildiği çalışmalarda izolatların probiyotik olarak ve fermentasyon amaçlı kullanılabilecekleri belirtilmiştir (Goh vd., 2021; Thacharoen vd., 2023). Mustar ve Ibrahim (2022) tarafından bal arılarının bağırsak mikrobiyotasından izole edilen *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşlarının probiyotik adaylar olarak incelenmesi gerektiği belirtilmiştir. Aynı çalışmada izole edilen *Lactobacillus apis, L. melliventris, L. kullabergensis* ve *Bifidobacterium asteroides, B. polysaccharolyticum, B. choladohabitans* gibi türlerin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu, ayrıca asit ve safra tuzlarına tolerans, otoagregasyon, yüzey hidrofobisitesi gibi probiyotik kriterleri karşıladığı bildirilmiştir. Bu suşların güvenlik değerlendirmelerinde antibiyotik direnç profilleri ve toksin üretimleri incelenmiştir. Güvenlik testlerinden olumlu sonuç veren izolatlar arasında, özellikle yerel arı mikrobiyotasına özgü suşların patojen baskılama kabiliyetlerinin daha fazla olduğu vurgulanmıştır (Mustar ve Ibrahim, 2022).

Özellikle ülkemize özgü *A. mellifera* cinsi arılardan elde edilen arı ekmeğinin bölgemize özgü probiyotik mikroorganizma çeşitliliğine katkıda bulunacağı düşünülmektedir. Tez kapsamında arı ekmeğinden izole edilen suşlar ve çalışma sonucu elde edilen verilerin önemi büyüktür. Çünkü, arı ekmeği süper gıda olmanın dışında mikrobiyolojik açıdan zengin bir ürün ve yeni fonksiyonel gıdalar için niş bir kaynaktır.

2.6. Fermente Bal İçeceği

Bal ülkemizde tarihsel ve kültürel mirasın önemli bir parçasıdır ve günümüzde de sofralardaki yerini korumaktadır. Geleneksel kahvaltıların vazgeçilmezi olmasının yanı sıra doğal tatlandırıcı özelliği sayesinde pek çok yiyecek ve içecekte yer almaktadır. Gıdalarda balın kullanımı, raf ömrünü uzatmak ve tazeliğini korumak için en güvenli ve sağlıklı yollardan biri olmuştur. Ayrıca, soğuk algınlığı, öksürük ve boğaz ağrısı gibi rahatsızlıklarda kişiyi rahatlatması, balın şifa kaynağı olarak kabul edilmesi ve ilaç niyetiyle kullanılmasını sağlamıştır**.** Sağlık üzerine olumlu etkileri, besleyici özelliği, lezzete katkısı ve koruyucu özelliklerinden dolayı antik çağlardan beri insanların önemli besinlerinden biri haline gelmiştir. Bu bağlamda, balın Türk mutfağındaki önemi oldukça büyüktür.

Özellikle Osmanlı döneminde, bal hem yemeklerde hem içeceklerde sıklıkla kullanılmıştır. Osmanlı saray mutfağında en çok tüketilen içeceklerden biri şerbetler olmuştur. Baldan yapılan veya içerisinde bal katılarak hazırlanan içecekler önemli davetlerde ikram edilmiş, çeşitli hastalıkların tedavisinde hastalara reçete edilmiştir. Bu içecekler şerbet ismiyle anılmış, sindirimde olumlu etkisi ile susuzluğu gideren bir içecek olarak tanımlanmıştır. Literatürde sadece bal ve sudan oluşan içeceklere rastlanmıştır. Bu içeceklere limon ve sirke eklenerek tüketimi kolaylaştırılmış ve sağlık üzerine faydaları arttırılmıştır (Atabey, 2023).

Günümüzde bal şerbeti, katkı maddesi içermemesi sebebiyle endüstriyel içeceklere alternatif olarak ev ortamında hazırlanarak hızlıca tüketilmektedir. Bileşenlerinin az olması ve kolay hazırlanışı, balın yılın tamamında kolayca tedarik edilebilir oluşu ve sahip olduğu lezzet ile özellikle sağlıklı beslenmeye gayret eden bireylerin tercih sebebidir. Bal şerbeti balın sıcak su içerisinde eritildikten sonra soğutulması ve farklı meyve suları ya da baharatlarla çeşnilendirilmesiyle üretilmektedir. Bal şerbetinin lezzetlendirilmesinde limon, portakal, elma gibi meyvelerin yanı sıra nane, zerdeçal vb. baharatlar da kullanılmaktadır (Cankurt, 2024).

Bal şerbetinin içerdiği biyoaktif bileşenler, vitaminler ve mineraller ile antimikrobiyal özelliği sayesinde bağışıklık sistemini desteklediği ve vücudu hastalıklara karşı koruduğu bildirilmiştir. Yine içeriğindeki doğal şekerler sebebiyle hızlı bir enerji kaynağı olduğu, yorgunluk ve halsizlik halinde enerji seviyesini arttırarak canlılık sağladığı belirtilmiştir. Yapısında bulunan sindirim enzimleri ve prebiyotikler ile sindirim sürecini desteklediği yönünde çalışmalar bulunmaktadır (İzol vd., 2023; Neto vd., 2025).

Literatürde baldan üretilen içeceklerin serinletici, hazmı kolaylaştırıcı özellikleri üzerinde durulmuş ve boğaz rahatsızlıkları ile gribal enfeksiyonlarda tüketimi tavsiye edilmiştir (Sarıoğlan ve Cevizkaya, 2016; İzol vd., 2023). Fakat bal sirkesi dışında hammaddesi bal olan fermente özellikte içeceklere rastlanmamıştır. Bal birçok çalışmada tatlandırıcı bir lezzet unsuru olarak kullanılmıştır. Bal şerbetinin mevcut sağlık yararının arttırılması ve ballı içeceklerin fonksiyonel özelliklerinin geliştirilmesi ancak fermentasyonla mümkün olabilmektedir. Çalışma kapsamında üretim denemesi yapılan ve yine bir arıcılık ürünü olan arı ekmeğinden izole edilen ve probiyotik potansiyel sergileyen bakterilerin kullanıldığı fermente bir bal içeceğinin, piyasadaki diğer içeceklere kıyasla kıymetli bir alternatif olacağı düşünülmektedir.

Tez kapsamında bal şerbeti olarak bilinen ve bal ve su karışımından oluşan içecek örnekleri arı ekmeğinden izole edilen laktik asit bakteri suşu, arı ekmeğinin kendisi bu ürünlerin fiziko-kimyasal, mikrobiyolojik ve fonksiyonel kalitesine dair veriler karşılaştırmalı olarak sunulmuştur. Literatürde probiyotik laktik asit bakterileri kullanılarak fermente edilen bitki bazlı içeceklere dair çalışmalar bulunmaktadır. Fakat hammaddesi bal olan ve arı ekmeğinden izole edilen laktik asit bakteri suşları ile fermente edilen bir içeceğe rastlanmamıştır. Bu nedenle bal şerbeti örneklerinin analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde benzer çalışmalar örneklendirilmiştir. Literatürde genellikle meyve sularının fermente edilerek pazara yeni ürünler kazandırılabileceği vurgulanmıştır. Bu kapsamda, meyve sularının probiyotik mikroorganizmaları stabilize eden iyi bir ortam olduğu belirtilmiştir. Probiyotiklerin, meyve suyu içeriğinde bulunan maddelerin biyoaktif özelliklerini arttırdığı ve bileşenlerin emilimini kolaylaştırdığı bildirilmiştir. Meyve sularında bulunan askorbik asitin (C vitamini) probiyotik

canlılığını da koruduğu ifade edilerek aralarındaki sinerjistik etki ile faydanın katlanarak artacağı aktarılmıştır (Žuntar vd., 2020). Fakat, meyve suyunun yüksek asitliği ile probiyotikler için gerekli olan serbest amino asitler ve kısa peptitlerin yetersizliği kısıtlayıcı parametreler olarak belirtilmiştir (Žuntar vd., 2020). Meyve sularının yüksek oranda şeker içermesi sağlıklı ve fonksiyonel ürün üretiminde alternatifler aranmasına sebep olmuştur. Bu nedenle sebzeler, baklagiller ve bazı tıbbi bitkiler alternatif hammaddeler olarak kullanılmaya başlanmıştır.

L. acidophilus kullanılarak salatalık, beyaz ve kırmızı lahana sularının fermente edildiği bir içecekte pH, laktik asit, canlı hücre ve biokütlenin değişimi takip edilmiş bu ürünlerin daha uzun ömürlü fermente içecekler üretmeye uygun oldukları belirtilmiştir (Lavinia vd., 2012). Başka bir çalışmada, *Lactobacillus* spp. probiyotikler kullanılarak bakla, bezelye ve fasulye tanelerinden fermente su ekstraktları elde edilmiş ve duyusal özellikleri ile protein/amino asit içeriği üzerindeki değişiklikler incelenmiştir. Laktik asit fermentasyonun baklagil bazlı içeceklerin duyusal özelliklerini iyileştirdiği ve soğuk depolamanın sonuna kadar yüksek miktarda laktobasilin canlı kaldığı bildirilmiştir (Demarinis vd., 2022).

Bir başka çalışmada yeni keşfedilen *Enterococcus faecium* ve ticari *Lactococcus lactis* kullanılarak iki farklı fermente aloe vera suyu elde edilmiştir. Her iki probiyotik bakteri de aloe vera ekstraktında çoğalabilmiştir. Aloe vera içeceğinin, bileşiminde bulunan probiyotikler, prebiyotikler, kısa zincirli yağ asitleri ve fenolik bileşikler sebebiyle fonksiyonel bir içecek olarak pazarlanabileceği vurgulanmıştır (Cuvas-Limón vd., 2022). Ginseng filizinin *E. faecalis* ile fermente edilmesi sonucu ortaya çıkan bir araştırmada ürünün toplam polifenol ve flavonoid içeriği yüksek bulunmuştur. Duyusal değerlendirmede, fermente edilmiş ginseng filizi kullanılarak hazırlanan içecek kontrol içeceklerinden ve ginseng filizi ekstraktı örneğinden daha tercih edilebilir bulunmuştur (Kim S.H. vd., 2022).

Yapılan çalışmalar meyve, sebze ve çeşitli bitkilerin fermentasyonunda, bu ürünlere özgü mikrobiyotada bulunan ve yerleşik olarak tabir edilen probiyotik özellikteki mikroorganizmaların daha başarılı olduğunu göstermiştir (X. Xu vd., 2018; Garcia vd.,

2020). Bu nedenle, tez kapsamında bal şerbetinin fermentasyonunda yine bir kovan ürünü olan arı ekmeğinden izole edilen LAB kullanımı uygun görülmüştür.

Benzer şekilde bal şerbetinin meyve sularına oranla düşük asitliğe sahip olması, balın içeriğinde yer alan serbest amino asitlerin, kısa peptitlerin, oligosakkaritlerin varlığı ürünü fermente meyve ve sebze içeceklerinden ayırmıştır. Tez çalışması sonucunda özgün değere sahip, beğeniyle tüketilebilecek ve sağlık açısından faydalı bir içecek üretimi hedeflenmiştir. Yapılacak ileri çalışmalar ile iyileştirme ve gelişmeye açık bir ürün olabileceği düşünülmüştür.

Fermente içeceklerin üretiminde kullanılan probiyotik bakterilerin metabolik aktivitesi ve bunun ürünün raf ömrüne etkisi ayrıca değerlendirilmesi gereken bir konudur. Mikroorganizmaların lag, logaritmik, durağan ve ölüm fazlarını içeren karakteristik bir mikrobiyal gelişim eğrisine sahip oldukları bilinmektedir. İnokülasyonu takiben gerçekleşen lag fazı, mikroorganizmaların yeni substrat ortamına adaptasyon sürecini temsil ederken, bu aşamanın süresi son ürünün fermentasyon kinetiğini ve toplam işlem süresini doğrudan belirlemektedir (Fernández-Martínez vd., 2024). Logaritmik fazda gerçekleşen hızlı hücre bölünmesi ve karbonhidrat metabolizması, ortam asitliğinin artmasına ve biyokütlenin maksimum seviyeye ulaşmasına olanak tanımaktadır. Ancak, besin kaynaklarının tükenmesi ve laktik asit gibi inhibitör metabolitlerin birikmesiyle birlikte bakteriler durağan faza geçmektedir (Popova-Krumova vd., 2024). Probiyotik mikroorganizmaların fermentasyon sürecinde sentezledikleri organik asitler, hidrojen peroksit ve bakteriyosinler, ortam pH'sını kritik seviyelerin altına düşürerek patojen ve bozulmaya neden olan mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmekte ve ürünün mikrobiyolojik stabilitesini sağlamaktadır. Bununla birlikte, depolama süresi boyunca devam eden asidifikasyon süreci, probiyotik hücrelerin canlılığını olumsuz etkileyerek ölüm fazının hızlanmasına ve duyusal kalitenin değişmesine neden olabilmektedir (Popova-Krumova vd., 2024).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Arı Ekmeği ve Bal Temini

Arı ekmeği hasadı belirli dönemlerde ve sınırlı sayıda arıcı tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle taze ürün temini amacıyla örnekler Marmara bölgesinde faaliyet gösteren arıcılardan toplanmıştır. Çalışma kapsamında Bursa, Yalova ve İstanbul illerinden toplam 11 farklı arıcıdan örnek alımı gerçekleştirilmiştir. Örneklerin toplandığı bölgeler ve kodları Çizelge 3.1'de verilmiştir. Arı ekmeğine ait mikrobiyotanın zarar görmemesi için örnekler petekli halde alınmış ve soğuk zincirde (4°C) taşınmıştır. Mikrobiyolojik analizler ve izolasyon için gerekli örnekler alındıktan sonra ileri analizler için -18°C'de muhafaza edilmiştir. Fermente bal içeceği için kullanılan bal, arı ekmeği örneklerini de temin edildiği İnegöl Hocaköy'de bulunan arılıktan alınmış ve tüm ürün denemelerinde aynı bal örneği kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Arı ekmeği örneklerinin toplandığı bölgeler ve örnek kodları

Alındığı Bölge		Örnek Sayısı	Kovan Kodu
Bursa	Kestel/Fidyekızık	2	KF1, KF2
Bursa	İnegöl/Tahtaköprü	2	İT1, İT2
Bursa	Karacabey	1	BK
Bursa	İnegöl/Hocaköy	1	İH
Bursa	Gemlik /Ata	1	GA
Yalova	Merkez/Kurtköy	2	YK1, YK2
Yalova	Merkez/Güneyköy	2	YG1, YG2
Yalova	Çiftlikköy/Taşköprü	1	YT
Yalova	Çınarcık/Güllük	1	ÇG
İstanbul	Çatalca	1	İÇ
İstanbul	Maltepe/Başıbüyük	1	İB

3.2. Arı Ekmeği ve Bal Örneklerinin Palinolojik İncelemesi ile Kimyasal Analizler

3.2.1. Bal ve arı ekmeği örneğinde polen tür tayini

Arıcılık ürünlerinin, özellikle bal ve polenin, palinolojik olarak incelenmesi; ürünün botanik ve coğrafi kökeninin belirlenmesinin yanı sıra, içerdiği polen profiline bağlı olarak fonksiyonel ve mikrobiyal özelliklerinin anlaşılmasına da katkı sağlamaktadır. Bu bağlamda, polen içeriğinin bilinmesi, bal ve polen bazlı fermente ürünlerde fermentasyon süreçlerinin daha doğru yorumlanması açısından önemlidir (Von der Ohe vd., 2004). Bal örneklerinde polen tür tayini amacıyla preparatların hazırlanması için Louveaux vd. (1978) tarafından geliştirilen yöntemden yararlanılmıştır. Örnek oda sıcaklığında steril bir çubukla karıştırılarak homojen hale getirilmiş ve 10 g alınarak üzerine 20 mL saf su eklenmiştir. Oluşan çözeltiye belirli sayıda *Lycopodium* sporu içeren tablet atılmış, tabletin çözünmesi ve homojen şekilde yayılması sağlanmıştır. Homojen hale getirilen karışım 4000 rpm'de 45 dakika santrifüj edilerek sıvı kısım uzaklaştırılmıştır. Tüplerin içine bazik fuksin içeren 0,1 mL %50'lik gliserin jelatin ilave edilerek çözeltinin homojen şekilde karışması ve boyanması sağlanmıştır. Bu karışımdan 0,01 mL alınarak lam üzerine konularak lamel ile kapatılmış ve mikroskop altında incelenmiştir. Bal örneklerinin değerlendirilmesi sürecinde, örneklerde tespit edilen polenlerin toplam polen sayısına göre oranları dikkate alınarak sınıflandırma yapılmıştır. Buna göre, toplam polen sayısının %45'inden fazlasını oluşturan polen türleri dominant polenler, %15 ile %45 arasında bulunanlar sekonder polenler, %3 ile %15 arasında yer alanlar minör polenler ve %3'ten daha düşük oranda bulunanlar ise eser (iz) polenler olarak tanımlanmıştır.

Arı ekmeği örnekleri peteğin genelini temsil edecek şekilde kalem ile alınmış ve laboratuvara getirilerek analize kadar +4^{o}Cde saklanmıştır. Palinolojik analiz amacıyla mikroskobik preparatlar hazırlanmıştır. Her bir arı ekmeği örneğinden 5 gram alınarak üzerine %70 (v/v) etanol içeren 20 mL çözelti eklenmiş ve homojen hale getirilmiştir. Elde edilen süspansiyondan lam üzerine 3 paralel yayma preparat hazırlanmıştır. Preparat kurutulduktan sonra bazik fuksin içeren 0,1 mL %50'lik gliserin jelatin

karışımı ile tespit edilmiş ve mikroskop altında incelenmiştir. Arı ekmeğinin polen içeriği toplam polen sayısına oranlanarak yüzde olarak hesaplanmıştır. Polen izolasyonu ve teşhisi için, Bursa Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü Palinoloji Laboratuvarı altyapısı ve referans koleksiyonu kullanılarak Prof. Dr. Aycan Tosunoğlu ve Dr. Ömer Solak-Amet'ten destek alınmıştır.

3.2.2. Bal örneğine uygulanan kimyasal analizler

Çalışmada bal örneğinin fizikokimyasal ve biyoaktif özellikleri incelenmiştir. Balın asitliği, pH'sı, elektriksel iletkenliği ve prolin içeriği standart analitik yöntemlerle belirlenmiştir. Ayrıca, örneğin şeker kompozisyonu (sakkaroz, fruktoz, glukoz ve maltoz) kantitatif olarak analiz edilmiştir. Bunun yanı sıra, balın biyolojik aktivitesi ile ilişkili parametrelerden toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasite (DPPH) değerlendirilmiştir. Bu analizler, balın kalite kriterleri ile biyoaktif potansiyelini ortaya koymak amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Bal örneğinde Mettler Toledo marka (Seven Compact, ph/ion Meter S220M) pH metre ile pH ölçümü yapılmıştır. Titrasyon asitliği analizinde 10 g bal, 75 mL distile su ile çözülmüştür. Üzerine 2-3 damla fenolftaleyn indikatörü damlatılarak, örnek 0,1 N NaOH çözeltisi ile renk dönüşümü gerçekleşene kadar (pH=8,2) titre edilmiştir. Harcanan NaOH miktarı kaydedilerek, laktik asit/kg bal cinsinden verilmiştir (Cemeroğlu, 2013).

Elektriksel iletkenlik, %20 (w/v; kuru madde bazında) sulu bal çözeltisi kullanılarak bir iletkenlik ölçer (OHAUS / ST300C, İsviçre) yardımı ile ölçülmüştür (Anonim, 2008c).

Balın şeker profilini belirlemek için TS 13359 (Anonim, 2008a) standardı kullanılmıştır. Sakkaroz, fruktoz, glukoz ve maltoz miktarı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak tespit edilmiştir. Bal örneğinden 5 g alınarak 25 mL saf su içerisinde çözülmüş, ardından Whatman No.1 filtre kağıdından süzülerek partikülden arındırılmıştır. Elde edilen çözelti 0.45 µm por çapına sahip membran filtreden geçirilerek HPLC analizine hazır hâle getirilmiştir. Şeker analizinde, Aminex HPX-87C

kolonu (300 × 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, ABD) ile donatılmış UltiMate™ 3000 HPLC sistemi (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanılmıştır. Metot validasyon parametreleri; doğrusallık (lineerlik), gözlenebilme sınırı (LOD), tayin sınırı (LOQ) ve geri kazanım (recovery) çalışmaları ile belirlenmiştir. LOD ve LOQ değerleri, sinyal/gürültü oranının (S/N) sırasıyla 3 ve 10 olduğu konsantrasyonlar esas alınarak hesaplanmıştır. Analizler TÜBİTAK BUTAL'dan hizmet alımı olarak gerçekleştirilmiştir.

Balın prolin miktarı TS 13357 (Anonim, 2008b) standardına göre belirlenmiştir. Analiz için öncelikle 5 g bal örneği, belirli hacimde saf su ile seyreltilmiş ve üzerine formik asit çözeltisi eklenmiştir. Elde edilen karışıma ninhidrin reaktifi ilave edilmiş ve reaksiyon 70 °C sıcaklıkta 15 dakika boyunca su banyosunda gerçekleştirilmiştir. Bu süre sonunda tüpler soğutulmuş ve organik fazın ayrılması amacıyla toluen ile ekstraksiyon yapılmıştır. Üst faz alınarak kuvars küvetlere aktarılmış ve 520 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak absorbans değerleri ölçülmüştür. Prolin konsantrasyonu, aynı yöntemle hazırlanan ve bilinen konsantrasyonlara sahip L-prolin standart çözeltileri kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi yardımıyla mg/kg cinsinden hesaplanmıştır. Analiz, TÜBİTAK BUTAL'dan hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Balda toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasiteyi belirlemek için Folin-Ciocalteu (spektrofotometrik) ve DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazi) yöntemleri kullanılmıştır. Analizler TÜBİTAK BUTAL'dan hizmet alımı olarak gerçekleştirilmiştir. 1,5 g bal örneği saf su ile 15 mL'ye seyreltilmiş ve çözelti filtre kâğıdından süzülerek ekstrakt haline getirilmiştir. Hazırlanan çözeltiden 500 µL alınarak 2,5 mL %10 seyreltilmiş Folin–Ciocalteu reaktifi ile karıştırılmış, 5 dakika sonra 2 mL %7,5'lik sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözeltisi ilave edilmiştir. Karışım oda sıcaklığında, karanlık ortamda 2 saat bekletildikten sonra, 750 nm dalga boyunda absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar mg Gallik asit eşdeğeri (GAE)/100 g bal olarak ifade edilmiştir (Tananaki vd., 2024).

Balın antioksidan kapasitesi, Beretta ve diğerleri (2005) tarafından tanımlanan protokole uygun olarak DPPH serbest radikal giderme testi ile belirlenmiştir. Bu

yöntemde, 0,5 mL bal ekstraktı ile 2,7 mL DPPH çözeltisi karıştırılarak 15 dakika karanlıkta inkübe edilmiş ve absorbans 517 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Trolox standart eğrisi kullanılarak hesaplanmış ve µmol Trolox Eşdeğeri (TE)/100 g bal olarak ifade edilmiştir. Bütillenmiş hidroksitoluen pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.2.3. Arı ekmeği örneklerine uygulanan kimyasal analizler

Arı ekmeği örneklerinde toplam protein miktarı Kjeldahl yöntemi ile belirlenmiştir (Anonim, 2002). Örnekten 2 g alınarak sindirim tüplerine alınmıştır. Örneklerin üzerine yaklaşık 15 mL derişik sülfürik asit (H_2SO_4) eklenmiş ve katalizör karışımı olarak potasyum sülfat (K_2SO_4) ile bakır sülfat ($CuSO_4$) ilave edilmiştir. Tüpler, organik azotun amonyum sülfata dönüşmesi sağlanana kadar kontrollü sıcaklıkta yakılmıştır. Yakma işleminin tamamlanmasının ardından tüpler soğutulmuş ve numuneler %40'lık sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi eklenerek alkalileştirilmiştir. Ortamda açığa çıkan amonyak, buhar distilasyonu ile sürüklenerek borik asit (H_3BO_3) çözeltisi içine absorbe edilmiştir. Elde edilen çözeltideki amonyum borat, standart 0.1 N hidroklorik asit (HCl) veya 0.1 N sülfürik asit (H_2SO_4) ile titrasyon yapılarak tayin edilmiştir. Toplam protein miktarı azot miktarının 6.25 faktörü ile çarpılmasıyla hesaplanmıştır. Sonuçlar, % (g/100 g örnek) olarak ifade edilmiştir.

Yağ asidi kompozisyonu, ekstrakte edilen yağın GC-FID (Alev İyonizasyon Dedektörlü Gaz Kromatografisi) yöntemi ile analiz edilmesi ile belirlenmiştir (Anonim, 2015). TÜBİTAK-BUTAL'dan hizmet alımı gerçekleştirilmiştir. Yağ asidi metil esterleri, numune üzerine 5 mL n-hekzan ve metanolik 2 N KOH çözeltisinden 100 µL ilave edilerek sentezlenmiştir. Elde edilen esterler, bir GC-MS/FID sistemi (Agilent 7890 N, Agilent Technologies Inc., ABD) ve 30 m uzunluğunda, 0,25 mm iç çapa ve 0,1 µm sabit faz kalınlığına sahip kapiler kolon kullanılarak analiz edilmiştir (Anonim, 2015). Yağ asidi bileşenleri, toplam yağ asidi içeriğinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

Tez kapsamında üretilen içeceklerin toplam fenolik madde miktarı ve toplam antioksidan kapasitesi 3.2.2'de belirtildiği şekilde belirlenmiş ve TÜBİTAK-BUTAL'dan hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir.

3.3. Arı Ekmeği Örneklerinde Uygulanan Mikrobiyolojik Analizler

3.3.1. Toplam mezofilik aerobik canlı bakteri sayımı

Toplam mezofilik aerobik canlı bakteri sayımında 3 g arı ekmeği aseptik koşullarda 27 mL steril %0,1'lik peptonlu su içeren stomacher torbasına transfer edilmiştir. Homojenize edilen örnekten steril %0,1'lik peptonlu su kullanılarak 10^{-7} dilüsyona kadar ondalık seyreltme işlemi yapılmıştır. Uygun görülen dilüsyonlardan dökme plak yöntemi kullanılarak Plate Count Agar (PCA) besiyerine ekim yapılmıştır. Petriler 30°C'de 48 saat aerobik koşullarda inkübe edilerek, inkübasyon sonunda koloni sayımı gerçekleştirilmiştir. TMAB sayısı log kob/g olarak hesaplanmıştır (Cemeroğlu, 2013).

3.3.2. Toplam maya/küf sayımı

Toplam maya ve küf sayımında, 3 g arı ekmeği aseptik koşullarda 27 mL steril %0,1'lik peptonlu su içeren stomacher torbasına transfer edilmiştir. Homojenize edilen örnekten steril %0,1'lik peptonlu su kullanılarak 10^{-7} dilüsyona kadar ondalık seyreltme işlemi yapılmıştır. Uygun görülen dilüsyonlardan yayma plak yöntemi kullanılarak Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) agar besiyerine ekim yapılmıştır. Petriler 25°C'de 5 gün aerobik koşullarda inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda koloni sayımı gerçekleştirilmiştir. Örneklerdeki maya ve küf sayısı log kob/g olarak hesaplanmıştır (Kaya vd., 2018).

3.3.3. Laktik asit bakterisi (LAB) sayımı

LAB sayımında, 3 g arı ekmeği aseptik koşullarda 27 mL steril %0,1'lik peptonlu su içeren stomacher torbasına transfer edilmiştir. Homojenize edilen örnekten steril %0,1'lik peptonlu su kullanılarak 10^{-7} dilüsyona kadar ondalık seyreltme işlemi

yapılmıştır. Uygun görülen dilüsyonlardan laktobasil analizi için %0,1 sikloheksimid içeren Man Rogosa ve Sharpe (MRS) agar, laktokok analizi için M17 agar besiyerlerine çift kat dökme plak yöntemine göre ekim yapılmıştır. MRS ve M17 agar içeren petriler Anaerocult A (Merck, Darmstadt, Almanya) içeren anaerobik bir kavanozda, 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Örneklerde enterokok analizi için ise Kanamycin Aesculin Azide (KAA) agarda yayma plak yöntemine göre ekim yapılmış olup, 37 °C'de 48 saat aerobik koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda koloni sayımları gerçekleştirilmiş ve LAB sayısı log kob/g olarak hesaplanmıştır (Feresu ve Muzondo, 1990).

3.4. Örneklerden Potansiyel Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Laktobasillerin izolasyonu amacıyla MRS agar, laktokokların izolasyonu amacıyla M17 agar ve enterokokların izolasyonu amacıyla ise KAA agar besiyeri kullanılmış MRS ve M17 agar besiyerine ekilen örnekler anaerobik, KAA besiyerine ekilen örnekler ise aerobik olarak inkübe edilmiştir. MRS ve M17 agar içeren petriler 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. KAA agarda yayma plak yöntemine göre ekim yapılmış olup, 37 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir.

Laktik asit bakterilerinin izolasyonu için kademeli bir saflaştırma yöntemi tercih edilmiştir. Üreme görülen MRS, M17 ve KAA petrilerinden farklı morfolojilere sahip koloniler alınarak önceden hazırlanmış MRS sıvı besiyerine aktarılmıştır. 30°C'de aerobik koşulda 24 saatlik inkübasyon sonrasında laktik asit bakterilerinin gelişmesinin zayıf olduğu gözlemlenmiş ve inkübasyon 48. saatte sonlandırılmıştır. Üreme gözlemlenen sıvı besiyerinden tek koloni düşürme yöntemi kullanarak katı besiyerine ekimler gerçekleştirilmiştir. 30°C'de 48 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen tekli koloniler MRS sıvı besiyerine aktarılmış, tekrar 48 saat inkübe edilmiştir.

Elde edilen saf izolatlara katalaz testi uygulanmıştır (Doğan ve Cebeci, 2021). İzolatların 24 saatlik kültüründen bir öze alınarak temiz bir lam üzerinde 1 damla %3' lük hidrojen peroksit çözeltisi ile karıştırılmıştır. Hava kabarcığı çıkışı pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Katalaz negatif (-) olduğu tespit edilen suşlar Gram boyama

kiti (Merck, Almanya) kullanılarak boyanmış ve mikroskop altında morfolojileri incelenmiştir. Gram pozitif ve katalaz negatif özellikteki izolatlar uygun besiyerlerinde geliştirildikten sonra ileri testlerin yapılması amacıyla %30'luk gliserol çözeltisi içinde -18°C'de stoklanmıştır.

3.5. LAB İzolatlarının Probiyotik Potansiyellerinin Belirlenmesi

LAB izolatlarının probiyotik özelliklerini belirlemek için; antimikrobiyal aktiviteleri, bazı antibiyotiklere karşı dirençleri, düşük pH ile safra tuzuna dirençleri, otoagregasyon ve hücre-yüzey hidrofobisitesi, kolesterol asimilasyon kabiliyetleri ve *in-vitro* sindirim modelindeki davranışları incelenmiştir.

3.5.1. LAB İzolatlarının antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi

LAB izolatların antimikrobiyal aktivitelerin belirlenmesinde test bakterileri olarak Gram negatif bakterilerden *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 ve Gram pozitif bakterilerden *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 kullanılmıştır. İzolatların aktifleştirilmesinde ve antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde LAB için MRS broth ve MRS agar, diğer test bakterileri için Nutrient Agar (NA) ve Nutrient Broth (NB) besiyerleri kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için "agar spot" ve "agar difüzyon" teknikleri ayrı ayrı uygulanmıştır (Bağcı, 2012). Agar spot testinde LAB'ın 24 saatlik sıvı kültürlerinden MRS agar besiyerine damla şeklinde 2 µL inokule edilmiştir. Petri kutuları daha sonra 30°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. NB besiyerinde 37 °C'de 24 saat aktifleştirilmiş test bakterisi kültürlerinden 10 µL, %0,75 agar içeren 10 mL yumuşak NA besiyerine eklenip karıştırılmıştır. Bu karışımla MRS besiyerinde geliştirilen spot kültürlerin üzeri dökülerek kaplanmıştır. Petri kutuları daha sonra 37 °C'de 24 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda spot kültürler etrafında oluşan şeffaf inhibisyon zonları ölçülerek LAB izolatlarının test bakterilerine karşı antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirilmiştir. Agar kuyu difüzyon tekniğinde ise; MRS broth besiyerinde 37 °C'de 24 saatte aktifleştirilen LAB izolatları 10000 rpm'de 4 ºC'de 10 dakika santrifüjlenerek süpernatant kısmı ayrılmıştır. Elde edilen

süpernatantlar 0,22 µm gözenek çaplı steril membran filtreden geçirilerek hücre içermeyen süpernatantlar elde edilmiştir. Aktifleştirilmiş 0,1 mL test bakteri kültürü %0,75 agar (w/v) içeren 20 mL miktardaki NA besiyeri içine ilave edilip karıştırılmış ve steril petri kutularına dökülmüş ve buzdolabı içerisinde 2 saat bekletilerek katılaşması sağlanmıştır. Katılaşan agar yüzeyine 1 mL'lik steril otomatik pipet uçları kullanılarak 9 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. Her bir kuyucuk içine çalışılan izolatların hücre içermeyen süpernatantlarından 100 µL miktarda ayrı ayrı eklenmiştir. 37 °C'de 24 saat inkübasyonun ardından kuyucuklar etrafında oluşan şeffaf inhibisyon zonları (mm) kumpas yardımı ile ölçülerek izolat süpernatantlarının antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir (Todorov ve Dicks, 2006).

3.5.2. LAB İzolatlarının antibiyotik direncinin belirlenmesi

LAB izolatlarının bazı antibiyotiklere karşı gösterdiği direncin tespit edilebilmesi için disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Sonuçlar Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Antibiyotik direnç testinde kullanılan antibiyotikler ve zon çapları * (mm)

Etki mekanizması		Antibiyotik	Kısaltması	Konsantrasyonu	Zon Çapı*		
					R	I	S
Hücre duvarı sentezi inhibitörleri	1	Vankomisin	VA	30µg/disk	≤14	15-16	≥17
	2	Ampisilin	A	10µg/disk	≤13	14-16	≥17
	3	Amoxicillin	Ax	25µg/disk	≤14	15-18	≥19
	4	Penicillin	P	10 µg/disk	≤17	18-20	≥21
Protein sentezi inhibitörleri	5	Tetrasiklin	TE	30µg/disk	≤14	15-18	≥19
	6	Eritromisin	E	10µg/disk	≤13	14-22	≥23
	7	Kloramfenikol	C	30µg/disk	≤12	13-17	≥18
	8	Steroptomisin	S	10µg/disk	≤11	12-14	≥15
	9	Gentamisin	CN	10µg/disk	≤12	-	≥13
DNA sentezi inhibitörleri	10	Ciprofloxacin	Cp	5µg/disk	≤21	22-25	≥26

R: Dirençli, S: duyarlı, I: orta derecede dirençli/duyarlı (CLSI, 2017)

İzolatların antibiyotik duyarlılık testi için, 24 saatlik taze kültürlerden hazırlanan bakteri süspansiyonları 0,5 McFarland standardına (~10^8 kob/mL) ayarlanmıştır. Steril pamuklu

eküvyon yardımıyla bu süspansiyonlar MRS agar plaklarının yüzeyine homojen şekilde yayılmıştır. Antibiyotik emdirilmiş standart diskler bu petri kaplarına yerleştirilmiş ve 37 ºC'de 48 saat inkübe edilmiştir. Antibiyotikli disklerin etrafında oluşmuş steril alanların çapı ölçülmüştür (Cholakov vd., 2014).

3.5.3. LAB İzolatlarının tuz ve mide asidine direncinin incelenmesi

Probiyotik bakterilerde antimikrobiyal aktivite öncelikli ve genel olarak istenilen bir özellik olduğundan çalışma kapsamında sadece antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenen izolatların tuz ve mide asidine dirençleri değerlendirilmiştir. İzolatların düşük pH'ya karşı direnç özellikleri pH 3,0 ortamında test edilmiştir. MRS brothlarda aktive edilen kültürler pH değeri 3 olan deney tüpleri içindeki 10 mL'lik MRS brothlara inoküle (%1) edilerek 0., 1. ve 3. saatlerde bu kültürlerden alınan örneklerin ondalık dilüsyonları yapılarak MRS agarlara ekilmiş ve 37 °C'de 48 saat inkübe edilerek sayım alınmıştır. İzolatların safra tuzuna direncinin belirlenmesi için ise MRS brothlarda aktive edilen kültürler %0,3 (w/v) oxgall içeren 10 mL'lik MRS brothlara inoküle (%1) edilmiştir. Daha sonra bu kültürlerden 0. 4. ve 24 saatlerde örnekler alınarak ondalık dilüsyonları yapılıp MRS agarlara ekilmiş, 37 °C'de 48 saat inkübasyon sonucunda canlı bakteri sayıları belirlenmiştir (Bağcı, 2012).

3.5.4. LAB izolatlarının *in-vitro* sindirim modelindeki davranışının incelenmesi

İzolatların *in-vitro* sindirim modelindeki davranışlarının incelenmesi için yapay mide ve bağırsak ortamı oluşturulmuş, mide için pH 2'ye ayarlanmış, 3g/L pepsin içeren MRS broth yapay mide suyu olarak kullanılmıştır. Yapay bağırsak sıvısı ise 1g/L pankreatin ve 4,5 g/L safra tuzu içeren MRS broth'dan oluşmaktadır. Her iki yapay ortam da 0,22 mm membran filtreden süzülerek sterilize edilmiştir. Test edilen LAB izolatları 5000g'de 15 dakika santrifüj edilip, iki kez fizyolojik su ile yıkandıktan sonra pelet elde edilmiştir. Yapay mide suyunda süspanse edilen pelet 37 ºC'de 3 saat inkübe edilmiş ve santrifüjlenerek yeniden pelet eldesi sağlanmıştır. Steril fizyolojik su ile yıkanan pelet yapay bağırsak sıvısı (pH 8) ile (4,5 mL/100 mL) resüspanse edilerek, 37 ºC'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Her aşamada LAB sayımı için örnek alınmış ve

MRS agara ekim yapılarak 37 ºC'de 24-48 saat inkübe edilen petrilerden sayım alınmıştır (Nazzaro vd., 2012).

3.5.5. LAB izolatlarının otoagregasyon ve hücre-yüzey hidrofobisitesinin belirlenmesi

İzolatlar, 15 dakika boyunca 5.000 g'de santrifüj edildikten sonra elde edilen pelet iki defa serum fizyolojik ile yıkanmış ve aynı tampon ile resüspanse edilmiştir. Bakterilerin 600 nm'deki optik yoğunluğu McFarland Densitometre (Biosan, Letonya) ile ölçülmüştür. Oda sıcaklığında 4 saatlik inkübasyon sonrasında üst faz pipetle alınarak tekrar 600 nm'deki optik yoğunluk ölçümü yapılmıştır. Otoagregasyon kapasitesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (Bosch vd., 2012).

$$\text{Otoagregasyon kapasitesi \%} = [1-(ODt / OD0)] \times 100 \qquad (3.1)$$

OD_t : 4. Saatteki optik yoğunluk

OD_0 : Başlangıçtaki optik yoğunluk

İzolatların 24 saatlik aktif kültürleri 5000 rpm'de 15 dakika süreyle santrifüj edilerek oluşan pelet iki defa serum fizyolojik ile yıkanmış, son yıkamadan sonra elde edilen pelet aynı tamponda resüspanse edilmiştir. Peletlerin optik yoğunluğu 600 nm'de 0,2 ± 0,05 OD'ye ayarlanmıştır. Serum fizyolojik tamponundaki 5 mL hücre süspansiyonuna 1 mL ksilen eklenmiş ve 2 dakika yüksek hızda vortekslenmiştir. Faz ayrımının sağlanması için tüpler 37 °C'de 1 saat boyunca bekletilmiştir. Üst faz dikkatlice ayrıldıktan sonra kalan kısımdan 600 nm'de 2. okuma yapılmıştır. Hücre-yüzey hidrofobisitesi elde edilen OD verileri kullanılarak aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (Mohammad vd., 2020b).

$$\% \, Hidrofobisite = [(OD_{1.okuma} - OD_{2.okuma}) / OD_{1.okuma})] \times 100 \qquad (3.2)$$

3.5.6. LAB izolatlarının kolesterol asimilasyon kabiliyetinin değerlendirilmesi

İzolatların saf kültürleri 10 mL MRS broth besiyerine ekilerek 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Gelişen kültürlerin 10000 rpm'de 15 dakika süreyle 4 °C'de santrifüjlenmesi ile hücre peletleri elde edilmiştir. Bu peletler kolesterol (2000 mg/L) içeren 10 mL serum fizyolojik içinde çözülmüştür. Kolesterol içeren bakteri süspansiyonları 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda her bir kültür tüpünden elde edilen süpernatantlarda spektrofotometrik ölçüm tekniğine dayalı Cholesterol CHOD / POD (Spinreact, İspanya) test kiti kullanılarak kolesterol miktar tayini yapılmıştır (Bağcı, 2012).

3.6. İzolatların Cins ve Tür Düzeyinde Tanımlanması

Probiyotik özellikler yönünden uygun bulunan izolatların tanımlanması amacıyla MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time of Flight Mass Spectrometry) kullanılmıştır. Analizler Sultangazi Haseki Eğitim Araştırma Hastanesi ISLAB merkez laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. İzole edilen suşların tanımlanması MALDI Biotyper® sirius IVD System (Bruker Daltonik GmbH) cihazı ile gerçekleştirilmiş; analizler üretici firmanın sağladığı referans veri tabanı kullanılarak yapılmıştır. Örnek hazırlama aşamasında direk smear metodu uygulanmıştır. Analiz sonuçları, Bruker Biotyper sisteminin tanımlama kriterlerine göre değerlendirilmiştir (Huseynov, 2023). Log skor değeri ≥2,0 olan izolatlar tür düzeyinde kesin olarak tanımlanmış, log skor değeri 1,7-1,9 aralığında bulunan izolatlar ise cins düzeyinde güvenilir kabul edilmiş olup tür düzeyinde tanımlama için ek doğrulama yöntemlerine ihtiyaç duyulabileceği belirtilmiştir (Freiwald ve Sauer, 2009).

3.7. İzolatların Hemolitik Aktivitesinin Değerlendirilmesi

İzolatların patojenite potansiyelinin fenotipik olarak değerlendirilmesi amacıyla hemolitik aktivite değerlendirilmesi yapılmış, bu amaçla izolatlar MRS broth ortamında, 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılarak aktifleştirilmiştir. Elde edilen kültürler koyun kanlı agar (%5'lik PCA, Aklab Group) yüzeyine çizgi ekim yapılarak

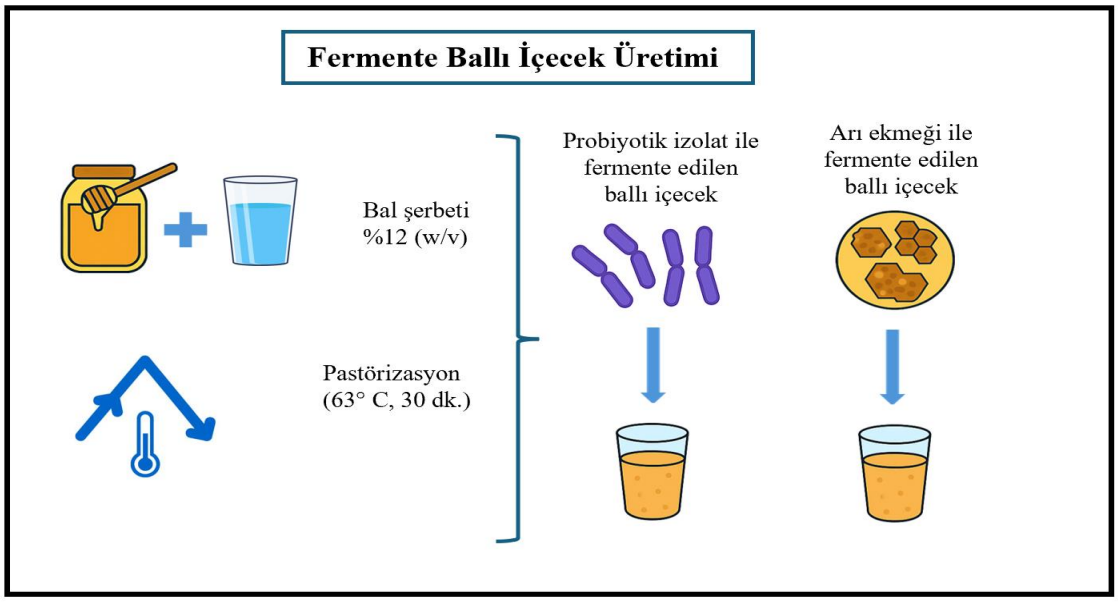
37 °C'de 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kanlı agar üzerinde izolatların oluşturacağı kolonilerin zon tipleri incelenmiştir. Koloni etrafında yeşil zon oluşumu alfa hemoliz, koloni etrafında şeffaf zon oluşumu beta hemoliz, net bir zon olmaması ise gama hemoliz olarak değerlendirilmiştir (Kumari vd., 2022).

3.8 *E. faecalis* (17YT4) İzolatının Fermentasyon Özelliklerinin Belirlenmesi

Probiyotik potansiyele sahip olan ve tür tanımlaması sonucu *E. faecalis* olarak tanımlanan izolatın (17YT4) fermentasyon yeteneği, farklı karbonhidrat kaynaklarını içeren Durham tüpü fermentasyon testleri ile değerlendirilmiştir. Testlerde karbonhidrat kaynağı olarak glukoz, laktoz, galaktoz, maltoz, sakkaroz ve fruktoz kullanılmıştır. Her bir şeker için ayrı tüplere hazırlanan besiyeri, pepton water ortamı baz alınarak hazırlanmış ve içerisine %0.02 (w/v) bromkresol yeşili pH indikatörü olarak eklenmiştir. Steril Durham tüpleri bu ortamlara yerleştirildikten sonra, her tüpe 200 µL aktif kültür inoküle edilmiştir. İnoküle edilen tüpler 37 °C'de 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. Fermentasyonun gerçekleştiği tüplerde pH değişimleri renk geçişleriyle değerlendirilmiştir. Bromkresol yeşili indikatörü pH'a bağlı olarak 3,8'in altında sarı, 3,8-5,4 aralığında yeşil, 5,4'ün üzerinde ise mavi renk göstermektedir. Ayrıca, Durham tüpü içerisinde gaz birikimi gözlenen örneklerin gaz üretimi pozitif fermentasyon aktivitesi olarak değerlendirilmiştir (Saranyadevi vd., 2026).

3.9. Fermente Bal İçeceği Üretimi

Fermente bal içeceği üretimi amacıyla farklı bal derişimlerinde (%6, %12, %18 w/v) şerbetler hazırlanarak ön denemeler yapılmıştır. Duyusal analiz değerlendirmesi ile en uygun derişim belirlenmiş ve distile su ile %12 (w/v)'lik bal içeriğine sahip sade şerbet hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım filtre edilerek, 63°C'de 30 dk süre ile pastörize edilmiştir. Hazırlanan ballı içecek çalışma sonucunda belirlenen probiyotik potansiyelli izolat ve izolatın elde edildiği arı ekmeği kullanılarak ayrı ayrı fermente edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Fermente bal içeceği üretimi şematik gösterimi

3.9.1. Arı ekmeğinden elde edilen probiyotik potansiyeli *E. faecalis* (17YT4) izolatı ile fermente bal içeceği üretimi

MRS broth besiyerinde aktifleştirilmiş probiyotik potansiyeli bulunan *E. faecalis* (17YT4) kültüründen 2 mL alınarak 50 mL MRS Broth besiyerine inokülasyon yapılmış ve 37 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Elde edilen kültür 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek pelet elde edilmiş ve steril serum fizyolojik ile 2 defa yıkanmıştır. Bal şerbeti 0,5 McFarland optik yoğunluğuna (yaklaşık 10^8 kob/mL) sahip olacak şekilde izolat ile aşılanmış ve 37 °C'de 48 saatlik fermentasyona bırakılmış (Gharehyakheh vd., 2019; Öztürk Oruç ve Çakır, 2019) ve 24 saatlik periyotlarda pH takibi yapılmıştır. Duyusal değerlendirme gerçekleştirilerek hedeflenen pH değeri altında (pH:3,5) fermentasyon sonlandırılmıştır (Eidt vd., 2023). Negatif kontrol için; kültür eklenmemiş bal şerbeti inkübe edilmiştir. Pozitif kontrol olarak ticari liyofilize saf kültür (Probest, *Lactobacillus plantarum* 299v) eklenmiş bal şerbeti inkübe edilmiştir. Liyofilize saf kültür probiyotik özellik gösteren ticari bir izolattan elde edilmiş ve bu izolata da benzer kültürleme işlemleri uygulanmıştır. Fermentasyon sonunda elde edilen örnekler duyusal analizler için 4 °C'de, sonraki kimyasal analizler için -18 °C'de saklanmıştır.

3.9.2. Arı ekmeği ile fermente bal içeceği üretimi

Bal şerbeti distile su ile ön denemelerde belirlenen derişimlerde (%12 w/v) hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım filtre edilerek, 63°C'de 30 dk süre ile pastörize edilmiştir. Ürünün içerisine öğütülmüş arı ekmeği son üründeki oranı %0,3 (g/mL) olacak şekilde eklenmiştir. İnkübasyon sürecinde duyusal değerlendirme yapılarak hedeflenen pH değeri altında (pH:3,5) fermentasyon sonlandırılmıştır (Eidt vd., 2023). Fermentasyon sonunda alınan örnekler duyusal analizler için 4°C'de depolanmıştır. Örneklerin bir kısmı ise daha sonraki kimyasal analizler için -18°C'de saklanmıştır.

3.9.3 Farklı kültür kombinasyonları ile fermente bal içeceği üretim denemesi

Mikrobiyal çeşitliliğin fermentasyon dinamiklerine etkisinin gözlemlenmesi adına farklı üretim denemeleri yapılmıştır. Tez çalışması kapsamında izole edilen ve probiyotik potansiyele sahip olduğu düşünülen dört izolatın birlikte kullanımıyla yeni bir deneme yapılmıştır. Bu sayede oluşabilecek ko-fermentatif etkileşimler ve asit üretimi üzerinde fikir sahibi olunması amaçlanmıştır. Tanımlanmış dört izolat eşit oranlarda karıştırılarak 3.9.1'de belirtildiği şekilde üretim denemesi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca seçilen ticari bir maya izolatı (*Saccharomyces boulardii*) kullanılarak fermentasyon ortamında *E. faecalis* ile olası simbiyotik etkileşimini değerlendirilmiştir. Literatürde, maya ve bakteri ortak kültürlerinin, şekerlerin daha etkin kullanımına ve fermentasyon sırasında pH'nın dengelenmesine katkı sağlayabildiği bildirilmiştir (Paramithiotis vd., 2006). Seçilen *E. faecalis* izolatına ek olarak ticari bir probiyotik maya olan Reflor® (*Saccharomyces boulardii*) inoküle edilmiştir. Kullanılan maya suşu, 3.9.1. bölümünde açıklandığı şekilde rehidrate edilip aktifleştirildikten sonra fermentasyon ortamına eklenmiştir.

3.10. Fermente Bal İçeceği Örneklerinin Mikrobiyolojik Özellikleri

3.10.1. Toplam mezofilik aerobik canlı bakteri

Tez kapsamında üretilen içeceklerin toplam aerobik mezofilik canlı bakteri sayımı 3.3.1'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.10.2. Küf ve maya sayımı

Toplam maya ve küf sayımı 3.3.2'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.10.3. Canlı laktik asit bakterisi sayımı

Laktik asit bakteri sayımı bölüm 3.3.3'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.11. Fermente Bal İçeceklerinin Fizikokimyasal ve Fonksiyonel Özellikleri

3.11.1. pH ölçümü ve titrasyon asitliği

Fermente bal içeceklerinin pH ve titrasyon asitliği ölçümü bölüm 3.2.2'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.11.2. Brix ölçümü

Örneklerin suda çözünür kuru madde değerleri el tipi refraktometreyle (Isolab) ölçülerek °Brix olarak okunmuştur (Cemeroğlu, 2013).

3.11.3. Renk tayini

Fermente bal şerbetinin L*(parlaklık), a* (yeşil- kırmızı renk dengesi) ve b* (mavi- sarı renk dengesi) renk değeri ölçümleri kolorimetre cihazı (PCE-CSM, Almanya) ile

gerçekleştirilmiştir. Renk tayini yapılmadan önce cihazın siyah beyaz kalibrasyonu yapılmış ve 20 mL örnek ölçü hücresine aktarılarak ölçümler tamamlanmıştır (Cemeroğlu, 2013).

3.11.4. Toplam şeker /indirgen şeker

Ballı içecek örneğinde toplam ve indirgen şeker miktarının belirlenmesi için Luff-Schoorl yöntemi kullanılmıştır. 10 mL içecek örneğine 25 mL Luff–Schoorl reaktifi (alkalik Cu^{2+} çözeltisi) eklenmiş ve geri soğutuculu kaynatma sisteminde 10 dakika süreyle kaynatılmıştır. Soğumaya bırakılan çözeltiye sırasıyla 10 mL %30 KI çözeltisi ve 25 mL 3 mol/L H_2SO_4 eklenmiştir. Oluşan I_2 miktarı, nişasta göstergesi eşliğinde 0.1 mol/L $Na_2S_2O_3$ ile titre edilmiştir. Sonuçlar, örnek ve kör numune arasında kullanılan $Na_2S_2O_3$ hacmi farkına göre şeker mg eşdeğeri tablolarıyla glukoz/fruktoz miktarına dönüştürülmüştür (Marrubini vd., 2017). Analiz, TÜBİTAK BUTAL'dan hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir.

Ballı içecek denemelerinde toplam ve indirgen şeker miktarlarının belirlenmesi, Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2020) tarafından tanımlanan Lane-Eynon titrasyon yöntemi kullanılmıştır. Analiz öncesinde örnekler uygun oranda distile su ile seyreltilmiş ve çözeltiler süzülerek berrak hâle getirilmiştir. İndirgen şeker tayini için, Fehling A ve Fehling B çözeltileri eşit hacimlerde karıştırılarak kaynama noktasına kadar ısıtılmış, ardından numune çözeltisi büret yardımıyla damla damla eklenmiştir. Çözelti rengi mavi renkten tuğla kırmızısına dönene kadar titrasyona devam edilmiştir. Reaksiyonun bitiş noktası, metilen mavisi indikatörü ile belirlenmiştir. Toplam şeker tayininde ise numune, 6 N HCl ile hidrolize edilerek disakkaritlerin monosakkaritlere parçalanması sağlanmış; nötralizasyon sonrası (5N NaOH) aynı titrasyon prosedürü izlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, örnekteki glukoz miktarına göre hesaplanmış ve sonuçlar g/100 mL olarak ifade edilmiştir.

3.11.5. Toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite

Ballı içecek örneğinin toplam fenolik madde miktarı ve toplam antioksidan kapasitesi 3.2.2.'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. TÜBİTAK BUTAL'dan hizmet alımı yapılmıştır.

3.12. Fermente Bal İçeceği Örneklerinin Duyusal Özellikleri

Fermente bal içeceği örneklerinin duyusal özellikleri 9 puanlı skala (1: en kötü; 9: en iyi) kullanılarak tüketici beğenisi olarak belirlenmiştir. Ürünün duyusal analizleri 25 eğitimsiz panelist tarafından gerçekleştirilmiştir. Standart olarak ışıklandırılmış ortamda örnekler koku, tat, ağızda bıraktığı his ve genel kabul edilebilirlik özellikleri üzerinden bireysel olarak analiz edilmiştir (Stone vd., 2020).

3.13. Fermente Bal İçeceği Raf Ömrü Takibi

Literatürde bitki bazlı fermente içeceklerin raf ömrü bir ay süre ile +4°C'de muhafaza olarak belirtilmiş (Malganji vd., 2016; Demarinis vd., 2022) olup, bu doğrultuda tez kapsamında üretilen bal şerbetlerinin 28 gün boyunca +4°C'de muhafaza edilerek raf ömrü takibi yapılmıştır. Üretimi yapılan örneklerde depolama süresince haftalık olarak pH ve titrasyon asitliği takip edilmiş, ayrıca laktik asit bakteri (LAB) sayımı alınmıştır (Malganji vd., 2016; Demarinis vd., 2022).

3.14. İstatiksel Analizler

İstatistiksel analizler Minitab, versiyon 22 (Minitab LLC, PA, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak ifade edilmiştir. Ortalamalar arasındaki farkı belirlemek için $p<0,05$ anlamlılık düzeyinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA), post-hoc olarak Tukey testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bal ve Arı Ekmeği Örneklerinin Palinolojik İncelemesi ve Kimyasal Analiz Sonuçları

4.1.1. Balın palinolojik özellikleri

Fermente içecek üretiminde kullanılan ve üretici tarafından "çiçek balı" olarak tanımlanan balın botanik kökeninin belirlenmesi amacıyla yapılan polen analizine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Bal örneğinde belirlenen bitki taksonlarının polen yüzdeleri (%)

Takson	Polen (%)	Takson	Polen (%)	Takson	Polen (%)
Castanea sativa	77,15	*Helianthus annuus*	6,88	*Cistus* spp.	5,82
Centaurea spp.	3,51	Fabaceae	1,73	*Pistacia* spp.	0,82
Amarathaceae	0,34	Brassicaceae	0,38	Boraginaceae	0,10
Echium spp.	0,58	Ericaceae	0,19	*Fraxinus* spp.	0,14
Poaceae	0,14	*Laurus nobilis*	0,18	Liliaceae	0,05
Olea europaea	0,05	*Plantago* spp	0,10	*Ranunculus* spp.	0,05
Rosaceae	0,24	*Sarco/Poterium*	0,10	Solidago	0,10
Tilia spp.	0,29	*Trifolium repens*	0,10	Apiaceae	0,48
Vitis spp.	0,38	*Xanthium* spp	0,05	*Zea* spp.	0,05
Toplam					**100**

İncelenen arı polenlerinin baldaki toplam polen sayısına (TPS10) oranı %45'in üzerinde ise dominant, %15-45 arasında sekonder, %3-15 arasında minör, %3'ten az ise eser polen şeklinde tanımlanmışlardır. Dominant polene sahip ballar "monofloral bal" olarak baskın taksonun adıyla isimlendirilmektedir (Louveaux vd., 1978). Yapılan değerlendirme sonucunda baldaki dominant taksonun *Castanea sativa* (Kestane) olduğu görülmüştür. Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'nde bu oran *Castanea sativa* taksonu için %70 olarak kabul edilmiştir (Anonim, 2020). Dikkat çeken diğer taksonlar arasında *Helianthus annuus* (Ayçiçeği), *Cistus* spp. (Laden) ve *Centaurea* spp. (Peygamber çiçeği) gibi çiçekli bitki türleri yer almaktadır. Yapılan inceleme sonucunda bal örneğinin kestane dominansına sahip monofloral bir çiçek balı olduğu görülmüştür, bu nedenle tez çalışmasında kestane balı olarak isimlendirilmiştir (Anonim, 2020).

Çalışma kapsamında polen içeriğinin incelenmesinin yanı sıra, her bir örnek için 10 g'da bulunan toplam polen sayısı (TPS10) da belirlenmiştir. Balın içerdiği toplam polen sayısının önemi birçok araştırmacı tarafından vurgulanmıştır. Maurizio (1979) balları TPS10 değerine göre 1, 2, 3, 4, 5 olmak üzere 5 kategoriye ayırmıştır. Çalışmada kullanılan balın TPS10 değeri 1.255.976 olup buna göre 5. kategoride (Maurizio, 1979) bir monofloral kestane balı olduğu tespit edilmiştir.

Balın polen tür tayini botanik ve coğrafi kaynağın belirlenmesi için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Fermente ürün üretiminde kullanılan balın floral çeşitliliği, fermentasyon sonucu oluşan aroma bileşenleri, asitlik düzeyi ve fonksiyonel özellikler üzerinde belirleyici rol oynayabilmektedir. Bu nedenle polen türünün belirlenmesi, kullanılan balın kalitesi ve ürüne katkısı açısından kıymetlidir.

4.1.2. Balın pH ve serbest asitlik sonuçları

Çalışmada kullanılan balın pH değeri 4,63±0,01 olarak ölçülmüştür (bkz. Çizelge 4.2). Literatürde balın pH aralığının 3,4-6,4 arasında değiştiği belirtilmektedir. Artvin yöresine ait kestane ballarında pH değerinin 4,60-5,40 aralığında değiştiği bildirilmiştir (Saral, 2023). Farklı ballara ait kalite parametrelerinin incelendiği bir çalışmada; ayçiçek balı örneklerinde pH değeri 3,95-4,58 iken, kanola balında ise 3,86-4,65 aralığında değişmekte, ayrıca ıhlamur balının pH'sı 4,15 olarak belirtilmiştir (Machado De-Melo vd., 2018).

Bal örneğinin titrasyon asitliği laktik asit cinsinden 22±0,1 mEq/kg olarak tespit edilmiştir. Serbest asitlik, balın kalite değerlendirmesinde önemli bir parametredir. Bu değerin 50 mEq/kg'ı aşması, fermentasyon sonucu bal içeriğindeki şekerlerin organik asitlere dönüşme ihtimalini göstermektedir. Serbest asitlik balın botanik kökeni, coğrafik özellikler ve muhafaza koşulları gibi etmenlerden etkilenmekte ve geniş bir aralıkta ölçümlenmektedir. Türkiye'nin farklı bölgelerinde üretilen kestane balları üzerine yapılan kapsamlı bir çalışmada serbest asitlik değerinin 12,2–45,8 mEq/kg arasında değiştiği bildirilmiştir (Koca vd., 2017).

Çizelge 4.2. İçecek üretiminde kullanılan balın kimyasal özellikleri

pH	Asitlik (mEq/kg)	İletkenlik (µS/cm)	Prolin (mg/kg)	Şeker İçeriği (g/100 g bal)			
				Fruktoz	Glukoz	Sakkaroz	Maltoz
4,63±0,01	22±0,1	303±2	429 ± 15	40,5 ± 0,5	40,2 ± 0,3	3,44 ± 0,11	2,90 ± 0,10

Sonuçlar aritmetik ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.1.3. Balın iletkenlik özelliği

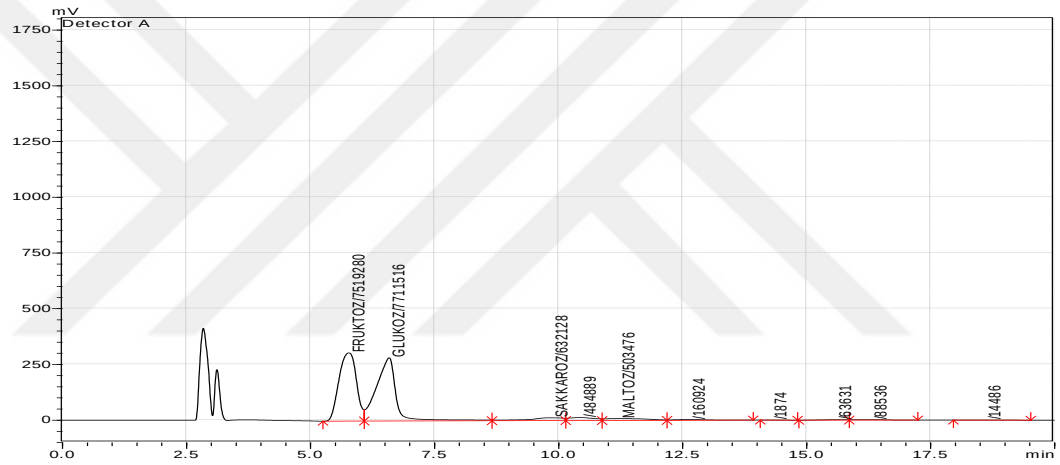
Balın elektriksel iletkenliği, içerdiği inorganik iyonlar, organik asitler ve proteinler gibi bileşenlerle yakından ilişkilidir. Bu parametre çiçek balı ile salgı balları arasında ayrım yapmak amacıyla kullanılabilecek basit bir ölçüm olup aynı zamanda balın orijinini belirlemeye yardımcı olabilmektedir. Bal şerbetinde kullanılan bal örneğinin iletkenlik değeri 303±2 µS/cm olarak ölçülmüş olup, elde edilen değer tebliğe uygun bulunmuştur (bkz. Çizelge 4.2). Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'ne göre, çiçek balının elektriksel iletkenliği en fazla 0,8 mS/cm olmalıdır (Apaydın, 2022). Kestane balı zengin mineral madde içeriğine sahip olması nedeniyle elektriksel iletkenlik parametresi açısından diğer çiçek ballarından belirgin şekilde ayrılmaktadır. Türkiye'nin Düzce ilinde üretilen kestane balları üzerine yapılan bir çalışmada örneklerin ortalama elektriksel iletkenlik değeri 1,0 mS/cm olarak bildirilmiştir (Yoldas vd., 2023). Kuzey Makedonya'nın Polog bölgesindeki kestane ballarının iletkenlik değerlerinin 1,04 ile 1,45 mS/cm aralığında değiştiğini belirtilmiştir (Kıprıjanovska vd., 2025). Çalışmamızda kullanılan balın iletkenliğinin literatürdeki kestane ballarının sahip olduğu iletkenlik değerlerinden daha düşük olduğu görülmüştür.

4.1.4. Balın şeker profili

Geliştirilen HPLC metodunun validasyon parametreleri; doğrusallık, gözlenebilme sınırı (LOD), tayin sınırı (LOQ) ve geri kazanım çalışmaları ile değerlendirilmiştir. Tüm şeker bileşenleri (fruktoz, glukoz, sakkaroz ve maltoz) için 0,1–2,0 g/100 mL konsantrasyon aralığında çalışılmış ve elde edilen kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayılarının (R^2) 0,9998 ile 0,9999 aralığında olduğu görülmüştür. Metodun hassasiyetini gösteren LOD ve LOQ değerleri sırasıyla; fruktoz için 0,02 ve 0,1, glukoz için 0,08 ve 0,3, sakkaroz için 0,03 ve 0,11, maltoz için ise 0,1 ve 0,3 g/100 mL olarak

hesaplanmıştır. Metodun doğruluğunu test etmek amacıyla yapılan geri kazanım çalışmalarında ise %91 (fruktoz) ile %102 (glukoz) arasında değişen yüksek geri kazanım oranları elde edilmiştir.

Analiz edilen bal örneğinin TS 13359 (Anonim, 2008a)'a göre belirlenen temel şeker bileşimi, 40,5±0,5 g/100 g fruktoz ve 40,2±0,3 g/100 g glukoz olarak tespit edilmiştir. Aynı örnekte sakkaroz içeriği 3,44±0,11 g/100 g, maltoz içeriği ise 2,90±0,10 g/100 g olarak bulunmuştur (bkz. Çizelge 4.2). Bu değerlerin hem Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (Anonim, 2020), hem de Codex Alimentarius (Codex Stan. 12-1981) ile uyumlu olduğu görülmüştür.



Şekil 4.1 Bal örneğine ait kromatogram

Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'nde 100 gram balda toplam glukoz ve fruktoz miktarının en az 60 gr olması gerektiği belirtilmiştir (Anonim, 2020). Yine aynı tebliğde sakkaroz içeriği için belirlenen değerin maksimum 5g /100 g olduğu görülmüştür. Tebliğ açısından değerlendirildiğinde örneğin doğal ve tağşiş edilmemiş olduğu görülmektedir. Bal örneklerinde görülen yüksek sakkaroz ve maltoz seviyelerinin bala şeker şurubu eklendiğinin bir göstergesi olabileceği ifade edilmektedir.

Literatürde, balın şeker profilinin coğrafi konum, floral kaynaklar ve farklı uygulamalara bağlı olarak değişkenlik gösterebileceği bildirilmektedir. Çiçek ve salgı ballarının incelendiği bir çalışmada çam, meşe, kestane ve multifloral bal örnekleri

karşılaştırılarak ayırt edici özellikleri değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda glukoz miktarının çiçek ve kestane ballarında (%30,9 ve %26,66) çam ve meşe ballarına göre (%22,27 ve %26,18) göre yüksek oranda olduğu görülmüştür. Fruktoz ve maltoz gibi şekerlerde ise belirgin farklılıklara rastlanmamıştır (Ucurum vd., 2024). Akasya balında fruktoz %39,5-%47,0 arasında iken, glukoz oranının %32-%35 arasında değiştiği bildirilmiştir. Aynı örneklerdeki sakkaroz oranı ise %5,1-%7,3 olarak tespit edilmiştir (Mongi ve Ruhembe, 2024). Tez kapsamında kullanılan balda benzer çalışmalardan daha yüksek oranda glukoz ve fruktoza rastlanırken, sakkaroz ve maltoz miktarının bu çalışmalarla doğru orantılı olduğu görülmüştür.

Balın sahip olduğu polen profili göz önüne alındığında şeker içeriği daha iyi anlaşılmaktadır. Kolayli vd., (2016) inceledikleri kestane ballarında glukoz oranının %20,50-%22,78 arasında, fruktozun ise %36,40-%42,82 arasında değiştiğini bildirmiştir. Örneklerde sakkaroza rastlamazken, maltoz oranının da %1,5'ten küçük olduğu görülmüştür. Bu bakımdan değerlendirildiğinde, bal örneğinin kestane ve diğer çiçek ballarının karakteristik özelliklerini barındırdığı görülmektedir.

Balın şeker profilinin, fermente üründeki mikrobiyal gelişim ve metabolik aktivite üzerinde doğrudan etkiye sahip oldukları bilinmektedir. Özellikle fruktoz ve glukoz, mikroorganizmalar için kolayca kullanılabilir karbon kaynaklarıdır ve fermentasyon sürecinde laktik asit bakterileri veya mayalar tarafından tercih edilmektedir. Balın şeker profili, fermentasyonun başlangıç hızını, mikroorganizma gelişimini ve son ürünün asitlik, pH ve aroma profili gibi özelliklerini belirlemektedir. Balın şeker profilini bilmek, fermentasyon sürecini optimize etmek ve standart bir ürün geliştirme açısından önemlidir.

Tez kapsamında kullanılan bal örneğinin fruktoz/glukoz oranı ≈1,01 olarak belirlenmiştir. Bu oranın ≥1 olması arzu edilen bir durumdur ve kristalleşme hızının bir göstergesidir (Anonim, 2020). Fermentasyon süreçlerinin standartlaştırılması açısından balın şeker profilinin (özellikle fruktoz/glukoz oranı) karakterize edilmesi gerekmektedir. Bu parametrelerin fermentasyon kinetiği üzerindeki etkisinin anlaşılması, tekrarlanabilirliğinin sağlanmasında kritik rol oynamaktadır.

4.1.5. Balın prolin miktarı

Fermentasyonda kullanılan balın prolin miktarı TS 13357 (Anonim, 2008b) standardına göre belirlenmiş ve 429 ± 15 mg/kg olarak tespit edilmiştir (bkz. Çizelge 4.2). Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'nde çiçek ballarında prolin miktarının en az 300 mg/kg olması gerektiği belirtilmiştir (Anonim, 2020). Bu değer kestane balında 500 mg/kg olarak belirlenmiştir. Bal örneğinin prolin miktarı çiçek balı için Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'ndeki asgari değeri karşılamakta; ancak kestane balı için Tebliğ'de tanımlanan özel eşik değer olan ≥ 500 mg/kg'ın altında kalmaktadır.

Prolin, bal içerisindeki serbest amino asitlerin en baskını olup balın olgunluk, doğallık ve işlenmemişlik durumunun değerlendirilmesinde geçerli bir kalite göstergesidir (Yang vd., 2024). Literatürde, düşük prolin içeriğinin (<180 mg/kg) balda olgunlaşmamışlık ya da şeker katkısı ihtimaline işaret ettiği vurgulanırken, ayrıca prolinin antioksidan kapasitelerle ilişkili olduğu da belirtilmiştir (Damto vd., 2023). Polen içeriklerinin amino asitler nedeniyle balın bileşimine katkı sağladığı bilinmektedir (Sommano vd., 2020), Bu sebeple çalışmada kullanılan bal örneğinin polen karakterizasyonu ile belirlenen bileşime uygun prolin seviyelerine sahip olması, analiz sonuçlarının hem botanik uygunluk hem de kalite kriterleri açısından kabul edilebilir olduğunu göstermektedir.

Prolin içeriği, balın fermentasyon sürecindeki probiyotik gelişimi için potansiyel bir nitrojen kaynağı olması bakımından işlevsel bir gösterge olarak değerlidir. Yapılan bir çalışmada *Lacticaseibacillus paracasei* suşlarında prolinin laktik asit üretimini pozitif yönde etkilediği bildirilmiştir (Tian vd., 2016). Bununla birlikte, prolinin fermentasyon sürecine etkisi tez çalışmasında izole edilen probiyotik özelliğe sahip suş *E. faecalis*'e göre değerlendirilmesi gerekmektedir. Literatürde, *E. faecalis*'in çoğalması için esas olan amino asitlerin arginin, histidin, metiyonin, triptofan, lösin, izolösin ve valin olduğu ve prolinin bu listeye dahil edilmediğini görülmektedir (Liu vd., 2020). Ayrıca mikroorganizmanın amino asit metabolizmasında glutamin–glutamat döngüsünün merkezi rol oynaması (Veith vd., 2015), prolinin tek başına bakteri çoğalması veya fermentasyon aktivitesine anlamlı katkı sağlamamasını açıklar niteliktedir.

4.1.6. Balın toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasite

Balın toplam fenolik madde miktarı; balın kalitesini, besin değerini ve biyolojik kapasitesini belirleyen önemli parametrelerdir. Fermente bir ürün üretirken kullanılan balın bu özelliklerini bilmek, ürünün fonksiyonel özelliklerini öngörmek açısından önem taşımaktadır. Bu kapsamda yapılan analizlerde bal örneğinin toplam fenolik madde içeriğinin 1,64±0,11 mg GAE/g bal ve antioksidan kapasitesinin ise 0,42±0,01 µmol TE/g bal olduğu tespit edilmiştir.

Akgün vd., (2021) Ordu iline ait kestane ballarının toplam fenolik madde içeriğini ortalama 0,12±0,03 mg GAE/g bal olarak bildirmiştir. Sarikaya vd., (2009) ise Zonguldak ilinden temin ettikleri kestane balının toplam fenolik içeriğinin 2,79 ±0,09 mg GAE/g bal olarak iletmiştir. Saral (2023), Artvin ili ve çevresine ait toplam 8 kestane balı örneğini değerlendirdiği çalışmada toplam fenolik madde içeriğinin 52,19±0,02-92,42±0,03 mg GAE/100 g bal aralığında değiştiğini tespit etmiştir. Silici ve Ülgen (2019) tarafından farklı çiçek ve salgı ballarının incelendiği bir çalışmada kestane balının toplam fenolik içeriğinin 212,06 mg GAE/100g bal olduğu belirtilmiştir. Literatürde, balın toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan kapasitesinin önemli ölçüde farklılık gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu farklılıklar, çevresel koşullar, balın polen içeriği ve dönemsel değişiklikler gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanmaktadır.

4.1.7. Arı ekmeğinin palinolojik özellikleri

Çalışma kapsamında probiyotik potansiyele sahip olduğu belirlenen ve fermente bal içeceği üretiminde kullanılan LAB izolatının elde edildiği arı ekmeği palinolojik olarak incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Analiz edilen arı ekmeği örneğinde, polen spektrumunun büyük bir kısmının (%67,84) *Castanea sativa* (kestane) polenlerinden oluştuğu görülmüştür. Bu durum, söz konusu bölge ve dönemde kestane ağaçlarının yoğun çiçeklenme gösterdiği veya bölgedeki baskın floristik elemanlardan biri olduğu anlamına gelmektedir. Tespit edilen diğer

taksonlar; Fabaceae (%11,36), Lamiaceae (%3,43) familyalarına ve *Plantago* spp. (%7,26) ait tek yıllık otsu bitki ve çiçeklere ait polenler olmuştur.

Çizelge 4.3. Arı ekmeği örneğinde belirlenen bitki taksonlarının polen yüzdeleri

Takson	**Polen (%)**	**Takson**	**Polen (%)**	**Takson**	**Polen (%)**
Castanea sativa	67,84	Fabaceae	11,36	*Plantago* spp.	7,26
Lamiaceae	3,43	Dipsacaceae	2,17	Asteraceae	1,80
Apiaceae	1,09	*Centaurea* spp.	1,09	*Tilia* spp.	1,05
Trifolium repens	0,78	*Ranunculus* spp.	0,47	*Salix* spp.	0,27
Olea europaea	0,31	Cichorioideae	0,20	*Hedera helix*	0,17
Rosaceae	0,17	Poaceae	0,10	*Trifolium pratense*	0,10
Platanus spp.	0,10	Rubiaceae	0,07	*Artemisia* spp.	0,07
Vitis spp.	0,07	*Sarco/Poterium*	0,03		
Toplam					**100**

Arı ekmeğinde gerçekleştirilen polen tür tayininin, mikrobiyal topluluğun yapısını ve işlevselliğini anlamlandırmada faydalı olabileceği düşünülmektedir. Çünkü LAB çeşitliliği ve ortamdaki baskın türler, polenin floral kaynağı ile doğrudan ilişkilidir (Anderson vd., 2013). Lignon vd. (2025)'de yer alan bulgular, farklı bitki türlerinden elde edilen polenlerin mikrobiyotasını yüksek çözünürlüklü 16S rRNA gen sekanslama yöntemiyle analiz etmiş ve sonuçlar polene eşlik eden bakteriyal toplulukların çiçek türüne göre farklılık gösterdiğini açıkça ortaya koymuştur. Özellikle, belirli floral kaynaklarda *Lactobacillaceae* ve diğer fermentatif bakterilerin daha yüksek oranda bulunduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde, Ruiz Rodríguez vd. (2019), sekiz farklı tropikal meyve ve dört farklı çiçekten elde ettikleri örneklerde LAB izolasyonunu kültür-temelli yöntemlerle gerçekleştirmiş, ardından genotiplendirme (RAPD-PCR ve 16S rRNA dizi analizi) ile 95 farklı suşu karakterize etmiştir. Örneklerde *Enterococcus, Fructobacillus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc* ve *Weissella* gibi 21 farklı LAB türü tespit edilmiştir. Bu suşların teknolojik özelliklerini (asit üretim kapasitesi, şeker metabolizması ve hidrolitik enzim aktiviteleri) karşılaştırarak, kaynak bitkiye bağlı olarak genetik ve fonksiyonel çeşitlilik gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Ayrıca arı poleni kaynaklı kimyasal bileşenler, fermentasyon sürecini ve son ürünün biyokimyasal özelliklerini şekillendirmektedir. Arı ekmeğinden direkt fermente edilen ballı içeceğin sahip olduğu aroma ve lezzet unsurları büyük oranda içeriğindeki arı poleninden kaynaklanmaktadır.

Uțoiu ve diğerleri (2018) tarafından yapılan çalışmada, arı polen ilavesinin kombucha fermentasyon sistemindeki mikrobiyal topluluk yapısını doğrudan etkilediği ortaya konmuştur. Real Time PCR ve klasik plak sayımı sonuçlarına göre, arı poleni eklenen fermentasyon ortamında laktik asit bakterilerinin oranı kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artış göstermiştir. Bu bulgu, polen bileşenlerinin (örneğin serbest şekerler, proteinler ve polifenoller) LAB için ilave besin ve enerji kaynağı sağlayarak, bu grubun toplam mikrobiyota içerisindeki baskınlığını güçlendirdiğini göstermektedir. Ayrıca elektron tarama mikroskobu (SEM) analizleri, bakterilerin polen taneciklerinin yüzeyine aktif olarak tutunduğunu ve bu esnada polen içeriğinde yer alan bileşiklerin fermentasyon ortamına salındığını ortaya koymuştur. Böylece arı poleni, yalnızca pasif bir substrat değil, aynı zamanda mikrobiyal kolonizasyonu kolaylaştıran ve fermentatif metabolit akışını hızlandıran aktif bir yapı taşı işlevi görmüştür.

Her bitki türü kendine özgü fitokimyasal bileşikler (fenoller, flavonoidler, eterik yağlar vb.) içermektedir ve bu bileşikler bazı mikroorganizmalar için seçici bir ortam oluşturmaktadır. Takó ve diğerleri (2020) bitkisel fenoller, flavonoidler ve taninlerin; biyofilm oluşumunu engelleme, quorum sensing'i baskılama, enterotoksin üretimini azaltma gibi mikrobiyal davranışlara karşı antibiyotik benzeri etkiler gösterebildiğini bildirmiştir. Bu bağlamda, arı ekmeğini de içerdiği floraya bağlı fitokimyasal itibarıyla fermentasyon sistemlerinde mikrobiyal seçilimde kritik rol oynayabileceği düşünülmektedir. Nitekim arı ekmeğinin sahip olduğu kestane polenin metanol ekstraktlarının kullanıldığı disk difüzyon testleri sonucunda, *C. sativa* polen ekstraktının özellikle Gram pozitif bakterilere karşı belirgin inhibitör aktivite sergilediği ve Gram negatiflere karşı orta düzeyde bir etki gösterdiğini raporlamıştır (Avşar vd., 2016). İleri çalışmalarda, arı ekmeği örneklerinin polen içeriği ile kimyasal kompozisyonu ve mikrobiyal yapısının birlikte değerlendirilmesi, bu ürünün dinamik biyolojik yapısının daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

4.1.8. Arı ekmeğinin toplam protein miktarı

Çalışma kapsamında fermente bal içeceği üretim denemelerinde kullanılan arı ekmeğinin ham protein içeriği %21,8±0,1 olarak tespit edilmiştir. Literatür

incelendiğinde tespit edilen değerin diğer çalışma sonuçları ile uyumlu olduğu görülmüştür (Urcan vd., 2017; Kaplan vd., 2019).

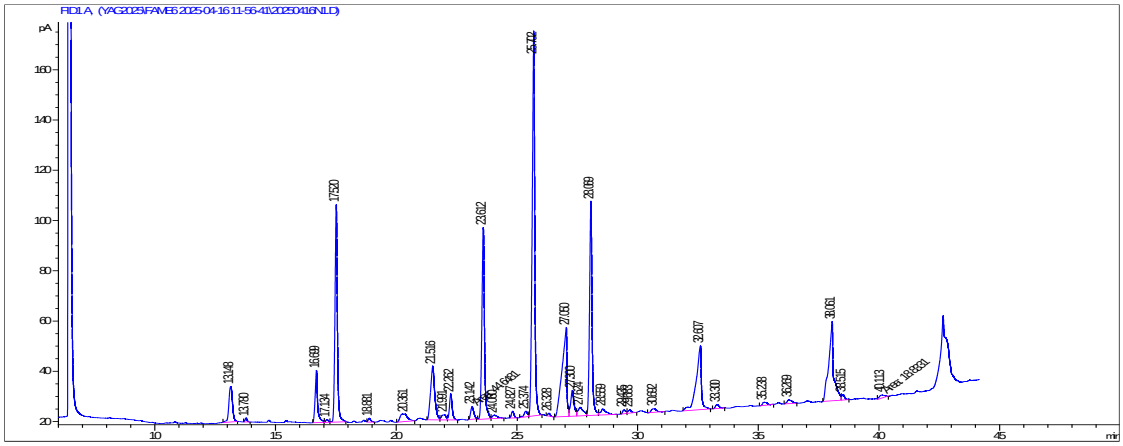
Arı ekmeğinin toplam protein içeriğinin değerlendirildiği bir çalışmada, bu değer 21,70–23,33 g/100 g aralığında bulunmuştur (Mohammad vd., 2020a). Marković vd., (2012) yaptıkları çalışmada arı ekmeğinin toplam ham protein miktarının %29,93 olduğunu bildirmiştir. Arı ekmeğinin protein içeriğinin, arı türüne ve çevresel koşullara (iklim, floral çeşitlilik, toprak kompozisyonu) bağlı olarak değişkenlik göstermesi nedeniyle sonuçlar farklılık göstermektedir.

Arı ekmeğinin içerdiği protein miktarı hem ürünün mikrobiyotası hem de bu üründen elde edilecek içeceğin fonksiyonel özelliğini anlama açısından destekleyici niteliktedir (Barta vd., 2022). Arı ekmeğindeki proteinler, laktik asit bakterileri için kritik bir azot kaynağı oluşturarak çoğalma, metabolizma ve biyokütle üretimini desteklerken; hidroliz sonucu açığa çıkan amino asitler, aroma çeşitliliğini ve besinsel değeri artırarak fonksiyonel bir gıda profiline katkı sağlamaktadır (Urcan vd., 2024). Bununla birlikte probiyotiklerin ihtiyaç duyduğu amino asitlerin değişkenlik gösterdiği unutulmamalıdır. Ayrıca laktik asit bakterilerinin belirli bazı amino asitleri sentezleyemediği ve bu bileşenleri ya da öncüllerin dışarıdan alması gerektiği bilinmektedir (Zengler ve Zaramela, 2018). Bazı amino asitler probiyotiklerin çoğalması ve metabolik aktivitelerini desteklerken, bazıları nötr etki gösterebilmekte, hatta belirli koşullarda inhibe edici etki yaratabilmektedir (Gänzle, 2015). Örneğin, *Lactobacillus plantarum* suşlarının dallanmış zincirli amino asitlerin varlığında daha yüksek biyokütle ürettiği ve bu amino asitlerin aroma bileşiklerinin öncüleri olarak metabolizmaya katkıda bulunduğu belirtilmektedir (Gänzle, 2015). Ayrıca triptofanın *Lactobacillus reuteri* tarafından indol türevleri ve nöroaktif bileşiklerin üretiminde kullanıldığı da gösterilmiştir (Pessione, 2012). Khan vd., (2013) tarafından geliştirilen tanımlı ortam çalışmasında, arjinin, glisin, histidin, izolösin, lösin, metiyonin, triptofan ve valinin *E. faecalis* B9510'un çoğalması için açıkça esansiyel olarak tanımlanmıştır. Arı ekmeğinin amino asit profiline bakıldığında ise özellikle lösin, izolösin ve fenilalanin gibi amino asitlerin yüksek düzeylerde bulunduğu, buna karşılık metiyonin ve triptofan miktarlarının görece düşük seviyelerde rapor edildiği görülmektedir (Uțoiu vd., 2018).

Bu durum, arı ekmeğinin *E. faecalis* için bazı kritik ihtiyaçları karşılama kapasitesine sahip olduğunu, fakat metiyonin ve triptofan eksikliklerinin çoğalmayı sınırlayabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla arı ekmeği, probiyotik gelişimi açısından değerli bir azot kaynağı olmakla birlikte, *E. faecalis*'in tam potansiyelini ortaya çıkarabilmesi için özellikle metiyonin ve triptofan gibi sınırlayıcı amino asitlerin ek katkılarla desteklenmesi gerekebileceği düşünülmektedir.

4.1.9. Arı ekmeğinin yağ asidi kompozisyonu

Arı ekmeği örneğinin yağ asidi kompozisyonu Çizelge 4.4'te verilmiştir. Arı ekmeği örneğinin yağ asidi profili incelendiğinde çoklu doymamış yağ asitlerinin toplam yağ asitlerinin %52,3'ünü oluşturduğu görülmüştür. Bu grupta linoleik asit (C18:2c, %30,2) ve α-linolenik asit (C18:3n3, %11,6) öne çıkan bileşenlerdir. Bu bileşenlerin esansiyel yağ asitleri olması, ayrıca araşidonik asit ve EPA/DHA öncülleri olarak arı ekmeğinde yüksek oranda bulunmaları besleyicilik açısından oldukça kıymetlidir. Tekli doymamış yağ asitleri %17,4 ile temsil edilirken, oleik asit (C18:1c, %10,8) buradaki başlıca bileşendir. Toplam doymuş yağ asitleri oranı %27,8 olup, palmitik asit (C16:0, %10,7) ve miristik asit (C14:0, %2,69) oranları görece fazladır.



Şekil 4.2. Arı ekmeği örneğinin yağ asidi kromatogramı

Arı ekmeğinin yağ asidi kompozisyonu ile polen içeriği arasındaki korelasyon incelendiğinde, polen kaynaklarının arı ekmeğinin lipid profilini şekillendirmede önemli faktörlerden olduğu anlaşılmaktadır (Kaplan, 2016; Urcan vd., 2021). Arı

ekmeğinde yüksek oranda doymamış yağ asitleri saptanmış olup özellikle linoleik asit ve α-linolenik asit gibi temel çoklu doymamış yağ asitlerinin baskınlığı dikkat çekmektedir. Bu profilin, özellikle *Fabaceae* (baklagiller), *Plantago* spp. ve *Lamiaceae* familyalarına ait polenlerin yoğunluğu ile ilişki olduğu düşünülebilir. Bu bitkiler genellikle yüksek çoklu doymamış yağ asidi içeriği ile bilinmektedir (Cacan vd., 2018; Doan vd., 2019). Ayrıca, arı ekmeğinin en baskın polen kaynağı olan *Castanea sativa* (%67,84), linoleik asit bakımından zengindir ve bu durumun yağ asidi dağılımına katkı sağladığı söylenebilir (Conte vd., 2017). Arı ekmeğinde saptanan düşük düzeydeki doymuş yağ asitleri ve orta seviyede tekli doymamış yağ asitleri varlığı da polen kaynaklarının çoğunlukla çiçekli bitkilerden oluştuğu görüşünü desteklemektedir.

Arı ekmeğinin içerdiği yağ asitleri, özellikle doymamış yağ asitleri (oleik asit, linoleik asit) LAB için enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca laktik asit bakterilerinin ürettiği spesifik yağ asitleri de bulunmaktadır (Ogawa vd., 2005). Laktik asit bakterilerinin farklı mekanizmalarla yağ asitlerini dönüşüme uğrattığı da bilinmektedir. Probiyotik potansiyele sahip olabilecek *E. faecalis*'in dış çevreden sağlanan kısa ve orta zincirli yağ asitlerini hücre zarına entegre edebildiği ve bunları uzatarak daha uzun zincirli yağ asitlerine dönüştürebildiği gösterilmiştir (Zou vd., 2024).

Literatürde, serbest yağ asitlerinin bakteriler üzerinde çift yönlü etki gösterdiği belirtilmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda zar yapısını bozarak antimikrobiyal veya bakteriostatik baskı oluşturduğu (Desbois vd., 2010) ya da bazı LAB suşlarının bu asitleri dönüştürerek faydalı metabolitler ürettiği bildirilmektedir (Muller vd., 2011). Etkinin yönü ise esas olarak konsantrasyon, suş ve matriks koşullarına bağlı olarak değişmektedir (Desbois vd., 2010).

Çizelge 4.4. Arı ekmeği örneğinin yağ asidi kompozisyonu (%)

Yağ Asidi (Karbon Zinciri)	% Oranı	Yağ Asidi (Karbon Zinciri)	% Oranı
Bütirik Asit (C4:0)	<0,05	Palmitoleik Asit (C16:1)	0,22 ± 0,02
Kaproik Asit (C6:0)	<0,05	Heptadesenoik Asit (C17:1)	4,59 ± 0,08
Kaprilik Asit (C8:0)	<0,05	trans Elaidik Asit (C18:1t)	0,58 ± 0,03
Kaprik Asit (C10:0)	<0,05	Oleik Asit (C18:1c)	10,8 ± 0,20
Undekanoik Asit (C11:0)	<0,05	Eikosenoik Asit (C20:1)	0,64 ± 0,04
Laurik Asit (C12:0)	<0,05	Erusik Asit (C22:1)	<0,05
Tridekanoik Asit (C13:0)	<0,05	Nervonik Asit (C24:1)	0,32 ± 0,07
Miristik Asit (C14:0)	2,69 ± 0,19	trans Linolelaidik Asit (C18:2t)	0,44 ± 0,01
Pentadekanoik Asit (C15:0)	2,64 ± 0,01	Linoleik Asit (C18:2c)	30,2 ± 1,50
Palmitik Asit (C16:0)	10,7 ± 0,10	trans Linolenik Asit (C18:3t)	<0,05
Margarik Asit (C17:0)	0,08 ± 0,02	γ-Linolenik Asit (C18:3n6)	1,68 ± 0,13
Stearik Asit (C18:0)	2,01 ± 0,01	α-Linolenik Asit (C18:3n3)	11,6 ± 1,20
Arişidik Asit (C20:0)	0,86 ± 0,11	Eikosadienoik Asit (C20:2)	0,38 ± 0,05
Heneikosanoik Asit (C21:0)	0,29 ± 0,02	Eikosatrienoik Asit (C20:3n6)	6,48 ± 0,08
Behenik Asit (C22:0)	<0,05	Eikosatrienoik Asit (C20:3n3)	0,36 ± 0,01
Trikosanoik Asit (C23:0)	0,35 ± 0,01	Araşidonik Asit (C20:4)	0,25 ± 0,02
Lignoserik Asit (C24:0)	8,19 ± 0,30	Dokosadienoik Asit (C22:2)	0,65 ± 0,05
Miristoleik Asit (C14:1)	0,08 ± 0,01	Eikosapentaenoik Asit (C20:5)	<0,05
Pentadekenoik Asit (C15:1)	0,19 ± 0,03	Dokosahegzaenoik Asit (C22:6)	0,32 ± 0,01

Sonuçlar aritmetik ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

Arı ekmeği örneğinin yağ asidi profili incelendiğinde genel olarak dengeli bir yapı görülmektedir. Linoleik asit (LA, %30,2) yüksekliğinin, *Enterococcus* ve *Lactobacillus* gibi suşlarda konjuge linoleik üretimi yoluyla fonksiyonel katkı sağlayabileceği; ancak serbest LA düzeyinin çok artmasının çoğalma hızını yavaşlatabileceği belirtilmektedir (Desbois vd., 2010). Eikosatrienoik asit (C20:3 n-6, %6,5) düşük ve orta seviyelerde membran modülasyonu yoluyla stres toleransını desteklerken, yüksek düzeylerde

bakteriostatik etki gösterebilmektedir (Desbois vd., 2010). Oleik asit (OA, %10,8) ise membrana entegre olarak hidrofobisite, adezyon ve asit-safra-ısı toleransını artırabilmektedir (Muller vd., 2011). Bu üç yağ asidinin birlikte değerlendirilmesi, özellikle membranını dış yağ asitleriyle yeniden düzenleyebilen *E. faecalis* gibi suşlarda net etkinin olumluya yakın olduğunu göstermektedir (Zou vd., 2024). Bununla birlikte, serbest uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinin kontrol altında tutulması önemlidir Arı ekmeğindeki bu yağ asitlerinin düzeylerinin probiyotik gelişimi beklenen ölçüde desteklememiş olabileceği, hatta kısmen sınırlandırıcı bir rol oynamış olabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır (Desbois vd., 2010). Ürünün kalitesi, mikrobiyotası ve biyoaktif özellikleri üzerinde yağ asitlerinin etkisi, daha kapsamlı ve detaylı araştırmalar gerektiren bir konudur. Bu tez çalışmasında elde edilen bulgular, ileri çalışmalar için önemli bir temel oluşturmakta ve bu alanda yeni araştırma perspektifleri sunmaktadır.

4.1.10. Arı ekmeğinin toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasitesi

Üretilen bal içeceğinin fermentasyonu amacıyla izolatın yanı sıra arı ekmeği de kullanılmıştır. Bu nedenle arı ekmeğinin toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasitesi belirlenmiştir. Arı ekmeğinin toplam fenolik madde içeriği 34,10±2,24 mg GAE/g ve antioksidan kapasitesi troloks eşdeğeri cinsinden 128±1 μmol/g'dır. Elde edilen bu veriler, son ürünün kimyasal ve biyolojik özelliklerinin yorumlanmasında ve fonksiyonel niteliklerinin ortaya konulmasına katkı sağlamaktadır.

Literatür incelendiğinde arı ekmeğinin toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan kapasitesi; coğrafi bölge, floral kaynaklar ve arı türlerine göre önemli ölçüde değişkenlik göstermiştir. Yapılan çalışmalarda toplam fenolik madde içeriğinin 4,4-84,0 mg GAE/g aralığında çok farklı değerlerde olduğu görülmüştür (Aylanc vd., 2021). Anadolu bal arısına ait örneklerde 13,26 ve 32,45 mg GAE/g ile 11,90 ve 14,77 mg GAE/g gibi farklı aralıklarda fenolik madde içeriği tespit edilirken, Romanya ve Hindistan orijinli örneklerde 5,67 ve 12,83 mg GAE/g aralığında saptanmıştır (Kalaycıoğlu vd., 2023; A. Urcan vd., 2017). Mayda vd., (2020) inceledikleri arı poleni ve arı ekmeği örneklerinde toplam fenolik madde içeriğinin 8,26-43,42 mg GAE/g arasında değiştiğini belirtmiştir. Toplam fenolik içeriği açısından sonuçların uyumlu

olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada arı ekmeği için 3,820 mg TEAC/g örnek değeri ise tez çalışması kapsamında kullanılan arı ekmeğine göre oldukça düşük bulunmuştur (Mayda vd., (2020). Ilie vd., (2024) inceledikleri 12 arı ekmeğinde en yüksek kapasiteye sahip örneğin antioksidan kapasitesinin 0,07 mmol TE/g arı ekmeği olduğunu bildirmiştir. Mevcut çalışmalar ile kıyasladığında; arı ekmeği örneğinin antioksidan kapasitesinin üst seviyede olduğu görülmüştür.

Arı ekmeğinin toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan kapasitesi, bal örneklerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($p<0,05$) daha yüksek bulunmuştur. Arı ekmeğinin bala kıyasla daha yüksek fenolik içerik ve antioksidan kapasiteye sahip olması, birkaç temel mekanizmayla açıklanmaktadır. Arı ekmeğinin polen içeriği fazla iken, bal nektar esaslıdır. Bununla birlikte arı ekmeği hazırlanırken peteklerin fenolik madde bakımından zengin propolis ile kaplandığı bilinmektedir (Anjum vd., 2019). Ayrıca, devam eden enzimatik ve mikrobiyal süreçlerin arı ekmeğinin fenolik bileşimini zenginleştirdiği düşünülmektedir (Kieliszek vd., 2018).

4.2. Toplanan Arı Ekmeklerinin Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

4.2.1. Toplam mezofilik aerobik canlı bakteri sayısı

Arı ekmeği doğası gereği zengin bir mikrobiyotaya sahiptir. Bu yapıdaki farklı mikroorganizmaları ve bunların ürüne etkisini anlamlandırmanın ilk adımı toplam canlı bakteri sayımıdır. Arı ekmeği örneklerinde toplam mezofilik aerobik canlı bakteri (TMACB) sayısı 2,52±0,01-7,98±0,03 log kob/g arasında tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5'te verilmiştir. Örneklerin toplam mezofilik aerobik canlı bakteri sayıları arasında farklılıklar görülmüştür. Örneklerden elde edilen en düşük TMACB sayısı düşük ölçekli üretim yapılan bir arılıktan temin edilen arı ekmeğinde, en yüksek bakteri sayımı ise Bursa İnegöl'de ticari arıcılık faaliyetinde bulunan bir işletmeye ait arı ekmeği örneğinden alınmıştır. Elde edilen veriler örneklerin mikrobiyal bileşimini ve çeşitliliğini yansıtmaktadır. Literatüre göre, arı ekmeğinde toplam mezofilik aerobik canlı bakteri sayısı genellikle 10^5-10^7 (kob/g) arasında değişmektedir (Combey, 2017; Jaya vd., 2020). Bununla birlikte, *Heterotrigona itama* cinsi arılara ait arı ekmeğinde

yapılan bir çalışmada örneklerdeki toplam aerobik mezofilik canlı bakteri sayısının $1,1x10^3$- $8,6x10^3$ kob/g arasında olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmadaki bir örnekte ise tespit edilebilen bir üremeye rastlanmadığı belirtilmiştir (Ngalimat vd., 2019). Sayım sonuçlarındaki değişkenliğin bölge ve arılıkların özelliklerinden, numunelerin toplama şekillerinden ve hasat sonrası depolama koşullarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ticari olarak satılan arı ekmekleri genellikle dondurularak peteklerden ayrılmakta ve kurutularak muhafaza edilmektedir, mevcut yöntemler ürünün sahip olduğu mikrobiyotanın zarar görmesine neden olmaktadır. Çalışma kapsamında arı ekmekleri bütünlüğünün korunmasına dikkat edilerek özel bir aparat yardımıyla tek tek çıkarılmıştır.

Çizelge 4.5. Arı ekmeği örneğine ait sayım sonuçları (log kob/g)

Kovan Kodu	TMAB	TKM	MRS*	M17*	KAA*
İT1	$3,15±0,21^{fA}$	$2,70±0,00^{fgA}$	$3,15±0,21^{gA}$	<1,00	<2,00
İT2	$3,50±0,28^{fA}$	$2,24±0,34^{gB}$	$3,30±0,00^{gA}$	<1,00	<2,00
KF1	$3,98±0,03^{eA}$	$3,82±0,11^{deA}$	$3,15±0,21^{gB}$	<1,00	<2,00
KF2	$3,39±0,12^{fA}$	$2,15±0,21^{gB}$	$3,00±0,00^{gA}$	<1,00	<2,00
YK1	$3,11±0,05^{fB}$	$4,46±0,02^{cdA}$	$1,45±0,21^{iC}$	<1,00	<2,00
YK2	$3,41±0,05^{fA}$	$3,36±0,05^{efA}$	<1,00	$1,39±0,12^{hB}$	<2,00
YG1	$3,30±0,03^{fA}$	$1,00±0,00^{hC}$	$2,20±0,04^{hB}$	$2,19±0,16^{gB}$	<2,00
YG2	$3,41±0,02^{fA}$	$3,09±0,07^{fgB}$	$1,00±0,00^{jC}$	<1,00	<2,00
İÇ	$4,62±0,03^{dA}$	$4,72±0,38^{cA}$	$5,21±0,03^{dA}$	$4,59±0,02^{dA}$	$3,08±0,05^{cB}$
İB	$2,52±0,01^{gE}$	$4,40±0,06^{cdB}$	$4,74±0,02^{eA}$	$4,02±0,09^{eC}$	$3,30±0,00^{bD}$
YT	$5,80±0,14^{cA}$	$4,15±0,21^{cdB}$	$5,94±0,01^{cA}$	$3,49±0,08^{fC}$	<2,00
ÇG	$5,88±0,01^{cD}$	$7,01±0,03^{aB}$	$7,48±0,00^{aA}$	$5,32±0,00^{cE}$	$6,94±0,02^{aC}$
GA	$7,30±0,03^{bA}$	$4,63±0,21^{cC}$	$6,44±0,01^{bB}$	$7,09±0,08^{bA}$	$6,94±0,02^{aA}$
İH	$7,98±0,03^{aA}$	$6,15±0,21^{bC}$	$4,10±0,02^{fD}$	$7,99±0,01^{aA}$	$6,89±0,04^{aB}$
BK	$4,78±0,07^{dB}$	$4,30±0,00^{cdC}$	$5,43±0,1^{dA}$	$4,58±0,03^{dB}$	<2,00

Sonuçlar aritmetik ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen örneklere dair değerler arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,05$). Aynı satırda farklı büyük harflerle gösterilen analiz değerleri arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,05$). TMACB: Toplam mezofilik aerobik canlı bakteri sayısı, TKM: Toplam Küf Maya Sayısı, *Kullanılan besiyeri; MRSA: Man Rogosa ve Sharpe Agar, M17: M17 Agar, KAA: Kanamycin Aesculin Azide Agar. Kovan Kodu; İT, İT2: İnegöl/Tahtaköprü; KF1, KF2: Kestel/Fidyekızık; YK1, YK2: Yalova/Kurtköy; YG1, YG2: Yalova/Güneyköy; İÇ: İstanbul/Çatalca; İB: İstanbul/Başıbüyük; YT: Yalova/Taşköprü; ÇG: Yalova, Çınarcık/Güllük; GA: Gemlik/Ata; İH: İnegöl/Hocaköy; BK: Bursa/Karacabey.

Arı ekmeği örneklerinin toplandığı zaman, fermentasyon süreci, içeriğindeki bileşenler de bu farklılığa katkıda bulunmaktadır. Arı ekmeğinin fermentasyonu sırasında mikrobiyal dinamiklerin incelendiği bir çalışmada, TMAB seviyelerinin

fermentasyonun ilk 14 günü boyunca arttığı ve depolama sürecinde zamanla azaldığını belirtilmiştir (Poyraz vd., 2023). Bahsi geçen tüm etkilerin arı ekmeğinin mikrobiyotasını şekillendirdiği açıkça görülmektedir.

4.2.2. Toplam maya/küf sayısı

Analize alınan arı ekmeği örneklerinin toplam küf/maya sonuçları incelendiğinde sonuçlar TMAB sonuçları ile benzerlik göstermiştir (bkz. Çizelge 4.5). Toplam küf/maya sayıları 1,00±0,00-7,01±0,03 log kob/g arasında değişmiştir. Yapılan çalışmalarda arı ekmeği örneklerinde maya/küf sonuçları 10^3-10^8 kob/g arasında değişkenlik göstermektedir. Disayathanoowat ve diğerleri (2020) tarafından yapılan bir çalışmada *A. mellifera* cinsi arılara ait arı ekmeğinde toplam küf/maya (Sabouraud Dextrose Agar) sayımları ortalama 3,2 log kob/g değeri tespit edilirken, bir başka çalışmada aynı cins arılara ait üründe 8,67 log kob/g (Potato Dextrose Agar) şeklinde sayım alınmıştır (Jaya vd., 2020). Türkiye'de yapılan güncel bir çalışmada arı ekmeği örneğinde toplam küf/maya sayısı 2,6 ± 0,10 log kob/g olarak verilmiştir (Kahraman-Ilıkkan, 2023). Analize alınan örneklerde de değişken miktarlarda küf/maya üremesi ile karşılaşılmıştır. Bu bakımdan sonuçlar literatürle uyumlu bulunmuştur. Yapılan çalışmalar incelendiğinde arı ekmeğinin mikrobiyal bileşiminin genel olarak coğrafi konuma ve arı türüne bağlı olarak değiştiği belirtilmiştir (Mohammad vd., 2021). İran ve Malezya kaynaklı *Apis mellifera* ve *Apis dorsata* türlerine ait arı ekmeği örnekleri karşılaştırıldığında; Malezya menşeili örneklerde maya mikrobiyota daha yoğun olduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada, tropikal bölgelerden toplanan örneklerde toplam maya–küf yükünün 10^4–10^6 kob/g düzeyine çıktığı; ılıman bölgelerde ise 10^2–10^3 kob/g seviyelerinde kaldığı ifade edilmiştir (Mohammad vd., 2021).

Arı ekmeğinin fermentasyon ve sonrasındaki mikrobiyotası oldukça dinamik bir yapı sergilemektedir. Yüksek maya ve küf sayımı gösteren örnekler, fungal mikroorganizmaların baskın olduğu bir mikrobiyal ekosistemi işaret edebilir. Bu durum, rekabetçi mikrobiyal ortam nedeniyle laktik asit bakterileri ve diğer probiyotik mikroorganizmaların gelişimini sınırlayabilir; dolayısıyla bu tür örnekler probiyotik açıdan daha düşük potansiyel taşıyabilir. Nitekim, Vásquez ve Olofsson (2009), *Apis*

mellifera tarafından üretilen arı ekmeğinde bakteri ve fungal mikrobiyotayı karşılaştırmış; fungal yükün yüksek olduğu örneklerde LAB kolonizasyonunun zayıfladığını bildirmiştir. Bu durum, fermentasyon sürecinde pH yükselmesi ve oksijen düzeyinin artmasıyla ilişkilendirmiştir. Buna karşın, Mohammad vd., (2021) tarafından sunulan bir derlemede bu görüşün aksi vurgulanmıştır. Arı ekmeğindeki maya ve küf popülasyonlarının genellikle yüksek olduğu ve bunun ürünün fermentasyon süreci ve besin değeri için hayati bir rol oynadığını belirtilmiştir. Maya ve küflerin, polenin parçalanması, biyoaktif bileşiklerin üretimi ve mikrobiyal dengenin sağlanması gibi süreçlerde kilit bir rol oynadığı belirtilmiştir.

4.2.3. Laktik asit bakteri (LAB) sayısı

Arı ekmeğinin toplam laktik asit bakteri yükünün belirlemesi amacıyla bu gruptan laktobasil sayımı için MRS agar, enterokok sayımı için KAA agar ve laktokok sayımı için M17 agar birlikte kullanılmıştır. Bu ortamlardan alınan sayım sonuçlarının bir arada değerlendirilmesi probiyotik potansiyelinin kapsamlı bir şekilde analiz edilebilmesi için bir gerekliliktir. MRS agar geniş bir LAB içeriğini (*Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp. vb.), M17 agar *Lactococcus* spp. ve *Streptococcus* spp. cinsine ait türler, KAA agar ise özellikle *Enterococcus* spp. cinsine ait türlerin izolasyonu ve sayımı için tercih edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar bkz. Çizelge 4.5'te verilmiştir. MRS agar üzerinde yapılan sayımlarda, LAB popülasyonları 1,45 log kob/g (YK1) ile 7,48 log kob/g (ÇG) arasında değişkenlik göstermiştir. M17 agarda sayım alınamayan örnekler olmakla birlikte genel sayım sonuçları 1,39±0,12-7,99±0,01 log kob/g arasındadır. Test edilen arı ekmeği örneklerinin çoğunda KAA agarda üreme görülmemiştir. Diğer bölgelere ait sayım sonuçları 3,08±0,05 - 6,94±0,02 log kob/g arasında değişmektedir. Bu üç farklı besiyerinden elde edilen sayım sonuçları birbirini destekler niteliktedir. KAA agarda ve M17 agarda üreme görülmeyen petrilere ait arı ekmeği numunelerinin MRS agardaki sayım sonuçlarının da diğer arı ekmeklerine kıyasla daha düşük olduğu görülmektedir.

Ülkemize ait 3 farklı ticari arı ekmeğinde MRS agar kullanılarak yapılan LAB sayımında 1 log kob/g, 1,6 log kob/g ve 1,8 log kob/g şeklinde sonuçlar elde edilmiştir. Aynı çalışmada M17 agar kullanılarak elde edilen *Lactococcus* spp. ve *Streptococcus* spp. sayımlarında 2,3 log kob/g; 2,5 log kob/g ve 3 log kob/g gibi sonuçlar elde edilmiştir (Kahraman-Ilıkkan, 2023). Tez çalışmasında elde edilen verilerle kıyaslandığında düşük sayım sonuçları olduğu görülmüştür. Ticari olarak satışa sunulan arı ekmekleri farklı yöntemlerle (dondurma, kurutma) petekten çıkarılmaktadır. Bu çalışmadaki düşük LAB sayılarının, örneklerin ticari arı ekmeği örnekleri olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Taze ve doğrudan petekten temin edilen arı ekmeklerinde sayımların yüksek olduğu görülmektedir (Vásquez vd., 2012). Taze, dondurulmuş ve kurutulmuş arı ekmeklerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada taze arı ekmeğinin toplam canlı sayımı 8,43 log kob/g iken, kurutulmuş üründe bu değer 7,26 log kob/g olarak belirlenmiştir. Laktik asit bakterilerinin hassas yapısı, işleme yöntemlerindeki farklılıklar, depolama şartları ve süresi dikkate alındığında ticari ürünlerde LAB içeriğindeki düşüş makul görülmektedir (Combey, 2017).

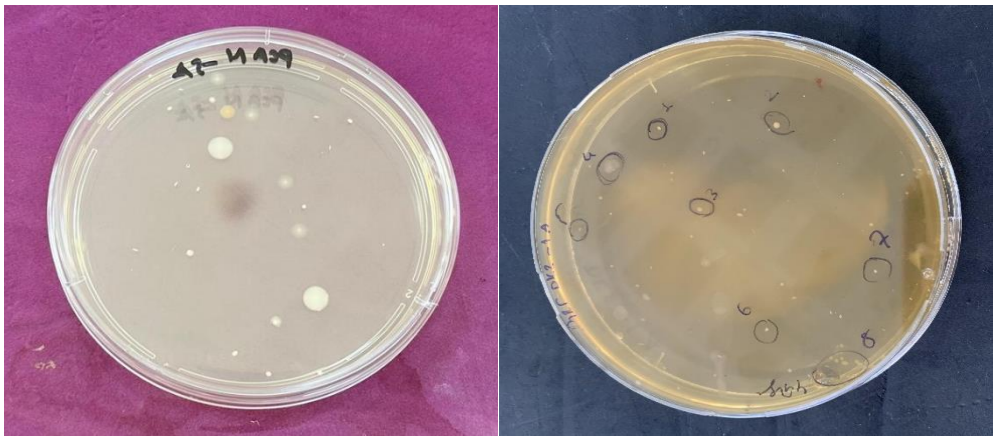
Literatürde arı ekmeğinin LAB içeriğinin sayısal olarak belirlendiği çalışma sayısı oldukça azdır, bu bakterilerin cins tür düzeyinde tanımlandığı çalışmaların sayısı görece daha fazladır. Az sayıdaki bu çalışmalar içerisinden Vásquez vd., (2012) tarafından gerçekleştirilen çalışma mevcut durumu özetler niteliktedir. *A. mellifera* cinsi arıları içeren toplam 12 farklı arı cinsine ait arı ekmeklerinin LAB içeriği incelendiğinde 3 adet örnekte hiç üreme tespit edilememiş, diğer örneklerde ise 10^4-10^9 kob/g arasında sayımlar alınmıştır. *A. mellifera* cinsi arılara ait örneklerde LAB sayısı 10^6 kob/g'dır.

Yine 5 farklı cinsine ait 9 arı ekmeği örneğinde yapılan LAB sayımlarında $9{,}11 \times 10^5$ kob/mL ila $25{,}15 \times 10^5$ kob/mL arasında değişen sonuçlar bildirilmiştir (Mathialagan vd., 2018). Eldeki veriler, diğer çalışmalar ile benzerlik göstermektedir ve bu çalışmalardaki örnekler arasında da önemli farklılıklar bulunmaktadır. Sayım sonuçları arı cinsi, fermentasyon süreçleri, ürünlerin muhafaza koşulları, kullanılan analiz yöntemleri gibi birçok parametreden etkilenmektedir (Tsadila vd., 2023).

Her üç besiyerinden elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde Yalova Çınarcık'tan toplanan arı ekmeği örneği (ÇG) ön plana çıkmaktadır. MRS'de 7,48 log kob/mL, M17'de 5,32 log kob/mL ve KAA'da 6,94 log kob/mL şeklinde sayım sonuçlarına sahip bu örneğin seçici koşullarda gelişebilen çeşitli ve bol miktarda LAB içerdiği düşünülmektedir. KF1, KF2, İT1, İT2 kodlu arı ekmeklerinde ise genellikle 4 log kob/mL'nin altında nispeten düşük sayımlar dikkat çekmektedir. Çalışmamızda tespit edilen yüksek LAB popülasyonları, bu örneklerin fermentasyon ve probiyotik uygulamalar açısından potansiyel kaynaklar olabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada, probiyotik potansiyeli taşıyan izolatların elde edilmesi hedeflendiğinden, sayım amacıyla kullanılan tüm petri kutularından potansiyel laktik asit bakterileri izole edilmiştir.

4.3. Arı Ekmeklerinden Potansiyel Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Arı ekmeği örneklerinden toplam 133 adet potansiyel laktik asit bakterisi izole edilmiştir. İzolasyonda koloni morfolojisine dikkat edilmiş, farklı morfolojilere sahip koloniler saflaştırılmıştır (Şekil 4.3).

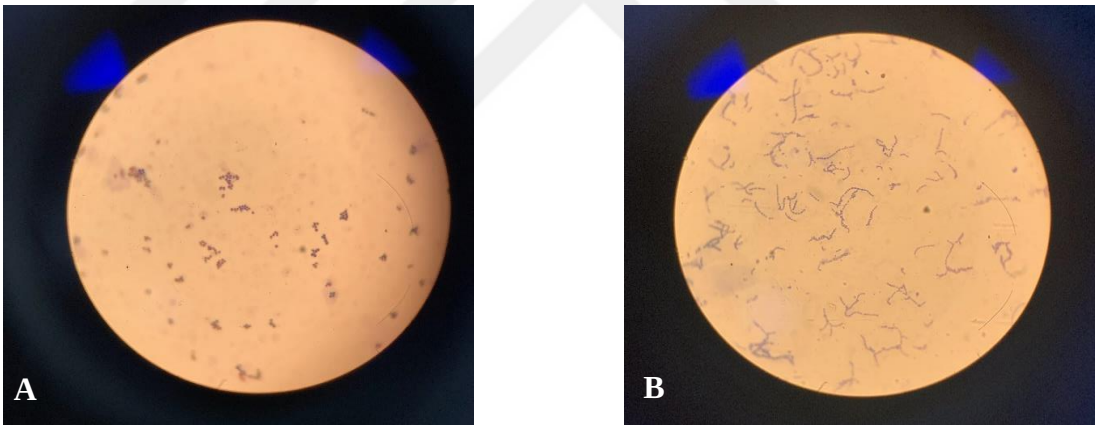


Şekil 4.3. LAB izolasyonu yapılan besiyerlerindeki farklı morfolojideki koloniler

Çalışma kapsamında elde edilen ve katalaz pozitif ve Gram-negatif özellikte olduğu belirlenen ve ayrıca izole edildiği halde aktifleştirilemeyen veya saf kültürleri elde edilemeyen 32 adet izolat çalışma kapsamı dışına alınmıştır. Yapılan testler sonucunda

LAB izolatı olduğu belirlenen toplam 101 izolatın 54 adedi MRS, 30 adedi M17 ve 17 adedi KAA agardan izole edilmiştir.

Mikroskobik incelemede izolatların kok, diplokok, tetrad ve streptokok morfolojisinde olduğu gözlemlenmiştir. İzolatlara ait mikroskop görüntüleri Şekil 4.4'te verilmiştir. Mathialagan vd., (2018) yaptıkları çalışmada morfolojik analizde kok (küresel) şekilli bakterilerin baskın olduğu belirtmiştir. Yapılan identifikasyonda kültürel ve morfolojik özelliklerden yararlanılması sebebiyle sadece cins düzeyinde tanımlama yapılabilmiştir. Yapılan değerlendirmede izolatların *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Streptococcus* spp., *Pediococcus* spp. ve *Micrococcus* spp. cinsine ait bakteriler olabileceği belirtilmiştir. Bir diğer çalışmada 16 farklı arılıktan toplanan arı ekmeği örneğinden 25 adet LAB izole edilerek tanımlamaları yapılmıştır. Bu izolatların büyük çoğunluğunu *Lactobacillus* spp., *Fructobacillus* spp. ve *Enterococcus* spp. cinsine ait suşlardan oluştuğu bildirilmiştir (Janashia vd., 2016).



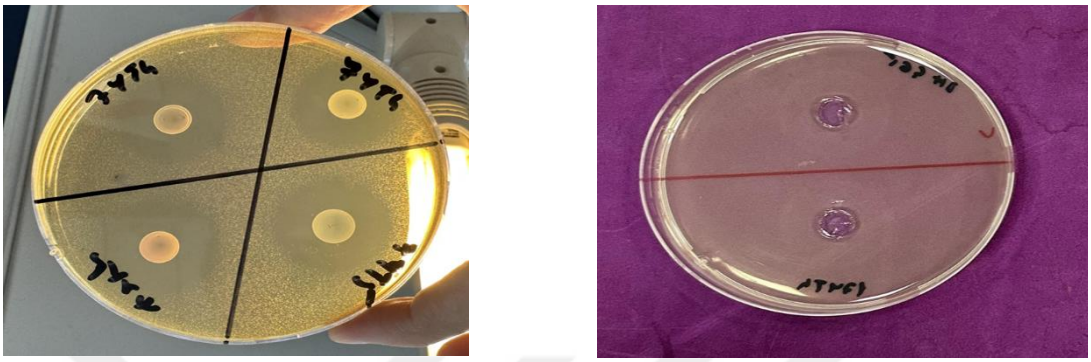
Şekil 4.4. Mikroskobik inceleme görüntüleri; A) Gram pozitif kok morfolojisindeki bakteriler B) Gram pozitif streptokok morfolojisindeki bakteriler

4.4. LAB İzolatlarının Probiyotik Potansiyellerinin Belirlenmesi

4.4.1. LAB izolatlarının antimikrobiyal aktivite profili

Antimikrobiyal aktivite; patojenlerin inhibisyonu, bağırsak mikrobiyotasının korunması ve gıda güvenliğini artırma gibi fonksiyonları dolayısıyla probiyotik potansiyelin

araştırıldığı çalışmaların merkezinde yer almaktadır (Simon vd., 2025). Bu nedenle probiyotik potansiyele sahip izolatların tespitinde öncelikle antimikrobiyal aktivite testleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Farklı izolatların spot agar difüzyon testi (A; 17YT 17YT5) ve kuyucuk difüzyon testinde (B;17YT4 ve BHÇG5) oluşturdukları inhibisyon zonları

Agar spot testi, arı ekmeği kaynaklı birçok izolatın test bakterilerine karşı önemli antimikrobiyal aktivite profili sergilediğini göstermiştir. Toplam 101 izolattan 48 adedinde inhibisyon zonları oluşmuştur. İzolatların yarısına yakını dört test bakterisi (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644) üzerinde etkili olmuştur. Büyük bir kısmı geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivite sergilemiş olup, sonuçlar Çizelge 4.6'da verilmiştir.

İzolatlar arasında, belirli suşların diğerlerine kıyasla daha geniş inhibisyon zonları oluşturduğu gözlemlenmiştir. MBK3, MBK4, MBK5 kodlu izolatlar *Salmonella* üzerinde 35 mm'lik inhibisyon zonları meydana getirmiştir. Aynı izolatlar diğer test mikroorganizmaları üzerinde de dikkate değer inhibisyon zonları oluşturmuştur.

MOO kodlu izolat Salmonella ve S. aureus üzerinde 35 mm'ye varan inhibisyon zonlarına sahipken, E. coli ve L. monocytogenes üzerinde herhangi bir inhibitör etki göstermemiştir. MB33 no'lu izolat dört test bakterisine karşı inhibisyon sağlamış ve geniş spektrumlu bir antimikrobiyal etki sergilemiştir.

Çizelge 4.6. İzolatların agar spot testi ile antimikrobiyal aktivite sonuçları

Kovan kodu	İzolat Kodu	*Salmonella*	*S. aureus*	*E. coli*	*L. monocytogenes*
KF1	MRC	+++	+++	-	-
KF1	17O1	++	+++	-	+
KF2	17U	++	-	-	-
YK1	MOO	+++	+++	-	-
YK2	MAA	+++	++	++	++
YK1	17BB	++	++	++	++
İB	MB33	++	++	++	+++
İÇ	MÇ33	++	++	++	++
GA	MG32	-	++	-	-
GA	MG2	+	+	-	-
İÇ	MİC11	+	++	+	+++
İÇ	MİC12	-	-	+	++
İÇ	BHİÇ2	++	-	++	++
GA	17G2	+++	++	++	++
GA	17G3	++	+++	++	++
GA	17G4	++	++	++	++
GA	17G5	++	++	++	++
ÇG	17ÇG1	++	++	-	++
ÇG	17ÇG3	++	++	++	++
ÇG	17ÇG4	++	+	++	++
ÇG	17ÇG5	++	++	++	+
YT	17YT4	++	++	++	++
YT	17YT5	++	++	++	++
GA	BHG2	-	++	++	++
ÇG	BHÇG1	++	+	-	++
ÇG	BHÇG2	+	+	+++	-
ÇG	BHÇG3	++	++	+++	-
ÇG	BHÇG4	++	+	+++	-
ÇG	BHÇG5	+++	++	++	++
YT	BHYT1	++	++	+++	+
BK	MBK3	+++	++	++	+++
BK	MBK4	+++	++	++	+++
BK	MBK5	+++	++	++	+++
İH	17İ1	++	++	++	++
İH	17İ2	+++	+	++	++
İH	17İ3	+++	++	+	++
İH	17İ4	++	+	++	++
İH	17İ5	-	+	+	++
İH	17İ6	-	+	++	++
BK	17BK1	-	+	++	-
BK	17BK2	+++	+++	++	-

Çizelge 4.6: Spot agar difüzyon test sonuçları (devam)

BK	17BK3	++	+++	-	-
BK	17BK4	+++	++	-	+++
İH	KAİ1	+	+++	++	+++
İH	KAİ2	++	+	++	+
İH	KAİ3	++	++	+	++
İH	KAİ5	++	+++	++	++
İH	KAİ6	++	+++	++	+++

+: 11-17 mm inhibisyon zon çapı, ++: 18-24 mm inhibisyon zon çapı, +++: 25-35mm inhibisyon zon çapı, (-): inhibisyon zonu yok.

İzolatların *Salmonella* spp. ve *S. aureus* üzerinde diğer test bakterilerine kıyasla daha büyük inhibisyon zonları oluşturduğu görülmüştür. Diğer yandan BHG2, 17İ5, 17İ6 ve BHG2 kodlu izolatlar *Salmonella* dışında diğer tüm test bakterileri üzerinde inhibisyon zonları meydana getirmiştir.

İnhibisyon zonu oluşturan tüm izolatlar en az bir test bakterisi üzerinde etkili olmuştur. Zonların büyüklükleri test mikroorganizmalarına göre çeşitlilik göstermiştir. Fakat antimikrobiyal spektrumları incelendiğinde Gram pozitif ve Gram negatif olma durumlarına göre net bir ayrım yapılamamıştır. Bazı izolatlar, her iki bakteri grubuna karşı inhibitör etki sergilerken, diğerleri ise belirgin bir şekilde tek bir gruba özgü antimikrobiyal aktivite göstermiştir. *S. aureus* ve *L. monocytogenes* gibi Gram pozitif bakterilere karşı yüksek inhibisyon zonları oluşturan izolatların (örn. MBK3 ve MBK5), bakterilerin hücre duvarı yapısına etki eden antimikrobiyal maddeler üretebileceği bilinmektedir (Karska-Wysocki vd., 2010; M. Wu vd., 2022). Örneğin, *E. faecalis* tarafından üretilen BacLı adlı bakteriosin, peptidoglikan yapısındaki belirli bağları (D-isoglutamin ve L-lizin arasında) keserek doğrudan hücre duvarında yıkıma neden olabilmektedir (Almeida-Santos vd., 2021). Benzer şekilde, Enterolysin A'nın peptidoglikan katmanındaki "köprü" bağlarını bozarak hücre duvarı bütünlüğünü zayıflattığı ve lizize yol açtığı bildirilmiştir (Fujii vd., 2025).

Salmonella spp. ve *E. coli* gibi Gram negatif bakterilere karşı yüksek inhibisyon zonları oluşturan izolatların ise (örn. 17G4 ve MÇ33) bakterilerin dış zar yapısına etki eden antimikrobiyal maddeler ürettiği görülmektedir (Wang, X. vd., 2021). Örneğin,

hı-defensin benzeri peptitlerin lipopolisakkarit ve fosfolipid zar yapısını bozarak zar bütünlüğünü hedef aldığı, bazı anyonik bir antimikrobiyal peptitlerin özellikle Gram-negatif bakterilere karşı etkili olduğu ve zar permeabilizasyonu gerçekleştirerek bakteri hücresinin ölümüne yol açtığı bildirilmektedir (Zhang vd., 2021). Aynı şekilde D-11 gibi dış zara özel peptitlerin, Gram negatif patojenlerin zarında bozulma meydana getirerek dış zar bütünlüğünü bozup, bakteriyel ölümü tetiklediği belirtilmektedir (Li vd., 2021).

Agar spot yöntemi ile antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirilen izolatların dikkate değer inhibisyon zonları oluşturduğu belirlenmiş ve sonuçlar literatürle uyumlu bulunmuştur. Oluşan inhibisyon zonlarının büyük bir çoğunluğu orta üst ve üst düzey antimikrobiyal aktiviteyi işaret etmektedir. Sonuçlar izolatların antimikrobiyal bileşik kaynakları olarak potansiyelini ortaya koymuştur (bkz. Çizelge 4.6). Laktik asit bakterilerinin antibakteriyel aktivitesinin bakteriyosin, diasetil ve hidrojen peroksit gibi çeşitli metabolitler ile laktik asit gibi organik asitlerde kaynaklandığı bilinmektedir (Mohammad vd., 2020b).

Agar spot yönteminde net inhibisyon zonuna sahip ve ölçüm alınan tüm izolatlar agar kuyucuk difüzyon testine tabi tutulmuştur. Bu test sonucunda sadece 16 izolatta *L. monocytogenes* üzerinde 11-12 mm çapında inhibisyon zonları belirlenmiştir. Diğer test bakterilerini içeren petrilerde net bir zon oluşumu olmaması sebebiyle ölçüm alınamamıştır. İnhibisyon zon sonuçları Çizelge 4.7'de ve oluşan zonlara dair görüntüler ise bkz. Şekil 4.5'te verilmiştir. Tez kapsamında arı ekmeği kaynaklı LAB izolatlarının probiyotik potansiyeline ilişkin çalışmalar hem agar spot hem de kuyucuk difüzyon testlerinde inhibisyon zonları oluşturan 16 izolat üzerinden yürütülmüştür.

Mevcut durumun laktik asit bakterilerinin etki mekanizmalarındaki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir. Laktik asit bakterilerinin bakteriyosin üretmese bile, ürettiği temel metabolit olan laktik asit ile etkin bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Özoğlu vd., 2022). Ancak bakteriyosinin dirençli patojenler üzerinde yarattığı etki, dahası inhibitör madde olarak direkt kullanım alanı bulunması gibi sebeplerden ötürü, izolatların bakteriyosin üretme potansiyeli dikkate alınmaktadır.

Laktik asit bakterileri genellikle patojen hücre zarı geçirgenliğini bozan ve DNA replikasyonunu engelleyen bakteriyosinler üretmektedir (Mohammad vd., 2020a).

Çizelge 4.7. Kuyucuk agar difüzyon testine göre *L. monocytogenes* üzerinde oluşan inhibisyon zonları (n=3)

Kovan Kodu	İzolat Kodu	Zon Çapı (mm)
İB	MB33	11 ± 0,00
GA	17G2	12 ± 0,00
GA	17G3	12 ± 0,00
GA	17G4	12 ± 0,00
GA	17G5	11,5 ± 0,71
YT	17YT4	11,5 ± 0,71
YT	17YT5	11,5 ± 0,71
ÇG	BHÇG5	11 ± 0,00
BK	MBK4	11 ± 0,00
BK	MBK5	12 ± 0,00
İH	17İ1	12 ± 0,00
İH	17İ2	12 ± 0,00
İH	17İ3	12 ± 0,00
BK	17BK2	11,5 ± 0,71
İH	KAİ1	11 ± 0,00
İH	KAİ3	12 ± 0,00

Sonuçlar aritmetik ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

Kuyucuk difüzyon testinde izolatların sadece *L. monocytogenes* üzerinde net zonlar meydana getirmesi dikkat çeken bir sonuçtur. *E. coli* üzerinde diğer izolatlara kıyasla daha yüksek bakteriostatik aktivite gözlemlenmiştir. Bakteriostatik etki, mikroorganizmaların çoğalmasını baskılayan ancak doğrudan hücre ölümüne yol açmayan bir antimikrobiyal mekanizma olarak tanımlanmaktadır (Pankey ve Sabath, 2004; Balouiri vd., 2016). Bazı izolatların *E. coli* üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonlarının net ve keskin olmaması, ancak bakteri gelişimini belirgin biçimde engellemesi bu tür bir bakteriostatik etkinin varlığı düşündürmektedir. Yapılan çalışmalar nisinin (gıda koruyucusu olarak kullanılan bir bakteriyosin) *L. monocytogenes* ve *E. coli* üzerinde antibakteriyel etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Taylor vd., 2008). Ayrıca, *Enterococcus* spp. cinsine ait türlerin ürettiği bazı enterosinlerin, her iki test bakterisini inhibe ettikleri bilinmektedir (Ramalho vd., 2023).

E. faecalis tarafından üretilen enterosin AS-48 ve Enterolysin A gibi peptitlerin, bakteri hücre duvarı ve membran yapısını bozarak Gram pozitif patojenler üzerinde antimikrobiyal etki yarattığı ve bu etkinin *L. monocytogenes* ve *S. aureus* üzerinde yüksek zon çaplarıyla raporlandığı çalışmalar bulunmaktadır (Almeida-Santos vd., 2021). *E. faecalis*'in Gram negatif patojenler üzerinde de belirgin baskılayıcı etki gösterebildiği ve özellikle *E. coli* ve *Salmonella* türlerine karşı antimikrobiyal aktivite sergilediği bildirilmiştir (Im vd., 2023).

Arı ekmeği kaynaklı probiyotik izolatlarının antimikrobiyal aktivitesinin değerlendirildiği bir çalışmada *E. faecalis* MPS15'in agar-kuyu difüzyon testinde oluşturduğu inhibisyon zonları *E. coli* için 2,5±0,7 mm, *S. aureus* için 2,0±0,0 mm, *K. pneumoniae* için 3,0±0,0 mm ve *P. aeruginosa* için 3,5 ± 2,1 mm olarak bildirilmiştir. *Salmonella Typhimurium* ve *B. cereus* için inhibisyon görülmediği belirtilmiştir (Mohammad vd., 2020b). Sonuçların inhibisyon zonundan kuyunun sahip olduğu çapın çıkarılmasıyla elde edildiği göz önüne alındığında, tez çalışmasında elde edilen izolatların yine bir Gram pozitif bakteri olan *L. monocytogenes* üzerinde oluşturduğu zonlarla uyumlu olduğu görülmüştür. Tez çalışmasında benzer şekilde *Salmonella* üzerinde antimikrobiyal aktivite görülmemiştir. Bununla birlikte *S. aureus* üzerinde inhibisyon zonu oluşmaması ve *E. coli* üzerinde net olmayan inhibisyon zonlarının varlığı, tez kapsamında elde dilen sonuçların araştırma sonuçlarından farklı olduğunu göstermiştir. Yine aynı çalışmada yer alan bazı laktobasillerin (ör. *Lactobacillus musae* SGMT17) 5-6 mm çapa sahip inhibisyon zonları arı ekmeği kaynaklı *E. faecalis* izolatının Gram negatif patojenlere karşı etkisinin sınırlı olduğunu ortaya koymuştur.

Sharma ve Lee (2025) tarafından bitkisel kökenli *Enterococcus* suşlarından *Enterococcus mundtii* ve *Enterococcus lactis*'in patojenlere karşı anlamlı zonlar oluşturduğu gösterilmiştir. *E. mundtii* ekstraktlarının *B. subtilis* için 11-14 mm ve *K. pneumoniae* için 9-13 mm'lik zonlar oluşturduğu bildirilmiştir; *E. lactis*'in bakteriyosin benzeri maddelerinin *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 ve *S. Typhimurium*'a karşı etkili olduğu vurgulanmıştır. Aynı çalışmada, enterokokların

Gram-pozitiflere belirgin, Gram-negatiflere ise koşullara bağlı ve daha değişken etki gösterebildiğine işaret edilmiştir.

Sonuç olarak, tez kapsamında elde edilen izolatların *L. monocytogenes* üzerinde belirgin zonlar oluşturmasının, sınıf IIa (pediosin-benzeri) enterosinler ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Almeida-Santos vd., 2021). Bu enterosinlerin, hedef hücre zarında yer alan mannoz fosfotransferaz sistemi (Man-PTS)'nin IIC/IID alt birimlerini reseptör olarak tanıyıp membran bütünlüğünü bozarak özellikle *Listeria* türlerinde güçlü inhibisyon sağladığı gösterilmiştir (Yu vd., 2025). Buna karşılık *E. coli* ve *Salmonella* gibi Gram negatiflerde dış zar, bakteriyosinlerin hedef zar bileşenlerine erişimini sınırlandırarak çoğunlukla bakteriostatik nitelikte inhibisyona yol açabilmektedir (Pankey ve Sabath, 2004). Bu etkilerin organik asit/H_2O_2 varlığında güçlendiği fakat bakterisidal eşiğe ulaşmayabileceği belirtilmiştir (Yu vd., 2025). *S. aureus*'ta zon gözlenmemesi, izolatın *S. aureus*'a etkili spesifik enterosinler üretmemesine veya hedef reseptör farklılıklarına bağlanmaktadır (Almeida-Santos vd., 2021).

4.4.2. LAB izolatlarının antibiyotik direnç profili

Arı ekmeği kaynaklı LAB izolatlarının antibiyotik direnç profilinin tespiti için disk difüzyon yöntemi kullanılmış ve test sadece antimikrobiyal aktiviteye sahip, dolayısıyla probiyotik potansiyeli bulunan izolatlara uygulanmıştır. Antibiyotiklere duyarlılık testi, potansiyel olarak taşınabilir direnç genlerinin (örneğin vanA, ermB, tetM) varlığını belirlemede kritik bir ön tarama aracıdır ve özellikle *Enterococcus* gibi türlerde bu genlerin horizontal gen transferi yoluyla yayılma riski yüksek kabul edilmektedir (Gueimonde vd., 2013). Bu nedenle, probiyotik adayların güvenlik profili belirlenirken, antibiyotik duyarlılığı temel kriterlerden biri olarak değerlendirilmektedir (Anonim, 2018).

LAB izolatlarının antibiyotik direnç profilini belirlemek amacıyla seçilen vankomisin, ampisilin, amoksisilin, penisilin, tetrasiklin, eritromisin, kloramfenikol ve siprofloksasin gibi antibiyotikler *E. faecalis* gibi türlerin klinik tedavisinde yaygın olarak kullanıldıkları için klinik açıdan önem taşımaktadır. Bununla birlikte antibiyotik

duyarlılık sonuçları, olası direnç genlerinin varlığını ortaya koyduğu için suşların güvenlik profilinin belirlenmesinde temel bir kriter olarak kabul edilmektedir (Merenstein vd., 2023). Özellikle *Enterococcus* türlerinde, glikopeptit grubu antibiyotiklerden vankomisine karşı gelişen doğal ya da genetik yolla aktarılan direnç ciddi bir güvenlik riski oluşturmaktadır. Vankomisin duyarlılığı probiyotik güvenlik değerlendirmelerinde kritik bir eşik olarak kabul edilmektedir (Anonim, 2018). β-laktam grubu antibiyotikler de (penisilin, ampisilin, amoksisilin) enterokların klinik tedavisinde kullanılmakta ve izolatlarının bu ajanlara karşı duyarlı olması patojenik suşlarla gen transferi riskini azaltmaktadır (Hanchi vd., 2018).

Makrolid (eritromisin) ve tetrasiklin sınıflarına karşı gözlemlenen fenotipik duyarlılık, bu antibiyotiklere karşı direnç sağlayan kazanılmış genlerin yoksunluğunu göstermektedir. Böylece direncin plazmidler ve transpozonlar aracılığıyla diğer bağırsak mikroorganizmalarına yatay gen transferi ile yayılma riskini azalttığı belirtilmiştir (Mathur ve Singh, 2005). Probiyotik aday suşların güvenliğini değerlendirirken, aminoglikozid sınıfı antibiyotiklere duyarlılık kritik parametrelerden biridir. Özellikle enterokok türlerinde sıkça bildirilen yüksek seviyeli aminoglikozid direnci (HLAR), bu bakterilerin konak üzerinde potansiyel patojenik risk taşıma ihtimalini artırmaktadır. Bu nedenle, olası HLAR taşıyıcısı *Enterococcus* suşlarının probiyotik olarak kullanımının güvenlik şüpheleri doğurabileceği belirtilmektedir (Jaimee ve Halami, 2016).

Siprofloksasin gibi antibiyotiklere direnç gelişimi toplumsal ve klinik açıdan kritik olduğu için probiyotik suşların bu sınıfa duyarlılığının değerlendirilmesi gerektiği belirtilmektedir (Tian vd., 2025). Kloramfenikol gibi fenikollerin ise kullanımları azalmasına rağmen direnç genlerinin yayılma potansiyeli nedeniyle probiyotik suşlar üzerinde denendiği görülmektedir (Tóth vd., 2021). Bu bilgiler ışığında seçilen test antibiyotiklerinin direnç profilleri; dirençli, duyarlı ve orta derecede dirençli/duyarlı şeklinde değerlendirilmiştir.

Tüm izolatlarda test edilen on antibiyotikten sekizine karşı geniş inhibisyon zonu oluşmuştur. Gentamisin ve streptomisin uygulamalarında ise zon oluşumu

gözlemlenmemiştir. Elde edilen inhibisyon zon çapları Çizelge 4.8'de verilmiştir. Tüm izolatlar tetrasiklin ve amoksisiline yüksek düzeyde hassasiyet göstermiştir. Bunu ampisilin ve eritromisine olan duyarlılık takip etmiştir. Tetrasiklin ve amoksisilin gibi antibiyotiklerin uzun süreli ve yaygın kullanımı genel direnç oranlarını artırmıştır. Fakat arı ekmeği gibi ürünlerden izole edilen suşlarda ya da belirli bölgelerde veya türlerde hâlen yüksek duyarlılık tespit edilebilmektedir (Imam vd., 2024).

İzolatların belirlenen antibiyotik duyarlılık profilleri Çizelge 4.9'da verilmiştir. Tetrasiklin (TE), amoksisilin (AX), ampisilin (A), penisilin (P) ve eritromisin (E) gibi klinik uygulamalarda yoğun olarak kullanılan antibiyotiklere karşı tüm izolatlar yüksek düzeyde duyarlı fenotip göstermiştir. Bu geniş spektrumlu duyarlılık, suşların genomlarında kazanılmış ve mobil genetik elementler (plazmidler, transpozonlar) aracılığıyla yatay gen transferine aracılık etme potansiyeli taşıyan direnç genlerini (örn. β-laktamaz genleri, tetM veya erm genleri) eksprese etmediğine dair fenotipik kanıt sunmaktadır (Campedelli vd., 2019). Ancak, literatürde antibiyotik duyarlılığının yalnızca fenotipik testlerle değerlendirilmesinin suşların gerçek direnç potansiyelini tam olarak yansıtmadığı belirtilmektedir (Mathur ve Singh, 2005). Fenotipik duyarlılık ile genotipik direnç arasındaki ilişkinin her zaman doğrusal olmadığı ifade edilmektedir (Campedelli vd. 2019). Bazı bakterilerin direnç genini taşısa bile gen ekspresyonunun baskılanması nedeniyle fenotipte duyarlı görünebileceği veya tam tersi durumda sessiz genlerin aktivasyonu sonucu direnç fenotipi ortaya çıkabileceği belirtilmektedir (Wagner vd., 2023). Bu nedenle fenotipik sonuçların, özellikle probiyotik güvenlik değerlendirmelerinde, genetik analizlerle desteklenmesi önerilmektedir (Anonim, 2018).

Çizelge 4.8. İzolatların antibiyotik direnç zon çapları

	Zon Çapları (mm)									
İzolat Kodu	**VA**	**A**	**Ax**	**P**	**TE**	**E**	**C**	**Cp**	**S**	**CN**
17G2	17,0±0,00^{bcdE}	30,0±0,00abB	39,0±0,00^{aB}	22,0±0,00^{efD}	38,5±0,71^{aA}	28,5±0,71^{cdB}	17,5±0,71^{deE}	26,0±0,00^{aC}	-	-
17G3	21,0±0,00^{aEF}	31,0±0,00^{aBC}	38,0±1,41^{abcA}	22,5±0,71^{defE}	33,5±0,71^{eB}	29,0±0,00^{bcdCD}	19,5±0,71^{abcdF}	26,5±0,71^{aD}	-	-
17G4	17,0±0,00^{bcdE}	30,5±0,7^{1aB}	38,5±0,71^{abB}	25,0±0,00^{bcdC}	37,0±0,00^{bcA}	25,0±0,00^{fC}	20,0±0,00^{abcD}	25,0±1,41^{aC}	-	-
17G5	18,5±0,71^{bE}	30,5±0,71^{aC}	39,0±0,00^{aA}	25,5±0,71^{abcD}	35,0±0,00^{dB}	29,0±0,00^{bcdC}	18,0±0,00^{cdeE}	26,0±0,00^{aD}	-	-
17YT4	17,0±0,00^{bcdG}	30,0±0,00^{abC}	34,0±0,00^{dB}	26,5±0,71^{abE}	35,0±0,00^{dA}	28,0±0,00^{deD}	18,0±0,00^{cdeF}	27,0±0,00^{aE}	-	-
17YT5	17,5±0,71^{bcdD}	31,0±1,41^{aB}	35,0±0,00^{cdA}	25,0±0,00^{bcdC}	33,5±0,71^{eAB}	30,0±0,00^{abB}	19,5±0,71^{abcdD}	25,5±2,12^{aC}	-	-
BHÇG5	16,0±0,00^{cdF}	31,0±0,00^{aB}	36,5±0,71^{abcdA}	25,0±1,41^{bcdD}	35,0±0,00^{dA}	28,0±0,00^{deC}	20,0±0,00^{abcE}	26,0±0,00^{aCD}	-	-
MBK4	18,0±1,41^{bcC}	28,0±1,41^{bcdB}	34,0±0,00^{dA}	26,0±0,00^{abB}	35,0±0,00^{dA}	28,5±0,71^{cdB}	19,5±0,71^{abcdC}	26,0±0,00^{aB}	-	-
MBK5	17,0±0,00^{bcdG}	31,0±0,00^{aBC}	38,5±0,71^{abA}	28,0±1,41^{aD}	33,0±0,00^{eB}	29,0±0,00^{bcdCD}	21,0±0,00^{aF}	25,5±0,71^{aE}	-	-
17İ1	15,5±0,71^{dD}	29,0±0,00^{abcB}	35,0±1,41^{cdA}	24,5±0,71^{bcdeC}	36,0±0,00^{cdA}	31,0±0,00^{aB}	17,0±0,00^{eD}	24,0±0,00^{aC}	-	-
17İ2	15,5±0,71^{dD}	27,5±0,71^{cdB}	35,0±1,41^{cdA}	26,0±0,00^{abBC}	35,0±0,00^{dA}	27,0±0,00^{eB}	17,5±0,71d^{eD}	24,0±0,00^{aC}	-	-
17İ3	16,0±0,00^{cdF}	29,0±0,00^{abcB}	35,0±0,00^{cdA}	21,5±0,71^{fD}	35,5±0,71^{dA}	30,0±0,00^{abB}	20,0±0,00^{abcE}	26,0±0,00^{aC}	-	-
17BK2	16,5±0,71^{bcdG}	30,0±0,00^{abC}	34,0±0,00^{dB}	22,5±0,71^{defE}	36,0±0,00^{cdA}	31,0±0,00^{aC}	19,5±0,71^{abcdF}	26,0±0,00^{aD}	-	-
KAİ1	17,5±0,71^{bcdF}	28,0±0,00^{bcdC}	35,0±0,00^{cdB}	24,0±0,00^{bcdefD}	38,0±0,00^{abA}	29,5±0,71^{bcC}	20,5±0,71^{abE}	24,0±0,00^{aD}	-	-
KAİ3	17,0±0,00^{bcdE}	30,0±0,00^{abB}	35,0±1,41^{cdA}	22,5±0,71^{defD}	36,0±0,00^{cdA}	31,0±0,00^{aB}	20,5±0,71^{abD}	25,0±0,00^{aC}	-	-
MB33	17,0±0,00^{bcdE}	26,5±0,71^{dC}	35,5±0,71^{bcdA}	23,0±0,00^{cdefD}	35,0±0,00^{dA}	30,0±0,00^{abB}	18,5±0,71^{bcdeE}	26,0±1,41^{aC}	-	-

Sonuçlar aritmetik ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen örneklere dair değerler arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,05$). Aynı satırda farklı büyük harflerle gösterilen analiz değerleri arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0,05$). Vankomisin (VA), Ampisilin (A), Amoxicillin (Ax), Penicillin (P), Tetrasiklin (TE), Eritromisin, (E), Kloramfenikol (C), Ciprofloxacin (Cp).

Çizelge 4.9. İzolatlara ait antibiyotik direnç profilleri

Kovan Kodu	İzolat Kodu	A	VA	C	E	S	TE	CN	P	AX	Cp
Bursa/Gemlik	17G2	S	S	S	S	-	S	-	S	S	S
Bursa/Gemlik	17G3	S	S	S	S	-	S	-	S	S	S
Bursa/Gemlik	17G4	S	S	S	S	-	S	-	S	S	I
Bursa/Gemlik	17G5	S	S	S	S	-	S	-	S	S	S
Yalova Taşköprü	17YT4	S	S	S	S	-	S	-	S	S	S
Yalova Taşköprü	17YT5	S	S	S	S	-	S	-	S	S	I
Çınarcık Güllük	BHÇG5	S	I	S	S	-	S	-	S	S	S
Bursa/Karacabey	MBK4	S	S	S	S	-	S	-	S	S	S
Bursa/Karacabey	MBK5	S	S	S	S	-	S	-	S	S	I
İnegöl/Hocaköy	17İ1	S	I	I	S	-	S	-	S	S	I
İnegöl/Hocaköy	17İ2	S	I	S	S	-	S	-	S	S	I
İnegöl/Hocaköy	17İ3	S	I	S	S	-	S	-	S	S	S
Bursa/Karacabey	17BK2	S	S	S	S	-	S	-	S	S	S
İnegöl/Hocaköy	KAİ1	S	S	S	S	-	S	-	S	S	I
İnegöl/Hocaköy	KAİ3	S	S	S	S	-	S	-	S	S	I
İnegöl/Tahtaköprü	MB33	S	S	S	S	-	S	-	S	S	S

Antibiyotik direnç profillerinin sergilenmesinde kullanılan R: dirençli, S: duyarlı, I: orta derecede dirençli/duyarlı ifadeleri bkz. Çizelge 3.2.'de "Antibiyotik direnç testinde kullanılan antibiyotikler ve zon çapları* (mm)" başlığı altında verilen bilgiler doğrultusunda hazırlanmıştır. Vankomisin (VA), Ampisilin (A), Amoxicillin (Ax), Penicillin (P), Tetrasiklin (TE), Eritromisin (E), Kloramfenikol (C), Ciprofloxacin (Cp).

Yalova Çınarcık'tan alınan BHÇG5 kodlu ve İnegöl'den alınan 17İ1, 17İ2, 17İ3 kodlu izolatlarda vankomisine karşı orta düzey direnç/duyarlılık görülmüştür. Çizelge 4.9'daki bazı izolatların vankomisine karşı gösterdiği orta dirençli fenotipleri, bu suşların geleneksel olarak vankomisine dirençli olan *Lactobacillus* gruplarına ait olmadıklarını ortaya koymaktadır. Yapılan tür tanımlama sonucunda bu izolatların *Enterococcus* türlerine ait olduğu tespit edilmiştir. Fakat, *Enterococcus* türlerinde de vankomisine karşı gelişen doğal ya da genetik yolla aktarılan direncin ciddi bir güvenlik riski oluşturduğu bilinmektedir (Anonim, 2018). Bu bağlamda probiyotik potansiyele sahip olduğu düşünülen 17YT4, 17G4 ve MBK5 kodlu izolatların vankomisine karşı duyarlı olmaları güvenilirliklerini arttırırken, BHÇG5 kodlu izolat için genotipik incelemeye ihtiyaç duyabileceği düşünülmektedir (Ben Braiek ve Smaoui, 2019).

17YT4, MBK5, 17G4 izolatlarının diğer test antibiyotiklerine karşı da duyarlı olduğu görülmüştür (bkz. Çizelge 4.9). Arı ekmeğinden izole edilen laktik asit bakterilerinin

antibiyotik direncinin belirlendiği bir çalışmada; suşların genel olarak ampisilin, kloramfenikol, eritromisin ve tetrasikline karşı duyarlı olduğu belirtilmiştir. Tez çalışmasında yer alan izolatların da aynı antibiyotiklere duyarlı olduğu görülmüştür. Buna karşın, vankomisin için çalışmamızda daha yüksek duyarlılık gözlemlenirken, araştırmadaki izolatların genel olarak vankomisine dirençli oldukları bildirilmiştir. *Lc. mesenteroides, Lb. musae, Lb. crustorum, Lb. mindensis ve Lb. rhamnosus* izolatları vankomisin'e dirençli iken *E. faecalis*'in bu antibiyotiğe duyarlı olması dikkat çekmektedir (Mohammad vd., 2020b).

Kinolon grubundan olan siprofloksasine karşı bazı izolatlarda gözlenen orta düzey direnç fenotipi, genellikle *Lactobacillus* ve *Enterococcus* türlerinde bildirilen doğal direnç mekanizmaları ile ilişkilendirilmektedir (Klare vd., 2007). Bu direncin, çoğunlukla bakterilerin hücre zarı geçirgenliğinin düşük olması veya aktif dışa atım pompalarının varlığı gibi tür içi fizyolojik özelliklerden kaynaklandığı belirtilmektedir (Gueimonde vd., 2013). Benzer şekilde, *Lactobacillus rhamnosus* ve *L. plantarum* suşlarında da siprofloksasine karşı gözlenen orta düzey direncin, plazmid kaynaklı edinilmiş genlerden değil, bu türlerin kinolon hedef enzimleri olan DNA giraz ve topoizomeraz IV'e düşük afinitesinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Sharma vd., 2014). Bu direnç tipi transfer edilebilir genetik bir direnç değil, türe özgü doğal bir fizyolojik özellik olarak değerlendirilmektedir (Anonim, 2018).

Tez çalışmasında gentamisin ve streptomisine karşı direnç tespit edilmiştir. Tüm izolatların gentamisin ve streptomisine karşı dirençli fenotip göstermesi, laktik asit bakterilerinde ve *Enterococcus* türlerinde sıkça bildirilen bir durumdur. Literatürde bu bulgu genellikle doğal direnç mekanizmalarıyla ilişkilendirilmektedir (Klare vd., 2007; Hummel vd., 2007). Bu direnç tipi, plazmid veya transpozon kaynaklı genetik aktarım riski taşımadığı için probiyotik güvenlik açısından endişe verici olarak tanımlanmamaktadır (Anonim, 2018). Yine de bazı suşlarda yüksek seviyeli aminoglikozid direnci olduğunda sinerji testleri (ör. gentamisin–ampisilin kombinasyonu) uygulanarak güvenilirliğin sorgulanması gerektiği bildirilmiştir (Campedelli vd. 2019). Bunun için fenotip–genotip ilişkisinin netleştirilmesi yani ileri düzey moleküler doğrulama önerilmektedir (Anonim, 2018).

Elde edilen bulgular, izolatların probiyotik açıdan güvenilirlik potansiyeli barındırdığını, yine de daha fazla analiz ve kontrol gerektiğini ortaya koymaktadır. Kuyucuk difüzyon testinde zon oluşturan 16 izolat, antibiyotik direnç testlerinde duyarlı ve orta düzeyde duyarlı bulunmuştur. Bu nedenle izolatların tamamı safra tuzu ve düşük pH'ya direncinin belirlenmesi için teste alınmıştır.

4.4.3. LAB izolatlarının safra tuzu ve asit ortama direnç özellikleri

Arı ekmeğinden izole edilen potansiyel probiyotik 16 adet LAB izolatının üç farklı zaman diliminde (0, 1 ve 3 saat) pH 3 ortamında gösterdiği canlı kalma oranı araştırılmıştır. Kontrol olarak kullanılan besiyerine safra tuzu eklenmemiş ve pH ayarı yapılmamıştır. Sonuçlar kob/mL olarak değerlendirilmiş, buna göre pH 3 ortamında hayatta kalma oranı %80 üstü olan mikroorganizmalar probiyotik potansiyel bakımından incelenmeye devam edilmiştir (Ben-Miled vd., 2023a). Sonuçlar Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Arı ekmeğinden elde edilen izolatların düşük pH ve %0,3 safra tuzu ortamında canlılık (HK) oranları (%)

	(Kontrol)		**pH:3**		**Safra tuzu**	
İzolat Kodu	1. Saat	3. Saat	1. Saat	3.Saat	4. Saat	24. Saat
17İ1	98,12	205,29	5,23	-	89,24	86,74
17İ2	121,69	179,52	62,04	0,65	78,16	64,37
17G2	74,02	97,21	5,20	0,36	91,63	74,45
17BK2	104,00	112,00	83,52	64,18	85,47	67,44
17YT4	110,94	163,28	88,80	83,28	99,24	90,08
MBK5	164,58	202,08	92,93	85,33	97,96	91,84
BHÇG5	178,57	196,43	96,76	88,79	98,92	90,32
17İ3	116,67	147,22	6,12	1,90	62,50	37,50
17G4	106,25	121,88	91,79	83,18	91,30	78,26
17G5	100,21	121,80	43,69	17,57	72,84	66,11
MRBK4	88,43	96,83	65,90	19,44	69,58	46,39
17YT5	101,49	144,78	91,39	25,09	82,46	69,47
17G3	111,21	166,36	57,95	55,21	82,35	71,57
MB33	107,92	172,59	4,98	-	71,18	48,24
KAİ1	108,11	194,59	66,71	23,35	86,84	63,16
KAİ3	95,83	160,42	3,60	0,01	73,47	53,06

%HK: İzolatların belirtilen koşullarda hayatta kalma yüzdeleri, (-): Üreme yok.

Teste alınan izolatların asidik ortama karşı farklı mikrobiyal dirençlere sahip oldukları görülmüştür. 17G4 (%83,18), 17YT4 (%83,28), MBK5 (%85,33) ve BHÇG5 (%88,79) kodlu izolatlar asidik koşullara (pH 3) 3 saat maruz kalmalarına rağmen hayatta kalma yüzdeleri yüksektir. Diğer izolatların ise uyum sağlama yeteneklerinin sınırlı olduğu, hatta bazı izolatların bu şartlarda hayatta kalamadığı görülmüştür (17İ1, MB33 ve KAİ3). 17İ3 (%1,90), 17İ2 (%0,65), 17G2 (%0,36) gibi izolatların dikkate değer bir direnç gösteremedikleri tespit edilmiştir. 17G5 (%17,57), MRBK4 (%19,44), KAİ1 (%23,35) ve 17YT5 (%25,09) kodlu suşların ise asidik koşullara karşı hassasiyeti ve düşük pH ortamlarına uyum sağlama yetenekleri sınırlı bulunmuştur.

Mohammad vd. (2020b), arı ekmeğinden elde edilen izolatlar üzerine yaptıkları çalışmada tüm LAB suşlarının pH 3'ü tolere edebildiğini göstermiştir. pH 3'teki hayatta kalma oranı %91,71-99,94 arasında bulunmuştur, *E. faecalis* pH 3'te en yüksek hayatta kalma oranına sahipken, bunu *L. crustorum* takip etmiştir. *Bacillus* spp. cinsine ait iki bakterinin asidik koşullara (pH 2) 3 saat maruz bırakılması sonrasında canlı kalma oranları sırasıyla %57,53-65,88 olarak bulunmuştur (Pełka vd., 2023). Çalışma kapsamındaki sonuçlar ve literatür verileri karşılaştırıldığında, aside toleransın mikroorganizma çeşidine ve suşa bağlı olarak değiştiği görülmüştür. Daha yüksek hayatta kalma oranlarına sahip örneklerin, muhtemelen verimli proton pompaları, stres tepkisi proteinleri veya koruyucu hücre duvarı yapılarına sahip olduğu düşünülmektedir.

Tez çalışmasında %0,3 (w/v) oxgall içeren ortamda 0, 4. ve 24 saat inkübasyon sonunda izolatlarının safra toleransları araştırılmıştır. Teste alınan çoğu izolat 4 saat sonunda yüksek hayatta kalma becerisi sergilemiştir (bkz. Çizelge 4.10). Bu durum izolatlar özelinde safra ortamının kısa vadede mikrobiyal canlılığı desteklediğini ortaya koymuştur. Elde edilen sonuçlara göre izolatların %0,3 (w/v) oxgall içeren ortamda ilk 4 saat boyunca yüksek oranda canlılıklarını koruması, safra tuzlarının kısa süreli maruziyetlerde bazı probiyotik mikroorganizmaların metabolik adaptasyonlarını uyarabildiğini düşündürmektedir. Safra tuzlarının bakteriyel hücre zarına zarar verici etkilerine rağmen, aynı zamanda stres yanıt mekanizmalarını aktive ederek hücrede safra tuzu hidrolaz enzimlerinin üretimini tetiklediği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Foley vd., 2021; Dong vd., 2025). Bu enzimler, konjuge safra tuzlarını hidrolize ederek

toksisitesini azaltır ve hücre zarının bütünlüğünün korunmasını sağlar (Begley vd., 2005). Ayrıca yapılan çalışmalarda, bazı *E. faecalis* suşlarının kısa vadeli safra maruziyetine karşı adaptif gen yanıtları sergileyerek canlılıklarını sürdürebildikleri ve bunun da onların gastrointestinal geçiş sırasında kolonizasyon avantajı sağladığı rapor edilmiştir (Flahaut vd., 1996; Dreyer vd., 2024).

Safra ortamındaki ilk 4. saatlik sonuçlar incelendiğinde 17YT4, MBK5, BHÇG5, 17G4 ve 17G2 gibi izolatlar yüksek canlılık yüzdelerine sahip bulunmuştur. 17İ1, 17BK2, 17YT5, 17G3 ve KAİ1 gibi izolatlar, safra ortamına adaptasyon göstermişlerdir. 24 saatlik sonuçlar değerlendirildiğinde ise canlılığın devam ettiği görülmüştür. Literatür incelendiğinde arı ekmeğinden izole edilen *Bacillus* spp. cinsi bakterilerin de benzer safra koşullarında yüksek hayatta kalma oranlarına sahip olduğu belirtilmiştir. Söz konusu iki bakterinin %0,3'lük safra tuzu solüsyonuna 3 saat maruz bırakılması sonrasında canlı kalma oranları sırasıyla %107,81-110,15 olarak bulunmuştur (Pełka vd., 2023). Buna karşın fruktofilik laktik asit bakterilerinde (FLAB) yetersiz hayatta kalma oranları gözlemlenmiştir. FLAB bakterilerinde %0,3'lük (v/v) safra tuzu ve pH 4 ortamlarının her ikisinde de hayatta kalma oranları oldukça düşük bulunmuştur (Ispirli ve Dertli, 2021). Çalışmada, *L. kunkeei* suşlarının düşük pH koşullarına inhibisyon oranlarının %10 ile %60 aralığında değişkenlik gösterdiği ve bu toleransın suşa özgü bir dağılım izlediği belirtilmiştir. *F. fructosus* suşlarının ikisi tamamen inhibe olurken, AP61 kodlu suşun %66'lık bir inhibisyon oranı ile canlılığını kısmen koruduğu tespit edilmiştir. *Leuconostoc mesenteroides* AP-40 suşunun, düşük pH stresi karşısında herhangi bir tolerans gösteremediği bildirilmiştir. *L. plantarum* AP45 ve AP52 suşları ise düşük pH koşullarında %25'lik bir hayatta kalma oranı sergilemişlerdir. Üç suş hariç tüm *L. kunkeei* suşları safra tuzu koşullarında yaklaşık %80 seviyesinde yüksek bir inhibisyon göstermiştir. Bahsi geçen bu üç *L. kunkeei* suşunda ise inhibisyon oranı yaklaşık %60 olarak kaydedilmiştir. *F. fructosus* da benzer şekilde yaklaşık %60'lık bir inhibisyon görülmüştür (Ispirli ve Dertli, 2021). Mohammad vd. (2020b) yaptıkları çalışmada benzer durumla karşılaşmış, *F. fructosus* sağkalım oranının %95,09'dan (kontrol) %75,66'ya düştüğü belirtilmiştir. Bu durumun FLAB'a özgü bir durum olduğu düşünülmektedir. Çünkü aynı çalışmada çoğu izolatın canlılık oranının 4 saat boyunca %0,3 safraya maruz kaldıktan sonra değişmediği belirtilmiştir. Arı ve arı ürünlerinden izole edilen *E. durans,*

E. faecium, B. asteroides, L. fermentum, L. plantarum, P. pentosaceus gibi bakterilerinin de yüksek safra direncine (%69,31-100 arasında) sahip olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda asidik ortama yüksek direnç gösteren izolatların, safra ortamına da dirençli oldukları görülmüştür. Bu bağlamda aside ve safra tuzuna direncin çalışmadaki izolatların probiyotik potansiyelinin değerlendirilmesinde kritik bir adım olduğu düşünülmüştür.

4.4.4. LAB izolatlarının *in-vitro* sindirim modelindeki davranışı

İzolatlarının sindirim sırasındaki stresli koşullara verdiği tepkinin değerlendirilmesi için yapay mide ve bağırsak ortamı oluşturulmuştur. Safra tuzu ve pH 2 asit ortama dirençli bulunan 4 adet izolatın mide ve bağırsak ortamına maruziyetleri sonrası sayılarındaki değişim incelenmiştir. İzolatların hayatta kalma oranları yüzdesel olarak ifade edilmiş ve sayım sonuçları Çizelge 4.11'de verilmiştir.

Çalışmada test edilen izolatlar mide koşullarına maruz kaldıktan sonra %42,15-%47,99 arasında değişen canlı kalma oranları sergilemiştir. MBK5 (%47,99) ve BHÇG5 (%47,16) gibi izolatların sindirim sistemindeki dirençleri onları probiyotikler için potansiyel adaylar haline getirmiştir. Bununla birlikte 17G4 (%42,82) ve 17YT4 (%42,15) kodlu izolatların literatür ile uyumlu direnç seviyelerine sahip olduğu görülmüştür. Literatürde, probiyotik bakterilerin mide asidine maruz kaldıktan sonra hayatta kalma oranlarının genellikle %50 civarında olduğu bildirilmiştir (Dunne vd., 2001). Mide fazı, sindirim sisteminde mikrobiyal hayatta kalmanın önündeki en temel bariyerdir ve canlılıkta en büyük azalmaya neden olmaktadır.

Bağırsak ortamına maruz kalma testini takiben, izolatların canlılık oranlarında bir miktar düşüş gözlemlenmiş olmakla birlikte, sonuçlar genel olarak olumlu bulunmuştur (Çizelge 4.11). Bağırsak ortamı içerdiği safra tuzları ve pankreatik enzimler ile mikroorganizmalar için ikinci bir stres faktörü oluşturmaktadır. Literatürde, bağırsak ortam maruziyeti aşamasından sonra probiyotik bakterilerin hayatta kalma oranlarının genellikle %30-50 arasında olduğu bildirilmiştir (De Angelis ve Gobbetti, 2004). Çalışmada test edilen izolatlardan elde edilen hayatta kalma oranları, birçok probiyotik izolatın performansını

aşan düzeydedir. Bu durum, izolatların probiyotik özellikler açısından umut vaat eden adaylar olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.11. İzolatların mide ve bağırsak ortamı sonrası hayatta kalma yüzdeleri ve sayım sonuçları

İzolat Kodu	Kontrol*	Mide Öncesi*	Mide Sonrası *	% MS HK	Bağırsak Sonrası *	% BS HK
MBK5	7,44±0,03^{aA}	7,30±0,14^{aA}	3,50±0,21^{aB}	47,99	3,29±0,04^{aB}	45,02
17YT4	7,04±0,03^{bA}	5,94±0,04^{bB}	2,51±0,04^{bC}	42,15	2,37±0,03^{cC}	39,92
BHÇG5	7,44±0,06^{aA}	7,33±0,02^{aA}	3,46±0,02^{aB}	47,16	3,35±0,04^{aB}	45,74
17G4	7,37±0,02a^{A}	7,43±0,02^{aB}	3,18±0,01^{aC}	42,82	3,12±0,01^{bD}	41,96

Sonuçlar logaritmik olarak aritmetik ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Aynı sütunda farklı küçük harfler ile gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak fark ($p<0,05$) vardır. Aynı satırda farklı büyük harfler ile gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak fark ($p<0,05$) vardır. Kontrol: mide ortamına eklenen mikroorganizma sayısı; MO: mide sindirimi öncesi, MS: mide sindirimi sonrası, B: bağırsak sindirimi sonrası mikroorganizma sayısı, % MS HK: mide sindirimi sonrası yüzde hayatta kalma oranı, % BS HK: Bağırsak sindirimi sonrası yüzde hayatta kalma oranı. (*): log kob/mL.

Test sonuçları incelendiğinde asitlik ve diğer zorlayıcı şartların artışıyla birlikte izolatların canlılık oranlarında azalma görülmüştür. Bununla birlikte test edilen 4 izolat da sindirim sisteminde canlı kalmayı başarmıştır. Mikroorganizma sayılarındaki bu azalışın özellikle düşük pH'ya sahip mide ortamı kaynaklı olduğu görülmüştür. Elde edilen veriler literatür ile karşılaştırıldığında kabul edilebilir bulunmuştur (Angmo vd., 2016; Nyabako vd., 2020). *L. brevis, L. plantarum* ve *L. acidophilus* üzerinde yaptıkları bir çalışmada 2 saat sonunda asitliği pH 2 olan ortamdaki canlılığın 5 log azaldığını ve pH 3'te ise logaritmik düzeyde bir azalma olmadığını bildirmişlerdir. Ben-Miled vd., (2023a) arılar ve arı ürünlerinden elde ettikleri izolatlardaki azalmanın 1,82-5,11 log kob/mL arasında değiştiğini bildirmiştir. En yüksek direnç gösteren izolatların *Bifidobacterium asteroides, Apilactobacillus kunkeei, Enterococcus faecalis, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus fermentum, Weissella paramesenteroides* cinsi laktik asit bakteri olduğunu belirtmişlerdir. İzolatlarının *in-vitro* sindirim modelindeki davranışı probiyotik potansiyelin varlığı konusunda umut verici bulunmuştur. Analize alınan izolatların *in-vitro* sindirim modelindeki direnç değerleri birbirleriyle benzer seviyelerdedir.

4.4.5. LAB izolatlarının otoagregasyon ve hücre-yüzey hidrofobisitesi

Test sonucu en yüksek otoagregasyon kapasitesi BHÇG5 kodlu (%53,91) izolatta görülmüştür. Bunu %29,13 ve %28,88 değerleri ile 17G4 ve MBK5 kodlu izolatlar takip etmiştir (Çizelge 4.12). Diğer taraftan 17YT4 kodlu izolat en düşük oto seviyesine (%19,41) sahip bulunmuştur. Birçok çalışmada, laktik asit bakterilerinin otoagregasyon kapasiteleri %20'nin üzerinde olanların iyi otoagregasyon kapasitesine sahip olduğu kabul edilmektedir. %40-%80 arası otoagregasyon oranları probiyotik potansiyel açısından önemlidir çünkü bu oranlar bakterilerin çevresel streslere karşı dayanıklılığını ve konakçı yüzeylerine tutunma yeteneğini arttırmaktadır. Bununla birlikte, otoagregasyon davranışlarının değişkenliğinin türler arasında değil, esas olarak suş düzeyinde bile farklılık gösterdiği bildirilmektedir (Wang, S. vd., 2024).

Çizelge 4.12. Otoagregasyon kapasitesi ve hücre-yüzey hidrofobisitesi test sonuçları

İzolat Kodu	Otoagregasyon Kapasitesi (%)	Hidrofobisite (%)
MBK5	28,88	28,09
17YT4	19,41	13,64
BHÇG5	53,91	12,91
17G4	29,13	31,37

İzolatların % hidrofobisite değerleri incelendiğinde en yüksek değer %31,37 ile 17G4 kodlu izolatta görülmüştür. En düşük değer ise %12,91 ile BHÇG5 kodlu izolatta tespit edilmiştir. BHÇG5 kodlu izolat dışındaki diğer izolatlarda otoagregasyon kapasitesi ile % hidrofobisite değerleri doğru orantılı bulunmuştur. Yapılan çalışmalar hücrelerin yüzey hidrofobisitesi arttıkça, otoagregasyon kapasitelerinin de artma eğiliminde olduğunu göstermektedir (Kaushik vd., 2009). Bununla birlikte yüksek otoagregasyon kapasitesine sahip fakat düşük yüzey hidrofobisitesine sahip bakteri türleri de olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu bakterilerin daha fazla ekzopolisakkarit (EPS) üretebileceği ve güçlü bir biyofilm oluşturma kapasitesi sağlayabileceği aktarılmıştır (Darilmaz ve Beyatli, 2012).

Arı ekmeğinden izole edilen *Bacillus* spp. cinsi bakterilerin probiyotik özelliklerinin değerlendirildiği bir çalışmada örneklerin hidrofobisitesi %5,69 ile %26,19 olarak

belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada izolatların 4 saatlik inkübasyon sonunda otoagregasyonu %22,82 ve %38,83 iken ve 24 saatlik inkübasyon sonrası %48,55 ve %86,30 olarak tespit edilmiştir (Pełka vd., 2023). FLAB izolatlarının incelendiği bir başka çalışmada 24 saatlik inkübasyon sonunda ortalama %65 civarında otoagregasyon değerleri bildirilmiştir. Arı ekmeği ve arı poleninden izole edilen *L. kunkeei* ve *F. fructosus* suşlarının %100'e yakın düzeyde hidrofobisite gösterdiği belirtilmiştir (Ispirli ve Dertli, 2021). *H. itama* cinsi arılara ait arı ekmeğinden izole edilen bakterilerin probiyotik özelliklerinin değerlendirildiği bir çalışmada; *E. faecalis, L. musae, L. crutorum, L. mindensis, L. mesenteroides, L. rhamnosus* izolatları elde edilmiştir. Bu izolatların otoagregasyon ve hücre-yüzey hidrofobisitesi incelendiğinde; *L. mindensis*'in en yüksek otoagregasyon değerine (%41,16*), E. faecalis*'in ise en düşük değere (%12,12) sahip olduğu belirtilmiştir. Yine *Lc. mesenteroides* %80,52 ile en yüksek hidrofobisiteyi sergilerken, *E. faecalis* en düşük hidrofobisite yüzdesine (%4,84) sahip bulunmuştur (Mohammad vd., 2020b). İzolatlarımızın otoagregasyon ve hidrofobisite yetenekleri arı ekmeğinden elde edilen farklı izolatların kabiliyetleri ile benzer bulunmuştur.

Gerçekleştirilen test sonuçları bir arada değerlendirildiğinde; otoagregasyon ve hidrofobisite değerleri tutarlı bulunmuştur. Sadece BHÇG5 izolatı, %53,91 gibi yüksek bir otoagregasyon kapasitesine sahipken, hidrofobisite değeri %12,91 ile nispeten düşüktür. Buna karşılık, 17G4 izolatı hem otoagregasyon (%29,13) hem de hidrofobisite (%31,37) açısından dengeli bir profil sergilemektedir. Her iki özelliğin birbiriyle uyumlu olması probiyotik potansiyelin değerlendirilmesinde önemli bir adımdır. Analize alınan 3 izolatta sonuçlar arasında pozitif bir korelasyon olduğu görülmüştür. Bazı çalışmalar bu iki değer arasında pozitif korelasyon bulunduğunu belirtmesine karşın, aralarında herhangi bir ilişkinin tespit edilemediği çalışmalar da bulunmaktadır (Kos vd., 2003; Giaouris vd., 2009). Ayrıca substrat konsantrasyonu ve sıcaklığın bakteri otoagregasyonunu arttırdığı, asidik koşullardan alkali koşullara geçişin ise otoagregasyonu azalttığı belirtmiştir. Yüzey hidrofobisitesinin yüksek substrat konsantrasyonları ile artıp, düşük sıcaklıklar ve pH değişiklikleri ile azaldığı iletilmiştir (Muda vd., 2014).

Elde edilen otoagregasyon ve hücre-yüzey hidrofobisitesi verileri, izolatların probiyotik potansiyelleri açısından değerlendirildiğinde literatürde bildirilen eşik değerlerle paralellik göstermektedir. Birçok çalışmada, %20'nin üzerinde otoagregasyon kapasitesi sergileyen laktik asit bakterilerinin iyi düzeyde agregasyon yeteneğine sahip olduğu belirtilmektedir (Kos vd., 2003; Collado vd., 2008). Bu bağlamda MBK5 (%28,88) ve 17G4 (%29,13) gibi izolatlarımızın değerleri, probiyotik adaylık için kabul edilebilir düzeylerdedir.

Hidrofobisite açısından değerlendirildiğinde, izolatlarımızdan 17G4 (%31,37) ve MBK5 (%28,09) değerleri probiyotik suşların tipik aralığında (%20–40) bulunmuştur (Vinderola ve Reinheimer, 2003). Bu değerler, epitel hücrelerine adezyon potansiyelinin desteklendiğini göstermektedir. Kos ve diğerleri (2003) probiyotik laktobasillerin epitel yüzeyine bağlanma kapasitesi ile hidrofobisite düzeyi arasında anlamlı bir ilişki olduğunu vurgulamıştır. Ancak, BHÇG5 izolatının yüksek otoagregasyonuna rağmen düşük hidrofobisite (%12,91) göstermesi, probiyotik potansiyelin tek bir parametre ile değerlendirilemeyeceğini, suşların çoklu özellikleri üzerinden yorumlanması gerektiğini ortaya koymaktadır. Benzer şekilde Darilmaz ve Beyatli (2012) tarafından, hidrofobisitesi düşük ancak yüksek otoagregasyon kapasitesi gösteren bazı izolatların yoğun ekzopolisakkarit üretimi sayesinde güçlü biyofilm oluşturabildiği bildirmiştir.

17YT4 izolatının otoagregasyon (%19,41) ve hidrofobisite (%13,64) değerleri, diğer izolatlarla karşılaştırıldığında nispeten daha düşük bulunmuştur. Bununla birlikte literatürde %15–20 düzeyindeki otoagregasyon kapasitesine sahip bazı suşların, patojenlerle rekabet ve gastrointestinal sistemde geçici kolonizasyon açısından yeterli performans sergilediği rapor edilmiştir (Kos vd., 2003; Collado vd., 2008). Ayrıca düşük hidrofobisite değerine rağmen probiyotik adayların EPS üretimi ya da epitel hücre adezyon genlerinin varlığı gibi alternatif mekanizmalarla tutunma kapasitesini artırabildikleri bildirilmiştir (Darilmaz ve Beyatli, 2012). Bu açıdan 17YT4 kodlu izolatın, agregasyon ve hidrofobisite bakımından sınırlı görünmekle birlikte, asit-safra toleransı ve antimikrobiyal aktivite testlerindeki olumlu sonuçlarla desteklendiğinde probiyotik potansiyel taşıdığı söylenebilmektedir. Probiyotik adaylığı değerlendirilirken

tek bir fenotipik parametre yerine çok yönlü kriterlerin birlikte ele alınması gerektiği unutulmamalıdır (Vinderola ve Reinheimer, 2003).

4.4.6. LAB izolatlarının kolesterol asimilasyon kabiliyeti

İzolatların 24 saat sonundaki kolesterol asimilasyon kabiliyetleri spektrofotometrik prensibe dayalı, enzimatik ve kolorimetrik bir analiz tekniği olan Cholesterol CHOD/POD® test kiti ile ölçülmüş ve belirtilen süre sonunda kolesterol miktarındaki azalış yüzdesel olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.13'te verilmiştir.

Çizelge 4.13. İzolatların kolesterol asimilasyon testi sonuçları

İzolat Kodu	Kolesterol derişimindeki değişim (%)
MBK5	32,91
17YT4	61,76
BHÇG5	41,45
17G4	54,35

Test edilen tüm LAB izolatları, başlangıç kolesterol derişimine kıyasla belirgin bir düşüş göstermiştir. Kolesterol degradasyon kapasitesi en yüksek izolat 17YT4 no'lu izolat olmuştur. Literatürde, laktik asit bakterilerinin tür ve suşlara bağlı olarak değişkenlik göstermekle birlikte kolesterol düşürücü etkiye sahip oldukları bilinmektedir (Kim, Y. vd., 2021; Yang vd., 2023).

Arı ekmeği ve diğer arıcılık ürünlerinden izole edilen bazı izolatların da %20-80 arası değişen oranlarda kolesterolü asimile ettikleri tespit edilmiştir. *Apilactobacillus kunkeei* üzerine yapılan bir çalışmada; test edilen suşların %20-50 oranında kolesterolü düşürdüğü, kolesterol asimilasyon kabiliyetinin suşa bağlı olduğu bildirilmiştir. *A. kunkeei* suşlarının probiyotik özelliğe sahip meyveli ürünler için kullanılabileceği belirtilmiştir (Vergalito vd., 2020).

Bir başka çalışmada 5 arı ekmeği ve 3 arı poleni örneğinden izole edilen 10 adet *Bacillus* spp. suşunun, 24 saatlik inkübasyon sonrasında kolesterolün %30'dan fazlasını asimile ettiği bildirilmiştir (Pełka et al., 2023). Meradji vd., (2023) baldan izole ettikleri 14

izolatın 10'nunda 24 saat sonunda başlangıçtaki kolesterol düzeyini %50'nin üzerinde azalttığını bildirilmiştir. Bu oranın *A. kunkei*'de %83,08 ve *Lactobacillus kullabergensis*'te ise %77,27 oranında olduğu belirtilmiştir.

Laktik asit bakterilerinin kolesterolü asimile etme kabiliyeti probiyotik potansiyelin belirlenmesinde dikkate değer bir özelliktir. LAB'lerinin kolesterolü azaltması; hücre yüzeyine bağlanma/zar inkorporasyonu (Lye vd., 2010), safra tuzu hidrolazı ile konjuge safra tuzlarının dekonjugasyonu ve dolaylı kolesterol çekimi (Lye vd., 2010) ile kolesterolün koprostanol vb. türevlerine dönüşümü (Deng vd., 2023) gibi çoklu mekanizmalara dayanmaktadır.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre, test edilen tüm izolatlar başlangıç kolesterol derişimine kıyasla anlamlı azalış sağlamış ve bu bulgu, literatürde LAB'nin kolesterol asimilasyon kapasitesini destekleyen verilerle uyumlu bulunmuştur (Yang vd., 2023). En yüksek kolesterol asimilasyon oranını sergileyen 17YT4 izolatı (%61,76), bu özelliği ile özellikle dikkat çekmektedir. Bu düzey, arı ekmeği kaynaklı *Apilactobacillus kunkeei* suşlarında %20–50 arasında (Vergalito vd., 2020), *Bacillus* spp. izolatlarında %30'un üzerinde ve diğer bazı laktik asit suşlarında %50'ye (Pelka vd., 2023) varan oranlarla benzerlik göstermektedir.

Probiyotik potansiyel bağlamında kolesterol asimilasyonunun önemi, yalnızca in vitro etkinlikle sınırlı değildir. Bu özellik, gastrointestinal sistemde kolesterol metabolizmasını doğrudan etkileyerek serum kolesterol düzeylerinin düşürülmesine, dolayısıyla kardiyovasküler hastalık riskinin azaltılmasına katkı sağlayabilmektedir (Shimizu vd., 2015). Klinik açıdan LAB'nin hipokolesterolemik etkileri üzerine yapılan meta-analizler, probiyotiklerin bu özelliğinin fonksiyonel gıda geliştirilmesinde önemli bir kriter olduğunu göstermektedir (Ooi ve Liong, 2010). Bu nedenle, çalışmamızda elde edilen bulgular yalnızca izolatların *in vitro* performansını değil, aynı zamanda potansiyel fonksiyonel gıda ve biyoterapötik uygulamalar için değerli bir özellik taşıdıklarını da göstermektedir.

4.5. İzolatlarının Cins ve Tür Düzeyinde Tanımlanması

Yapılan tür tanımlamasında probiyotik potansiyele sahip olduğu düşünülen dört izolatın da MBK5 (2,07), 17YT4 (2,18), BHÇG5 (2,02) ve 17G4 (1,97) yüksek güvenilirlik düzeyinde (log skor ≥1,7) *Enterococcus faecalis* olduğu doğrulanmıştır.

Bu izolatların probiyotik potansiyelin değerlendirildiği analizlerde sergilediği özellikler literatürdeki diğer çalışmalarla benzer bulunmuştur. Mohammad vd., (2020b) *H. itama* arı ekmeğinden izole edilen *E. faecalis* suşunun probiyotik potansiyelini değerlendirilmiştir. Bu bakterinin pH 3'te %91,71-%99,94 arasında değişen yüksek canlılık oranına sahip olduğu ve mide asidine direncini gösterilmiştir. Antibiyotik duyarlılık testlerinde, *E. faecalis* MPS15 suşunun kloramfenikol, ampisilin, eritromisin ve tetrasikline duyarlı olduğu, ancak vankomisin ve teikoplanin direnci gösterdiği belirlenmiştir. Tez çalışmasında tür tanımlaması gerçekleştirilen bu dört izolatın vankomisine duyarlı ve orta düzey dirençli olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalar da *E. faecalis*'in *L. monocytogenes*'in bağırsak epitel hücrelerine tutunmasını engellediğini göstermektedir. Aynı çalışmada geniş spektrumlu bakteriyosin üreten bu suşun, probiyotik özellikte koruyucu bir madde olarak geliştirilme potansiyeli olduğu belirtilmiştir (Cebrián vd., 2012). Mevcut çalışmalar, izolatların *L. monocytogenes* üzerinde gösterdikleri antimikrobiyal etkiyi açıklamaktadır. Yine de tüm probiyotik mikroorganizmalar için geçerli olan virülans genlerin taranması, *in vitro* adhezyon testleri ve hayvan modellerinde güvenilirlik çalışmalarının bu izolatlara da yapılması gerekmektedir.

4.6. İzolatların Hemolitik Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Hemolitik aktivite, mikroorganizmaların kırmızı kan hücrelerini parçalama kabiliyetini ifade etmektedir ve probiyotiklerin patojenik potansiyelini değerlendirmede kritik bir parametredir (Casarotti vd., 2017). Özellikle *Enterocooccus, Streptococcus* spp. (Geniş vd., 2024) ve *Bacillus* türlerinde probiyotik potansiyelin değerlendirilmesinde bu testten yararlanılmaktadır (James vd., 2025). *E. faecalis* ve *E. faecium* bakterilerinin beta-hemolizin (sitolizin) gibi toksinleri üretebilme potansiyeline sahip olduğu ve klinik

izolatların yaklaşık %30-40'ında β-hemoliz gözlemlendiği belirtilmiştir (Geniş vd., 2024). Benzer şekilde *Bacillus* türleri hemolitik aktivite kapasitesi taşıdığından, *Bacillus subtilis* gibi potansiyel probiyotik suşların güvenlik değerlendirmelerinde kanlı agarda hemoliz taramasının rutin olarak uygulanması gerektiği belirtilmiştir (James vd., 2025).



Şekil 4.6. İzolatların koyun kanlı agarda hemoliz aktivitesi

Çalışma sonucunda elde edilen izolatların *Enterococcus faecalis* olması sebebiyle izolatlar hemolitik aktivite yönünden değerlendirilmiştir. Test edilen izolatlarının kanlı agar besiyerinin hemoliz oluşturmayan γ-hemolitik bakteriler oldukları belirlenmiştir.

E. faecalis'in hemolitik aktiviteye sahip olmaması, hemoliz genlerinin (cylLL, cylLS, cylA, cylB, cylI) eksikliği veya sessiz kalmasıyla ilişkilendirilmektedir. Bu genlerin, β-hemoliz yapan suşlarda bulunduğu, γ-hemolitik suşlarda ise genellikle eksik veya etkisiz olduğu ifade edilmektedir (Coburn ve Gilmore, 2003). *E. faecalis*'in γ-hemolitik olması diğer patojenler kadar güçlü bir hemolitik etkiye sahip olmadığını göstermekte, bununla birlikte antibiyotik direnci ve biyofilm oluşturma yeteneklerinin incelenmesi önerilmektedir (Arias ve Murray, 2012).

Probiyotiklerin hemolitik aktivitesinin olmaması güvenilirlik açısından oldukça önemlidir. Araştırmacılar ve endüstri, bu özelliği doğrulamak için standart test protokolleri uygulamaktadır. Hemoliz yapmayan suşlar, klinik kullanım ve ticari ürün geliştirme süreçlerinde önceliklendirilir (Banerjee vd., 2017). Elde edilen izolatların

hemolitik aktiviteye sahip olmaması ticari probiyotik üretiminde kullanılabileceklerinin bir göstergesidir (Casarotti vd., 2017).

4.7 *E. faecalis* (17YT4) İzolatının Fermentasyon Özelliklerinin Belirlenmesi

Probiyotik potansiyele sahip ve denemeler sonucunda ballı içecek üretimine uygun bulunan *E. faecalis* (17YT4) izolatının farklı karbonhidratları fermente etme yeteneği Durham tüp yöntemiyle değerlendirilmiştir. Glukoz, fruktoz, maltoz ve galaktoz içeren ortamlarda pH düşüşüne bağlı renk değişimi gözlenmiş, buna karşın sakkaroz ve laktoz içeren ortamlarda renk değişimi meydana gelmemiştir.

Kullanılan pH indikatörü olan bromkresol yeşilinin renk geçiş aralığı pH 3,8–5,4 olup, başlangıçta pH 6,66 düzeyinde bulunan kontrol ortamı bu aralık üzerinde, mavi renkli bir görünüme sahiptir (Wen vd., 2023). Fermentasyon sürecinde herhangi renk değişimini gözlenmeyen ortamların pH'sının 5,4'ün üzerinde kaldığı ve dolayısıyla asit üretimi olmadığı ya da sınırlı bir asit üretimi gerçekleştiği düşünülmektedir. Elde edilen fermentasyon profili, literatürde *E. faecalis* için bildirilen metabolik örüntülerle paralellik göstermektedir. Önceki çalışmalar, bu türün heksozları (glukoz, fruktoz, galaktoz) ve bazı disakkaritleri (maltoz) etkin biçimde fermente edebildiğini, ancak laktoz ve sakkaroz fermentasyonunun suşlar arasında değişkenlik gösterebildiğini belirtmektedir (Moreno vd., 2006; Domingos-Lopes vd., 2017). Sakkaroz ve laktozun fermente edilememesi, ilgili enzimatik sistemlerin (β-galaktozidaz ve sakkaraz) izolat düzeyinde yetersiz ekspresyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir (Afolabi vd., 2022). Gasser ve diğerleri (2024) tarafından yapılan bir çalışmada, laktoz metabolizmasının lacSZ genleri aracılığıyla kontrol edildiği ve bu genlerin sırasıyla laktoz permeazı ile β-galaktozidazı kodladığı belirtilmiştir. Bu genlerin ekspresyonunun laktozun varlığına bağlı olarak aktive olduğu vurgulanmıştır.

Fermentasyon sonunda tüplerde gaz oluşumu saptanmamıştır. Sonuçlar, *E. faecalis*'in karakteristik olarak fakültatif anaerob, homofermentatif bir tür olmasıyla uyumlu bulunmuştur (Giraffa, 2003; Franz vd., 2011).

4.8. Fermente Bal İçeceği Üretimi

Probiyotik potansiyele sahip olduğu değerlendirilen dört izolat, bal bazlı fermente içecek üretimi ön denemelerinde kullanılmıştır. Ayrıca bu izolatların elde edildiği arı ekmeği örnekleriyle de ayrı birer fermente içecek ön denemesi gerçekleştirilmiştir. Fermente edilmemiş bal şerbeti negatif, ticari kültür kullanılarak fermente edilmiş şerbet ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Denemede; 24 saat aralıklarla pH takibi ve duyusal değerlendirme gerçekleştirilerek hedeflenen pH değerinde (pH 3,5) fermentasyon sonlandırılmıştır (Eidt vd., 2023). Yapılan ön duyusal değerlendirmede 17YT4 kodlu izolat kullanılarak üretilen fermente içecek panelistlerin beğenisini kazanmıştır. Benzer şekilde, 17YT4 ve BHÇG5 kodlu izolatların elde edildiği arı ekmeği örnekleriyle fermente edilen içecekler de olumlu yönde değerlendirilmiştir. İlerleyen aşamalarda, probiyotik potansiyeli ve duyusal özellikleri en uygun bulunan 17YT4 no'lu izolat ve bu izolatın elde edildiği arı ekmeği kullanılarak fermente içecek üretimi gerçekleştirilmiş; bu ürünün mikrobiyolojik, kimyasal ve fonksiyonel özellikleri değerlendirilmiştir.

Mikrobiyal çeşitliliğin fermentasyon dinamiklerine etkisinin gözlemlenmesi adına ilave üretim denemeleri yapılmıştır. Tez çalışması kapsamında izole edilen ve probiyotik potansiyele sahip olduğu düşünülen dört izolatın birlikte kullanımıyla fermente ballı içecek üretilmiştir. Ayrıca seçilen *E. faecalis* (YT4) izolatı ile probiyotik *Saccharomyces boulardii* (Reflor®) birlikte kullanılarak ikinci bir ballı içecek denemesi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar ilgili başlıklar altında verilmiştir.

4.9. Fermente Bal İçeceğinin Mikrobiyolojik Kalite Özellikleri

Üretilen fermente içeceklerin mikrobiyolojik kalite özelliklerinin belirlenmesi amacıyla toplam mezofilik aerobik canlı bakteri, küf-maya ve laktik asit bakteri sayıları belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.14'te verilmiştir.

Çizelge 4.14. Fermente bal içeceği örneklerine ait sayım sonuçları (log kob/mL)

İçecek Örneği	TMAB	MRSA*	TKM
İzolat ile fermente edilen	6,99±0,01	7,48±0,03	<1.00
Arı Ekmeği ile fermente edilen	7,71±0,01	7,19±0,04	<1.00
Karışık kültür ile fermente edilen	-	7,18±0,09	<1.00
Maya ve izolat ile fermente edilen	-	7,07±0,05	7,11±0,15

Sonuçlar aritmetik ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. (-): Sayım alınmamıştır. TMAB: Toplam mezofilik aerobik bakteri, TKM: Toplam Küf Maya, *Kullanılan besiyeri; MRSA: Man Rogosa ve Sharpe Agar

Fermente bal içeceği örneklerinde TMAB ve LAB sayıları, probiyotik ürünlerde hedeflenen minimum 6 log kob/g canlı bakteri seviyesinin üzerindedir. Bir ürünün probiyotik olarak kabul edilebilmesi için, içerdiği probiyotik canlı mikroorganizma sayısının en az 10^6 kob/mL olması gerekmektedir (WHO, 2002). Tüm fermente bal içecekleri probiyotik olarak kabul edilebilecek niteliktedir. Bununla birlikte; probiyotiklerin uygulandıkları bölgede etki gösterebilmeleri için canlılıklarını korumaları ve yaklaşık 10^9 kob/mL sayısında olmaları gerektiği genel bir kabuldür (Wang, G. vd., 2022). Bu açıdan değerlendirildiğinde, üretilen fermente içeceklerin yeniden formülasyonu ve uygun besin bileşenlerinin optimizasyonuyla istenen canlı bakteri seviyelere ulaşılabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, üretimde kullanılan balda gerçekleştirilen polen analizleri, bal örneğinde kestane cinsi polenlerin baskın olduğunu göstermektedir. Bu durumun, içerdiği doğal antimikrobiyal bileşenlerin mikrobiyal çoğalmayı yavaşlattığına işaret etmektedir. Kestane balının güçlü antimikrobiyal etkisine dair çalışmalar bulunmaktadır (Ronsisvalle vd., 2019; Koloh vd., 2024).

Çeşitli meyve ve sebze temelli fermente içeceklerde yapılan çalışmalarda, bu ürünlerin farklı bileşenler ile desteklendiği ya da karışık starter kültürler kullanıldığı görülmektedir. Nitekim *Spirulina platensis* ve bezelye proteini ile zenginleştirilmiş meyve bazlı içeceklerin fermentasyonu ile elde edilen ürünlerde probiyotik canlılığın, fermentasyon sonrası 8,67 ila 9,61 log kob/mL arasında olduğu belirtilmiştir (Yahsi ve Sengun, 2024). Karışık kültür kullanılarak çeşitli bitki ekstraktları ve bal ile hazırlanan içeceğin 24 saatlik fermentasyonu sonunda toplam canlı bakteri sayısının 8 log kob/mL'ye yaklaştığı görülmüştür (Eidt vd., 2023)

Toplam maya ve küf sayımlarında hem 17YT4 izolatı hem de arı ekmeği kullanılarak fermente edilen bal içeceklerinden, DRBC agara yapılan yayma ekimlerde koloni gelişimi gözlemlenmemiştir. Bu sonuç, ürünlerdeki maya ve küf yükünün tespit sınırının altında olduğunu göstermektedir. Fermentasyon öncesinde pastörize edilen bal şerbeti, mikrobiyolojik açıdan güvenli hale getirilmiştir. Mevcut sonuç sadece izolat kullanılarak fermente edilen ürün için beklenen bir durumdur. Arı ekmeği ile fermente edilen üründe küf ve maya tespit edilememesinin, ürünün pastörizasyon sonrası düşük başlangıç mikrobiyotası, fermentasyonla oluşan bileşenler ve gelişen kompleks ortam ile üründeki başlangıç küf-maya sayısıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Laktik asit bakterilerin antifungal aktivite gösterdikleri, maya ve küf gelişimini sınırladıkları yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Sadiq vd., 2019; Nasrollahzadeh vd., 2022).

4.10. Fermente Bal İçeceği Fizikokimyasal ve Fonksiyonel Özellikleri

4.10.1. Fermente bal içeceği örneklerinde pH ölçümü ve titrasyon asitliği

Probiyotik özelliklere sahip olduğu düşünülen 17YT4 izolatı ve izolatın elde edildiği arı ekmeği kullanılarak üretilen fermente ürünlerin kimyasal özellikleri incelenmiştir. Probiyotik potansiyele sahip 4 izolattan elde edilen karışık kültür ile probiyotik maya ve 17YT4 no'lu izolatın karışımından oluşan kültür kullanılarak elde edilen ürünlerin pH, asitlik, °Brix ve şeker içerikleri de belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.15'te verilmiştir. Kontrol olarak fermente edilmemiş bal içeceği kullanılmıştır.

Çizelge 4.15. Fermente bal içeceği örneklerine ait kimyasal analiz sonuçları

İçecek Örneği	pH	Asitlik* (%w/v)	°Brix	Şeker İçeriği (%)	
				İndirgen	Toplam
Fermente edilmemiş	4,35^{a}	0,13^{c}	11^{a}	9,83 ±0,32^{a}	10,05 ±0,76^{a}
İzolat ile fermente edilen	3,50^{b}	0,18^{c}	10,4^{b}	7,71 ± 1,40^{c}	9,30 ± 0,25^{b}
Arı ekmeği ile fermente edilen	3,40^{c}	0,32^{b}	10,7^{a}	8,70 ± 0,01^{b}	9,33 ± 0,21^{b}
Karışık kültür ile fermente edilen	3,48^{b}	0,16^{c}	9,9^{b}	7,39± 1,22^{c}	8,91± 0,30^{c}
Maya ve izolat ile fermente edilen	3,22^{d}	0,47^{a}	7,1^{c}	5,18± 1,10^{d}	5,90± 0,10^{d}

Sonuçlar aritmetik ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Aynı sütunda farklı küçük harfler ile gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak fark ($p<0,05$) vardır. (*) Laktik asit eşdeğeri cinsinden hesaplanmıştır.

Bu bulgular, fermente ürünlerin asidik karakterde olduğunun ve probiyotik mikroorganizmaların aktivitesi sonucu oluşan laktik asit (vb.) üretiminin bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Elde edilen pH ve asitlik değerleri, ürünlerin stabilitesi ve mikrobiyal güvenliği açısından önemli parametreler olup, probiyotik ürünlerde beklenen aralıklarla genel olarak uyumludur. Benzer bir çalışmada, ballı içeceğin *Levilactobacillus brevis* ve *Lacticaseibacillus paracasei* cinsi bakteriler ile 48 saatlik fermentasyonu sonunda pH sırasıyla 3,49 ve 3,48 olarak ölçülmüştür (Eidt vd., 2023).

Fermente içeceklerin toplam asitlik değerleri incelendiğinde elde edilen ürünlerde asitlik gelişiminin zayıf olduğu görülmektedir. Yahsi ve Sengun (2024) yaptıkları ürün denemelerinde toplam asitliğin 0,69–1,37 g laktik asit/100 mL aralığında değiştiğini belirtmiştir. Benzer durumun; çeşitli bitkiler, bazı meyve ve sebzeler ile hazırlanan fermente içeceklerde de görüldüğü tespit edilmiştir (Öztürk Oruç ve Çakır, 2019).

Her iki üründe de fermentasyon sonunda pH değerinde azalma ve asitlikte artış gözlemlenmiştir. Ancak, arı ekmeği kullanılarak fermente edilen ballı içecekte asitlik daha yüksek bulunmuştur. Serbest asitlik değerlerindeki farklılıkların, kullanılan fermentasyon substratlarının (17YT4 izolatı ve arı ekmeği) kimyasal bileşimleri, mikrobiyal aktiviteleri ve üretilen asit türlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, arı ekmeği kullanılarak fermente edilen içecekte; arı ekmeğinin hem substrat hem de içerikteki bir bileşen olduğu unutulmamalıdır. 17YT4 izolatı ile fermente edilen ürün daha hafif bir asidik yapı sergilerken, arı ekmeği ile fermente edilen ürün daha güçlü bir asidik karaktere sahiptir.

Karışık kültür ile fermente edilen bal içeceğinin pH değeri fermente edilmemiş kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Bu düşüşe paralel olarak karışık kültür örneğinde asitlik değeri artmıştır. Ancak, karışık kültürün asitlik düzeyi, arı ekmeği ile fermente edilen ve özellikle maya kullanılarak fermente edilen içeceklere kıyasla anlamlı düzeyde düşük kalmıştır ($p<0,05$). Bu bulgu, karışık kültürdeki *E. faecalis* izolatlarının asit toleransı veya fermentasyon kinetiği bakımından diğer gruplardaki (arı ekmeği, maya) mikroorganizmalara göre daha düşük oranda asit üretme kapasitesine sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Maya ve probiyotik izolat ko-fermentasyonu ile üretilen bal içeceği, diğer tüm gruplara kıyasla kimyasal parametrelerde istatistiksel olarak en anlamlı değişiklikleri sergilemiştir ($p<0,05$). Kullanılan mayanın ve *E. faecali*s izolatı ile güçlü sinerjik etkileşim gösterdiği düşünülmektedir. Literatürde *Saccharomyces boulardii*'nin probiyotikler üzerindeki olumlu etkilerine yer verilmiştir (Hedin vd., 2024). *Lactobacillus rhamnosus* GG ve *Saccharomyces boulardii*'nin birlikte antipatojenik etki gösterdiği (Moens vd., 2019), *S. boulardii*'nin probiyotik ürünlerde bakterilere eşlik ederek etkinliklerini arttırdığı (Lazo-Vélez vd., 2018) ve probiyotik içecek üretiminde gelecek vadeden bir mikroorganizma olduğu belirtilmektedir (Monciozo Domingos vd., 2025).

S. boulardiinin probiyotik içecek formülasyonlarında kullanılan geleneksel bakteriyel probiyotiklere kıyasla teknolojik üstünlüklere sahip olduğu da belirtilmektedir (Lazo-Vélez vd., 2018). Bu mayanın asidik ortamlarda canlılığını koruyabildiği ve raf ömrü boyunca canlılığını devam ettirebileceği bildirilmektedir (Monciozo Domingos vd., 2025). Ayrıca, fermentasyon sırasında daha düşük asit üretmesi sayesinde son üründe daha dengeli bir tat profili sağladığı belirtilmiştir (Lazo-Vélez vd., 2018). Bakteriyel probiyotiklerle birleştirildiğinde, genel probiyotik etkinliğini artıran, bakteri sağkalım oranlarını iyileştiren ve kapsamlı bağırsak sağlığı faydaları sağlayan sinerjik ilişkiler oluşturduğu gösterilmiştir (Monciozo Domingos vd., 2025).

4.10.2. Brix

Brix ölçümü, ürünlerin tatlılığını ve genel kalitesini belirlemek için kullanılabilecek basit ve hızlı bir yöntemdir. Bal bazlı ürünler için °Brix değerleri, içerdiği bileşenler ve üretim tekniklerine bağlı olarak önemli ölçüde değişebilmektedir. %12 (w/v) konsantrasyonda hazırlanan bal şerbetinde fermentasyon öncesi °Brix değeri 11'dir. İzolat kullanılarak fermente edilen üründe bu değer 10,4 iken arı ekmeği kullanılarak fermente edilen üründe 10,7 °Brix'tir (bkz. Çizelge 4.15).

Saeid vd., (2021) tarafından bal ve fındık kullanılarak üretilen bir içecekte °Brix değerleri eklenen bal miktarı ile doğru orantılı bulunmuştur. Su kefiri ile fermente edilen bazı detoks sularının fermentasyon sonrası °Brix değerlerinde bir azalma olduğu belirtilmiştir.

Taze detoks sularının °Brix değeri ortalama 10,4 iken, fermentasyon sonunda bu değer 8,6'ya düşmüştür. Fermentasyon sırasında, fermente olabilen şekerler laktik asit, etil alkol ve karbondioksite dönüştüğünden, içeceklerin şeker içeriğinin azaldığı belirtilmiştir (Gülhan, 2023). Fermente içeceklerin depolama sürecinde fizikokimyasal özelliklerini değerlendiren bir çalışmada; fermente edilmemiş içecekte °Brix 9,84±0,09 olarak ölçülmüştür. *Bifidobacterium animalis ssp lactis* B94 ve *Lactobacillus rhamnosus* GG ile fermentasyon sonrasında °Brix değerlerinin sırasıyla 10,17±0,17 ile 9,53±0,12 olduğu bildirilmiştir. Fermentasyon sonrası °Brix değerinin arttığı gözlemlenmiştir (Kalkan vd., 2024). Fermentasyonda kullanılan starter kültürün °Brix değerinde belirleyici olduğu fakat bu değişimin birçok faktöre göre şekillendiği görülmektedir.

İzolat ile fermente edilen üründe °Brix değerinde kayda değer bir düşüş gözlemlenmemiştir. Fermentasyon sırasında mikrobiyal aktiviteye bağlı olarak şeker miktarının ve dolayısıyla °Brix değerinin azalması beklenen bir durumdur. Bununla birlikte Brix değerinin, tek başına fermentasyonla şeker tüketimini tam yansıtmayacağı bu yüzden indirgen/toplam şeker analiziyle gerçek şeker kullanımını ortaya koymak gerektiği belirtilmektedir (Yaa'ri vd., 2024). Sadece 48 saatlik bir fermentasyon söz konusu olduğundan şekerin ancak sınırlı bir kısmının tüketildiği düşünülmektedir. Laktik asit bakterilerinin, maya fermentasyonlarının aksine, genellikle tüm şekeri tüketmediği ve fermentasyon belirli bir asit seviyesine ulaştığında kendi ürünleri tarafından inhibe edildiği bildirilmektedir (Magwaza ve Opara, 2015). Bu nedenle, fermentasyon sonrası üründe meydana gelen değişimleri doğru bir şekilde yorumlayabilmek için toplam ve indirgen şeker analizlerine başvurulmuştur. Ayrıca farklı denemeler yapılarak fermentasyonda kullanılan mikroorganizmaların etkisi değerlendirilmiştir.

Dört farklı *E. faecalis* suşundan oluşan karışık kültür ile fermente edilen bal içeceğinin °Brix değerindeki düşüş, fermentasyon sırasında baldaki fermente edilebilir şekerlerin mikroorganizmalar tarafından metabolize edildiğini göstermektedir. İndirgen şeker içeriğinin %7,39 olması fermentasyon sonrasında hala önemli miktarda basit şekerin ortamda kaldığının bir göstergesidir. İndirgen şeker seviyesi tek izolat örneğine göre daha düşük, fermente edilmemiş bal ve arı ekmeği ile fermente edilen örneklere göre ise farklı seviyelerdedir. Bu durum farklı fermentasyon koşullarının şeker profilini etkilediğini

ortaya koymaktadır. Enterokokların fermentasyon sırasında bazı disakkaritleri hidrolize ederek indirgen şeker miktarını artırabileceği, ancak aynı zamanda bu şekerleri metabolize ederek azaltabileceği bilinmektedir (Le Bouguénec ve Schouler, 2011).

Maya ve izolat ile fermente edilen bal içeceğinde *S. boulardii*'nin fermentasyon dinamikleri üzerindeki etkisi °Brix değerindeki düşüş ile net bir şekilde görülmüştür. Bal ortamındaki başlıca şekerler olan glukoz ve fruktozun *S. boulardii* için ideal substratlar olduğu ve mayanın bu şekerleri etanol ve karbondioksite dönüştürdüğü bilinmektedir (Fu vd., 2023). Ancak, aerobik koşullarda mayaların solunum yolu ile şekerleri metabolize edebildiği ve bu süreçte çeşitli organik asitler üretebildiği de vurgulanmaktadır (Lazo-Vélez vd., 2018). *E. faecalis*'in fakültatif anaerobik karakteri ise, ortamdaki oksijen varlığına bağlı olarak hem fermentatif hem de oksidatif metabolizma gerçekleştirebilmesini sağlamaktadır (Byappanahalli vd., 2012). Bu iki mikroorganizmanın bir arada bulunduğu ortamda, karbonhidrat kaynaklarının daha hızlı ve etkin bir şekilde tüketilmesi beklenen bir durumdur. °Brix değerindeki %35,5'lik azalma fermente edilebilir şekerlerin önemli bir kısmının mikroorganizmalar tarafından metabolize edildiğini göstermektedir.

4.10.3. Toplam şeker /indirgen şeker

Arı ekmeği ve probiyotik potansiyele sahip olduğu düşünülen izolat kullanılarak üretilen içeceklerin toplam ve indirgen şeker içerikleri Luff Schoorl metodu kullanılarak karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. İzolat kullanılarak üretilen fermente bal içeceğinin toplam şeker içeriği %9,30 ± 0,25, indirgen şeker içeriği %7,71 ± 1,40 olarak belirlenmiştir. Arı ekmeği kullanılarak üretilen fermente bal içeceğinin toplam şeker içeriği %9,33 ± 0,21, indirgen şeker içeriği %8,70 ± 0,01 olarak tespit edilmiştir (bkz. Çizelge 4.15). Analizler, fermente üründe indirgen şeker seviyelerinin fermentasyon öncesine kıyasla azaldığını ortaya koymaktadır. Bu durum, mikroorganizmaların şekerleri tamamen metabolize etmemekle birlikte önemli ölçüde kullandığını göstermektedir (Cahyanti vd., 2022; Küçükgöz vd., 2024).

Fermentasyon sonrası toplam şeker içeriğindeki düşüş daha sınırlı bulunmuştur. Bu durum *E. faecalis* suşunun öncelikli olarak indirgen şekerleri metabolize ettiği şeklinde yorumlamıştır. Nitekim *E. faecalis* RKY1 suşu ile yapılan bir çalışmada, bu izolatın glukoz, fruktoz ve maltoz gibi şekerleri hızlı ve homolaktik yolla laktik asite dönüştürdüğü bildirilmiştir (Yun vd., 2003). Bununla birlikte, glukozidaz ve invertaz aktivitesi düşük olan bazı *Enterococcus* suşlarının daha sınırlı şeker kullanımı gösterdiği belirtilmiştir (Tamang vd., 2016). Yapılan fermentasyon testlerinde de bal içeceği üretiminde kullanılan izolatın glukoz, fruktoz ve maltozu parçalayabildiği görülmüştür. Laktoz ve sakkaroz gibi disakkaritlerin ise parçalayamadığı tespit edilmiştir.

Bu nedenlerle başlatıcı kültür farklılaştırılarak mevcut izolata (17YT4), maya (*S. boulardii*) ilavesi yapılmıştır. Maya ve izolat ko-fermentasyonu ile üretilen bal içeceğinin, tüm gruplar arasında en düşük toplam şeker içeriğine sahip olduğunu görülmektedir (Çizelge 4.15). Bu değer, fermente edilmemiş kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). En yüksek oranda şeker tüketimi maya ve izolat kullanılarak fermente edilen bal içeceğindedir. Mevcut durum, kullanılan iki mikroorganizmanın şeker metabolizmasında sinerjik etki oluşturduğunu ve bu sinerjinin son ürünün kompozisyonunu belirlediği görülmektedir. *S. boulardii'*nin, genel *Saccharomyce*s cinsi mayalar gibi glukoz ve fruktozu hızla metabolize edebilen güçlü bir glikolitik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Manshin vd., 2025). Tez kapsamında elde edilen *E. faecalis* izolatının glukozu ve fruktozu laktik aside dönüştürebildiği görülmüştür. Ko-fermentasyon ortamında *S. boulardii*'nin sağladığı besin faktörlerinin *E. faecalis*'in gelişimini ve şekerden laktik asit üretimi verimliliğini arttırdığı düşünülmektedir (Manshin vd., 2025).

4.10.4. Toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite

YT4'nolu izolat ve bu izolatın elde edildiği arı ekmeği kullanılarak fermente edilen bal içeceklerinin toplam fenolik madde içerikleri ve antioksidan kapasiteleri, fermente edilmemiş bal içeceği ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16. Ballı içecek örneklerinin toplam fenolik madde ve antioksidan kapasitesi

İçecek Örneği	TFM (mg GAE /ml)	DPPH (µmol/ml)
Fermente edilmemiş	0,25±0,01^{c}	0,05±0,02^{b}
İzolat ile fermente edilen	0,33 ± 0,01^{b}	0,09 ± 0,01^{b}
Arı ekmeği ile fermente edilen	0,53 ± 0,03^{a}	0,20 ± 0,01^{a}

Sonuçlar aritmetik ortalama, ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Aynı sütunda farklı küçük harfler ile gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak fark ($p<0,05$) vardır. TFM: Toplam fenolik madde miktarı, DPPH: Antioksidan kapasitenin belirlenmesinde kullanılan yönteme dair kısaltmadır.

Fermente edilen her iki üründe fermente edilmemiş içeceğe kıyasla toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasitede artış görülmüştür. Literatürde laktik asit bakterilerinin fenolik bileşikleri serbest forma çevirerek toplam polifenol içeriğini ve antioksidan kapasiteyi artırdığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Yan vd., 2023; Ran vd., 2024). LAB'a ait β-glukozidaz ve esteraz gibi enzimlerin matriksteki bağlı fenolik asitleri hidrolize ederek serbest fenoller oluşturduğu ve bu bileşiklerin güçlü elektron radikal temizleme kapasitesi gösterdiği belirtilmektedir (Afolabi vd., 2023).

Arı ekmeği bazlı ürünün, diğer ürüne kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($p<0,05$) yüksek toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan kapasiteye sahip olduğu görülmüştür. Arı ekmeği ile üretilen içeceğin antioksidan kapasitesinin, karşılaştırılan diğer örneğe kıyasla yaklaşık iki kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, arı ekmeği kullanımının fenolik bileşiklerin salınımını veya biyoyararlanımını önemli ölçüde artırdığını göstermektedir. Ayrıca, arı ekmeğinin doğal olarak polifenolik bileşikler içermesinin fermente ürüne ek katkı sağladığı net bir şekilde görülmektedir. Literatürde, bu ürünlerin biyoaktif özelliklerini artırmak amacıyla çeşitli besin kaynakları (arı poleni, propolis, arı ekmeği) veya fonksiyonel katkı maddeleri (prebiyotik lifler, fenolik ekstraktlar) kullanıldığı bildirilmektedir (Swain vd., 2014; Pimentel vd., 2021).

Nedyalkov ve diğerleri (2024) yaptıkları çalışmada bitki çaylarına bal ilavesi edilmesinin, toplam fenolik madde içeriğini ve antioksidan kapasiteyi anlamlı derecede arttırdığını bildirmiştir. Benzer şekilde, kombuça gibi fermente çay bazlı içeceklerde balın sadece tatlandırıcı değil, aynı zamanda polifenol düzeyini ve DPPH etkinliğini arttıran bir unsur olduğu vurgulanmıştır (Watawana vd., 2017).

4.10.5. Renk tayini

Fermente edilen ve edilmeyen ballı içeceklerde ölçümler gerçekleştirilmiş, L*, a* ve b* değerleri kaydedilmiştir. Örneklere ait renk tayini sonuçları Çizelge 4.17'de verilmiştir. Renk, bal ve bal şerbeti gibi ürünlerde kalite göstergesi olarak kullanılmakta ve tüketici tercihlerini doğrudan etkilemektedir. Literatürde ve bazı bilimsel kaynaklarda amber renkli sıvılar için belirli standartlar bulunmaktadır (Hasnul Hadi vd., 2021). Fermente ballı içecekler kendine özgü renk parametreleri sergilemektedir. Elde edilen renk verileri, ürünün fiziksel karakterizasyonuna katkı sağlamak amacıyla kullanılmıştır.

Çizelge 4.17. Ballı içecek örneklerinin renk tayini sonuçları

	Renk Değerleri (L*, a*, b*)		
İçecek Örneği	L*	a*	b*
Fermente edilmemiş	92,345 ±0,785^{a}	-0,275 ± 0,007^{a}	8,195 ± 0,007^{b}
İzolat ile fermente edilen	91,915 ± 0,021^{a}	-0,34 ± 0,000^{b}	8,215 ± 0,007^{b}
Arı ekmeği ile fermente edilen	85,20 ± 0,014^{b}	-2,165 ± 0,007^{c}	19,86 ± 0,014^{a}

Sonuçlar aritmetik ortalama, ± standart sapma şeklinde verilmiştir. Aynı sütunda farklı küçük harfler ile gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak fark ($p<0,05$) vardır. L*: aydınlık ekseni; a*: kırmızı-yeşil ekseni; b*: sarı-mavi ekseni

Renk analiz sonuçları, bal içeceği örnekleri arasında istatiksel farklılıklar ($p<0,05$) olduğunu ortaya koymuştur. Bulgular hem fermentasyon işleminin hem de başlatıcı kültür tipinin ürün rengi üzerinde etkileri olduğunu göstermektedir.

Fermente edilmeyen ballı içecek ve izolat ile fermente edilen içecek benzer L* değerleri sergilemiştir. Probiyotik fermentasyonun tek başına ürün parlaklığını önemli ölçüde etkilemediği görülmüştür. Bununla birlikte, arı ekmeği ile fermente edilen içecek belirgin şekilde daha düşük L* değeri göstermiştir. Mevcut koyu rengin arı ekmeğinde bulunan pigmentler ve fenolik bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu bulgular, arı ekmeğinin çeşitli karotenoidler ve flavonoidler içerdiğini ve bunların daha koyu renge katkıda bulunduğunu bildiren önceki çalışmalarla uyumludur (Pinto ve Vilela, 2021).

İncelenen tüm örnekler yeşilimsi tonları gösteren negatif a* değerleri sergilemiş, ancak arı ekmeği ile fermente edilen içecek daha yüksek negatif değerle diğerlerinden ayrılmıştır. Arı ekmeği ile fermente edilen içecekte gözlenen bu yeşilimsi tonun polen

tanelerindeki klorofil türevlerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Arı ekmeği kullanılarak fermente edilen içecek diğer örneklerle karşılaştırıldığında daha yüksek sarılık değeri sergilemiştir. Gözlemlenen bu farklılıkların, ürün bileşimindeki arı ekmeği varlığından kaynaklandığı söylenebilir.

4.11. Fermente Bal İçeceği Duyusal Özellikleri

Tez çalışması kapsamında; fermente edilmemiş bal içeceği, probiyotik potansiyele sahip olduğu düşünülen izolat ve arı emeğinin kendisi ile fermente edilen bal içeceği örnekleri duyusal olarak tüketici beğeni testi kullanılarak karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.18). Ayrıca, farklı starter kültürlerin fermente bal içeceğinde meydana getirdiği değişimlerin izlenebilmesi amacıyla, deneme içecekleri de panelistlere sunulmuştur. Özellikle maya ve izolat ile fermente edilen içeceğin gaz (karbonizasyon) içeriği nedeniyle yapısal olarak diğerlerinden ayrıldığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.18. İçecek örneklerinin duyusal test sonuçları

Örnek Kodu	Koku	Tat	Ağızda Bıraktığı His	Genel Kabul Edilebilirlik
Bal şerbeti	8,08±0,76	7,68±0,69^{a}	7,48±0,653^{b}	7,04±0,539^{c}
İzolat ile fermente edilen	8±0,71	7,16±0,55^{b}	8,4±0,76^{a}	8,12±0,60^{a}
Arı ekmeği ile fermente edilen	7,6±0,91	7,52±0,65^{ab}	8,04±0,84^{a}	7,68±0,69^{b}

Sonuçlar aritmetik ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak fark ($p<0,05$) vardır.

Örneklere ait koku skorunda istatiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Bununla birlikte arı ekmeğinden üretilen fermente içecekte çiçek kokusunu andıran farklı bir koku bulunduğu, bu yönüyle ürünün diğerlerinden ayrıldığı belirtilmiştir. Ürünlere ait tat ve ağızda bıraktığı hisse dair sonuçlarda; fermente olmamış bal şerbeti diğer ürünlerden daha tatlı olarak algılanmıştır, panelistler diğer örneklerle kıyaslandığında daha yavan bir tat aldıklarını bildirmiştir. Panelistler probiyotik izolat kullanılarak üretilen içecekte ekşi bir tat aldıklarını iletmiştir. Arı ekmeği kullanılarak üretilen içecek için de benzer yorumlar yapılmıştır, ayrıca bu üründe karakteristik floral tat öğelerini algılayan panelist sayısı fazladır. Bu duruma ürüne eklenen arı ekmeğinin sebep olduğu düşünülmektedir, arı ekmeği arı poleninin fermente hali olup çiçek polenlerinden oluşmaktadır.

Genel kabul edilebilirlik düzeyi incelendiğinde; en yüksek skor, izolat ile üretilen ballı içeceğe aittir. Panelistler, bu üründe algılanan hafif ekşimsi tat profilinin, içeceğe ferahlık hissi kattığını ve bu özelliğin beğeniyi artıran bir faktör olduğunu belirtmişlerdir. Zheplinska vd., (2022) bal şerbetinin raf ömrü ve duyusal özellikleri üzerine yaptıkları çalışmada üretilen içeceğin optimal berraklık, hafif renk profili ve bal bazlı ürünlere özgü belirgin organoleptik özellikler sergilediği belirtmiştir. Bal kullanılarak hazırlanan çoğu içecekte yüksek kabul edilebilirlik düzeylerine rastlanmaktadır (Saeid vd., 2021).

Tez çalışması kapsamında ortaya çıkan ürünün duyusal profilinin geliştirilmesinin ticarileşme adımı için faydalı olacağı öngörülmektedir. Eidt vd., (2023) çoklu starter kültür kullanarak ürettikleri bal bazlı fermente içeceğin %86 oranında kabul indeksi aldığını bildirmiştir. Buna rağmen farklı *E. faecalis* suşlarının kullanıldığı fermente bal içeceğinde anlamlı bir duyusal farklılık tespit edilememiştir. Yapılan değerlendirmeler, suş değişiminin panelistler tarafından algılanabilir, ayırt edici bir karakter oluşturmadığını ortaya koymuştur. Mevcut durum bu suş grubunun fermente içeceğe sınırlı ve tekdüze bir tat-aroma katkısı yaptığını düşündürmektedir. Birbiriyle benzer *Enterococcus* suşlarının dar metabolik profile sahip olmaları nedeniyle fermente üründen istenen kompleks aroma/tat bileşenlerini yeterince üretemediği görülmektedir.

Literatürde, kullanılan karışık kültürlerin özellikle farklı probiyotik bakteri çeşitlerinden oluştuğu durumlarda içeceklerin daha fazla beğeni aldığı sonuçlara rastlanmıştır (Öztürk Oruç ve Çakır, 2019; Eidt vd., (2023). Benzer şekilde maya ve izolat ile fermente edilen bal içeceği daha fazla beğeni almış olup, gazlı fermente bal içeceğinin ferahlatıcı bir etki yarattığı belirtilmiştir. Ancak, ürüne ait tat skoru (6,4±0,5) diğer formülasyonlara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur.

Elde edilen veriler, belirli karakteristik özelliklere sahip farklı mikroorganizma gruplarının ko-fermentasyonunun ürünün kimyasal ve duyusal niteliklerini değiştirerek genel tüketici kabulünü etkileyeceğini ortaya koymaktadır. Fermente gıda üretiminde farklı mikrobiyal grupların (bakteri, maya ve küf) stratejik kullanımının oldukça yaygın olduğu bilinmektedir. Bu yaklaşımın, asitlendirme, alkol üretimi ve enzimatik

dönüşümler gibi ayırt edici metabolik aktiviteler aracılığıyla ürünlerin güvenliğini, besin değerini ve duyusal kalitesini yükselttiği belirtilmektedir (Tamang vd., 2015).

4.12. Fermente Bal İçeceği Raf Ömrü

Tez kapsamında üretilen fermente bal içeceği örnekleri 28 gün boyunca +4°C derece de muhafaza edilmiştir. Üretimi yapılan örneklerde depolama süresince haftalık olarak pH ve titrasyon asitliği takip edilmiş, ayrıca LAB sayımı alınmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.19'da verilmiştir.

Örneklerinin test edilen raf ömrü süresi boyunca pH, titrasyon asitliği ve LAB sayılarındaki değişimleri değerlendirildiğinde, her iki örnekte de benzer mikrobiyal fermentasyon eğilimleri gözlemlenmiştir. Ancak fermentasyon dinamiklerinin kullanılan başlatıcı kültüre göre farklılaştığı görülmüştür.

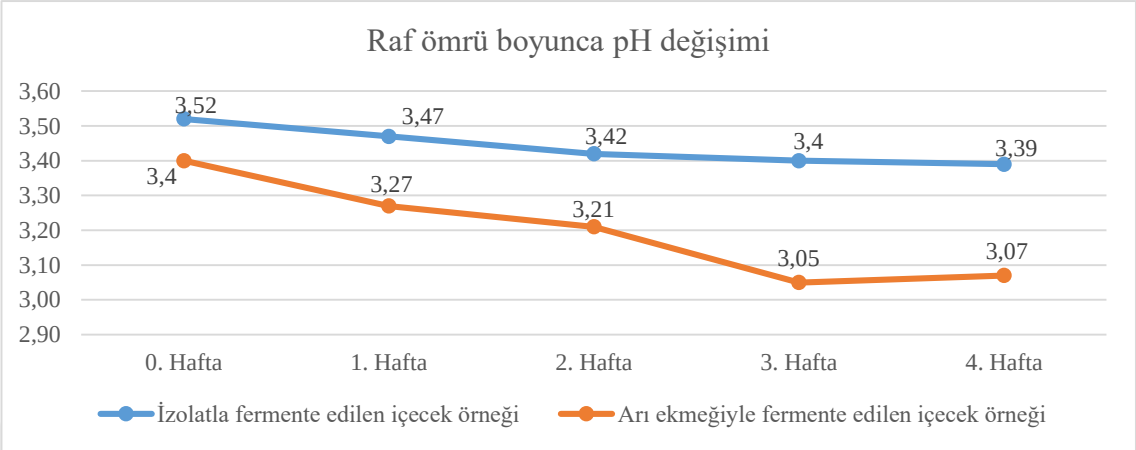
Çizelge 4.19. Fermente bal içeceği örneklerinin pH, titrasyon asitliği ve LAB sayım sonuçları

İçecek Örneği		0. hafta	1. hafta	2. hafta	3. hafta	4. hafta
İzolatla fermente edilen	pH	3,52±0,03^{a}	3,47±0,01^{ab}	3,42±0,00^{bc}	3,40±0,00^{c}	3,39±0,01^{c}
	Asitlik	0,18±0,00^{d}	0,25±0,0^{c}	0,29±0,00^{bc}	0,32±0,00^{b}	0,38±0,03^{a}
	LAB	7,48 ±0,03^{a}	7,36 ±0,05^{a}	6,08 ±0,01^{b}	4,99 ±0,00^{c}	4,77±0,05^{d}
Arı ekmeğiyle fermente edilen	pH	3,40±0,03^{a}	3,27±0,01^{ab}	3,21±0,01^{bc}	3,05±0,07^{c}	3,07±0,18^{c}
	Asitlik	0,32±0,01^{d}	0,36±0,00^{c}	0,40±0,01^{b}	0,57±0,01^{a}	0,60±0,01^{a}
	LAB	7,19±0,04^{a}	7,05±0,01^{a}	5,02±0,03^{b}	4,65±0,07^{c}	3,39±0,12^{d}

Sonuçlar aritmetik ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Aynı satırda farklı harfler ile gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak fark ($p<0,05$) vardır. Asitlik, % (w/v) laktik asit eşdeğeri olarak verilmiştir.

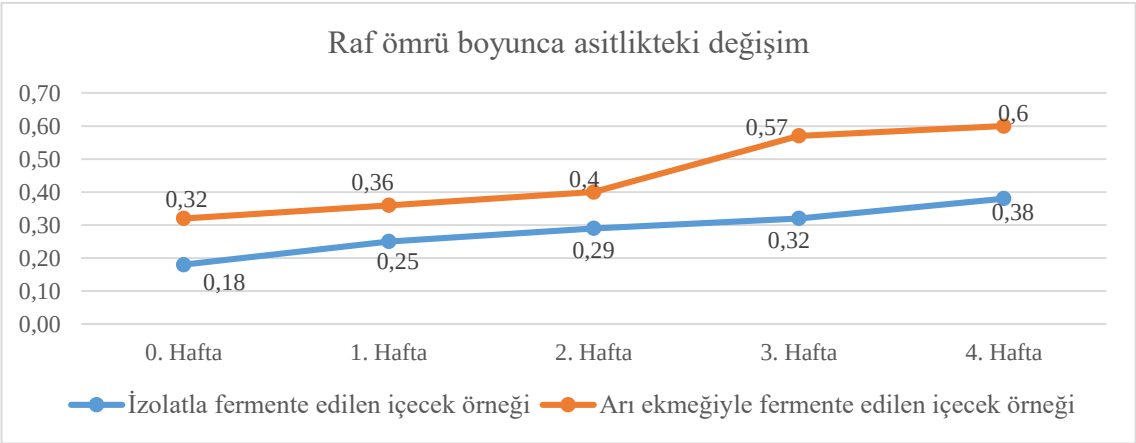
Her iki örnekte de zamanla pH değerlerinde anlamlı azalmalar ($p<0,05$) gözlemlenmiştir. İzolat ile fermente edilen üründe pH başlangıçta 3,52 iken 4. haftada 3,39'a düşmüş; arı ekmeği ile fermente edilen üründe ise 3,40'tan 3,07'ye kadar düşmüştür (Şekil 4.7). Özellikle arı ekmeği ile fermente üründe pH düşüşü daha hızlı ve daha belirgin bulunmuştur. Bu durum, arı ekmeği kaynaklı mikrobiyal florada bulunan mikroorganizmaların daha hızlı asit üretme potansiyeline sahip olabileceğini düşündürmektedir. Genel olarak değerlendiğinde pH düşüşü beklenen bir sonuçtur.

Fermente içeceklerdeki pH değişiminin; kullanılan başlatıcı kütür, substrat ve ortamdaki inhibe edici madde varlığından etkilendiği bilinmektedir (Kalkan vd., 2024)



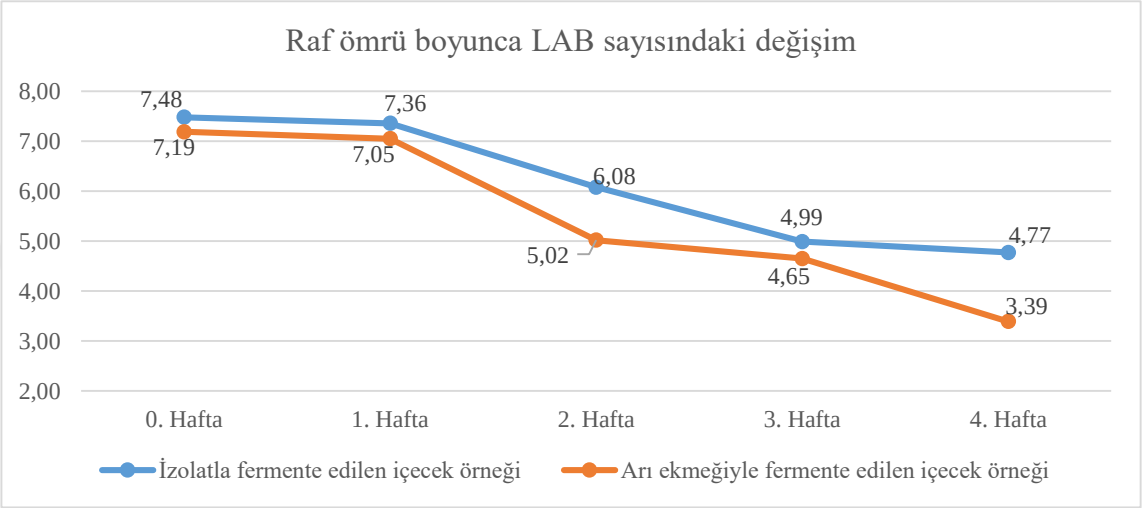
Şekil 4.7. Fermente içecek örneklerinin raf ömrü boyunca pH değerlerindeki değişim

Örneklere ait toplam titrasyon asitliği incelendiğinde zamanla doğru orantılı ve anlamlı biçimde artış görülmüştür ($p<0,05$). İzolatla fermente edilen üründe asitlik %0,18'den %0,38'e yükselirken; arı ekmeğiyle fermente edilen üründe %0,32'den %0,60'a çıkmıştır (Şekil 4.8). Arı ekmeğiyle fermente edilen örnekte daha yüksek asitlik seviyeleri tespit edilmiştir. 3. hafta sonunda istatiksel olarak anlamlı bir biçimde artış görülmüştür. Bu artışla birlikte LAB sayısının önemli ölçüde azalmıştır. Artmaya başlayan asitliğin mikroorganizma gelişimini sınırlandırdığı ve bu durumun fermentasyonun doğal yapısı gereği ortaya çıktığı görülmektedir.



Şekil 4.8. Fermente içecek örneklerinin raf ömrü boyunca asitlik değerlerindeki değişim

Her iki içecek örneğinin LAB sayımları incelendiğinde, ilk hafta boyunca probiyotik canlılığının korunduğu görülmüştür. İkinci haftadan sonra, LAB sayımlarında kademeli bir azalma kaydedilmiştir. İzolat kullanılarak fermente edilen örnekte başlangıçta 7,48 log kob/mL olan değer, 28 günlük raf ömrü sonunda 4,77'ye; arı ekmeği kullanılarak fermente edilen örnekte ise 7,19'dan 3,39 log kob/mL'ye düşmüştür (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Fermente içecek örneklerindeki laktik asit bakteri (LAB) sayısının raf ömrü boyunca değişimi

LAB sayısındaki azalmanın birden fazla sebebi olduğu düşünülmektedir. Fermentasyon sürecinde ortamda biriken asitlik düzeylerinin bakteriyel canlılık üzerinde inhibe edici etkisi bilinmektedir (Hetényi vd., 2011). Bitki bazlı fermente içeceklerin bir ay süre ile +4°C'de muhafaza edildiği çalışmalar bulunmaktadır (Malganji vd., 2016; Demarinis vd., 2022). Fakat bu raf ömrü süresinin kullanılan başlatıcı kültüre bağlı olarak değiştiği belirtilmektedir. Malganji vd. (2016) farklı laktobasiller kullanarak fermente ettikleri üzüm suyu örneklerinde 4 haftalık soğuk depolama (+4°C) boyunca gerçekleşen değişimleri gözlemlemiştir. *Lactobacillus rhamnosus* ve *Lactobacillus delbrueckii* suşları, raf ömrü sonunda *Lactobacillus plantarum*'a kıyasla daha yüksek mikrobiyal canlılık sergilemiştir. Duyusal değerlendirme ise, *Lactobacillus rhamnosus* ile aşılanmış üzüm suyunun depolama süresince genel kabul edilebilirliğinin diğer örneklere göre belirgin şekilde daha yüksek olduğu ortaya konmuştur.

Yine, *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus reuteri, Lactobacillus casei* ve *Enterococcus faecium* gibi 5 farklı probiyotik izolatın vişne suyu gibi asidik meyve matrisinde +4°C'de 28 günlük muhafazası denemiş ve tüm izolatlarda farklı sağ kalım yüzdeleri elde edilmiştir. (Azarkhavarani vd., 2019). Fermentasyonda kullanılan izolat ve ortamın bileşiminin muhafaza süresi üzerinde belirleyici olduğu ifade edilmiştir. Aynı çalışmada *Enterococcus faecium*'un en düşük canlılık oranına sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu, enterokokların bal veya meyve orijinli yüksek asitlik içeren ortamlarda uzun süreli stabilizasyonunun sınırlı olabileceğini düşündürmektedir.

Elde edilen sonuçlar bir arada değerlendirildiğinde; içecek örnekleri +4°C'de 28 günlük soğuk depolama periyodunda hem mikrobiyal canlılık hem de kimyasal stabilite açısından önemli kinetik farklılıklar sergilemiştir. Her iki örnekte de ilk iki hafta boyunca stabil pH değerleri ve yüksek LAB canlılığının korunduğu gözlenmiş; bu sürenin ardından asitlik değerlerinde anlamlı bir artış ve buna bağlı olarak LAB canlılığında düşüş trendine girilmiştir. İzolat ile fermente edilen örnek, arı ekmeği ile fermente edilen ürüne kıyasla ılımlı bir pH düşüşü ve daha kademeli bir asitlik artışı kinetiği sergilemiştir. Bu daha dengeli kimyasal profil, izolat örneğinin tahmini raf ömrünü 21 güne kadar uzatabilirken, arı ekmeği ile fermente edilen ürün için bu sürenin yaklaşık 14 günle sınırlandırılması gerektiğini düşündürmektedir. Depolama süresinin sonunda (28. gün), her iki örnekte de LAB canlılığının probiyotik minimum eşik değerlerinin (<6 log kob/mL) altına inmesi ve yükselen asitlik düzeyleri, ürünün probiyotik fonksiyonelliği üzerinde zayıflatıcı bir etki yaratmaktadır.

Bu nedenle, ticari ürün için daha kısa süreli bir raf ömrü belirlenmesi, ürünün duyusal ve fonksiyonel bütünlüğünün tüketiciye garanti edilmesini sağlayarak genel kabulünü artıracaktır. Aynı zamanda, soğuk zincir boyunca mikrobiyal canlılık riskini minimize edilerek hem marka güvenilirliğinin hem de ürünün uzun vadeli sürdürülebilirliğinin sağlanacağı düşünülmektedir.

5. SONUÇ

Bu tez çalışmasında fonksiyonel kültür taşıma potansiyelinin araştırılması amacıyla Marmara bölgesinden farklı arı ekmeği örnekleri toplanmıştır. Laktik asit bakteri izolasyonu yapılarak elde edilen izolatlar, probiyotik kültür olma potansiyeli yönüyle değerlendirilmiş ve probiyotik olduğu belirlenen bir adet izolat ile izolatın elde edildiği arı ekmeği örneği fermente bal içeceği üretiminde kullanım açısından denenmiştir.

Çalışma sonuçları arı ekmeğinin yalnızca bir arı ürünü olmanın ötesinde, fonksiyonel mikroorganizmalar için doğal ekolojik bir ortam olduğunu ve bu yönüyle potansiyel bir probiyotik kaynağı olarak değerlendirilebileceğini göstermiştir. Arı ekmeği kaynaklı laktik asit bakterilerinin izolasyonu, fenotipik ve teknolojik özelliklerinin belirlenmesi ile, bu mikrobiyotanın fonksiyonel kültür olarak kullanılabilirliğini destekleyen bulgular elde edilmiştir. İzole edilen *Enterococcus faecalis* suşlarının, asit ve safra toleransı, otoagregasyon ve hidrofobisite gibi probiyotik performans göstergelerine sahip olduğu, ayrıca kolesterol asimilasyon kapasitesi bakımından anlamlı potansiyel taşıdığı belirlenmiştir.

Ülkemizde bal, arıcılık faaliyetlerinin temel çıktısı ve Türk mutfağının vazgeçilmez bir öğesidir. Bal şerbetinin mevcut sağlık yararının arttırılması ve fonksiyonel yönden geliştirilmesinin fermentasyonla mümkün olabileceği düşünülmektedir. Fermentasyonda kullanılan izolatın, diğer bir arıcılık ürünü olan ve süper gıda olarak tanımlanan arı ekmeğinden elde edilmesi çalışmayı özgün kılmaktadır. Ayrıca, arı ekmeğinin kendisi kullanılarak üretilen içecek ve üzerinde yapılan incelemeler, geliştirilebilecek yeni ürünler açısından bizlere önemli bir vizyon sağlamıştır.

Tez çalışması kapsamında toplanan arı ekmeği örneklerinde tespit edilen TMAB, küf/maya ve LAB sayımlarının literatürde bildirilen değerlerle uyumlu olduğu görülmüştür. Sayım sonuçlarında dikkate değer varyasyonlar, mikrobiyotanın coğrafi köken, mevsimsel faktörler ve fermentasyon şekli gibi çeşitli parametrelerden etkilendiğini ve oldukça dinamik bir yapı sergilediğini göstermektedir.

Arı ekmeğinden izole edilen 101 adet LAB suşunun probiyotik potansiyelini değerlendirmek amacıyla yapılan analizlerde, izolatların önemli bir kısmında *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *S. aureus* ATCC 6538, *L. monocytogenes* ATCC 7644'e karşı antimikrobiyal aktivite tespit edilmiştir. Kuyucuk agar difüzyonu test sonuçları incelendiğinde, 16 izolatın sahip oldukları inhibisyon potansiyeli ile diğer izolatlardan ayrıldığı görülmüştür. Gerçekleştirilen antibiyotik duyarlılık testlerinde izolatlar çoğunlukla duyarlı ve az miktarda orta düzey dirençli bulunmuştur. İzolatlar arasında çoklu antibiyotik direnci sergileyen bir suş bulunmayışının, arı ekmeğinden izole edilmiş olmalarına bağlı olduğu düşünülmektedir. Antibiyotik direnç görülmemesi, doğal bir rezervuar olan bu niş ürünün insan etkisinden korunmuş olmasına bağlanmıştır. Bu bulgu, probiyotik aday seçiminde güvenli mikrobiyal kaynakların önemini ortaya koymaktadır.

Probiyotik potansiyelin daha detaylı incelenmesi amacıyla yapılan asit ve safra tuzu direnç testlerinde, izolatların büyük çoğunluğunun pH 3 gibi düşük asitlik koşullarında canlılığını koruyabildiği gözlenmiştir. Bununla birlikte MBK5, 17YT4, BHÇG5 ve 17G4 kodlu izolatların probiyotik mikroorganizmalarda aranan temel özelliklerden biri olan asidik şartlara gösterdiği direnç dikkate değer bulunmuştur. Bu dört izolatın *in-vitro* sindirim simülasyonunda da canlılığı koruyabildiği tespit edilmiştir. Bu bulgular, söz konusu izolatların probiyotik olarak kullanım potansiyeli açısından umut verici olduğunu göstermektedir. İzolatlara uygulanan otoagregasyon kapasitesi ve hücre-yüzey hidrofobisitesi test sonuçları ile kolesterol asimilasyon kapasiteleri de bu potansiyeli destekler niteliktedir.

Çalışma kapsamında izole edilen ve probiyotik potansiyel sergileyen izolatlar mikroskobik incelemelerde kok morfolojisi sergilemiş, antimikrobiyal aktivite ve antibiyotik direnç profilleri açısından belirgin bir benzerlik göstermiştir. Yapılan ileri test sonuçlarında MBK5, 17YT4, BHÇG5 ve 17G4 kodlu izolatlar arasında anlamlı düzeyde farklılık ve ayırt edici bir durumla karşılaşılmamıştır. Bu nedenle izolatlar kullanılarak fermente ballı içecek denemeleri gerçekleştirilmiş ve tüketici beğenisine sahip izolatın tür tanımlaması yapılmıştır. MALDI-TOF MS kullanılarak yapılan tür tanımlama sonucunda izolatın *Enterococcus faecalis* olduğu tespit edilmiştir.

Enterococcus türlerinin arı ekmeğindeki varlığı, bu bakterilerin doğada toprak, bitki ve su gibi ortamlarda yaygın olarak bulunmalarının yanı sıra arıların bağırsak mikrobiyotasında da doğal olarak yer almalarından kaynaklanmaktadır. Arıların polen toplama sırasında çevresel kaynaklardan edindikleri bu mikroorganizmalar, peteklerde depolanan polenlerde kolonize olarak fermentasyon sürecine katılmakta ve böylece arı ekmeğinin mikrobiyotasında yer almaktadır. Ayrıca, *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* gibi laktik asit bakterileri gıdalarda starter kültür olarak kullanılmaktadır. Et ve süt ürünlerinde starter olarak bu türlerden yararlanılması fermentasyon sürecini hızlandırmakta ve patojen mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmektedir. Bu bakteriler, farklı yollarla uçucu aromatik bileşiklerin oluşumu gibi etkiler yaratarak ürünün organoleptik özelliklerini geliştirmektedir. Yine de bazı suşların antibiyotik dirence sahip olabileceği dikkate alınmalı ve bu suşların seçimleri titizlikle yapılmalıdır.

Çalışmada kapsamında hazırlanan bal şerbeti, arı ekmeklerinin de toplandığı bölgeden alınan kestane balından hazırlanmıştır. Yapılan kimyasal ve fonksiyonel analizler, balın doğal yapısını koruduğunu ve tağşiş içermediğini doğrulamaktadır. Kullanılan arı ekmeği benzer polen içeriğine sahiptir. Bal ve arı ekmeği örneklerinin, *Castanea sativa* (kestane) florası bakımından zengin olan Bursa ve Yalova illerinden elde edilmiş olması çalışma sonuçları açısından belirleyici olmuştur. İleri çalışmalarda arı ekmeğindeki mikrobiyal topluluğun yapısını ile polen bileşimi arasındaki bağlantısallığın araştırılması ufuk açıcı olacaktır. Ayrıca arı poleni kaynaklı kimyasal bileşenlerin son ürünün biyokimyasal özelliklerini şekillendirdiği görülmektedir. Arı ekmeği ile fermente edilen bal içeceğinin sahip olduğu aroma ve lezzet unsurları büyük oranda içeriğindeki arı poleninden kaynaklanmaktadır.

Üretilen fermente bal içeceklerinin mikrobiyolojik kalite analizleri, gıda güvenliği ve fonksiyonel potansiyel açısından olumlu bir tablo çizmektedir. TMAB ve LAB sayımları, fermente edilen tüm örneklerde, probiyotik ürünler için belirlenen minimum eşik değerin üzerinde canlı bakteri seviyelerine ulaşıldığını göstermiştir. Ancak, probiyotiklerin *in-vivo* etki gösterebilmesi için daha yüksek canlılık seviyelerine ihtiyaç olduğu

görülmektedir. Gıda güvenliği açısından, incelenen örneklerin çoğunda toplam küf ve maya yükünün tespit sınırının altında olması, pastörizasyon ve takip eden fermentasyon sürecinin etkinliğini doğrulamaktadır. Bu bulgular, bal bazlı bu ürünlerin fonksiyonel içecek pazarında rekabetçi bir potansiyele sahip olduğunu, ancak canlılık hedefine ulaşmak için formülasyon optimizasyonunun gerekli olduğunu işaret etmektedir.

Tez kapsamında izole edilen 17YT4 kodlu *E. faecalis* izolatı ile arı ekmeği kullanılarak üretilen fermente bal içeceği hem kimyasal bileşim hem de fonksiyonel özellikler bakımından kayda değer nitelikler sergilemiştir. İzolat ile fermente edilen ürün, ılımlı asitlik seviyeleri ve sınırlı şeker tüketimi ile daha nötr ve hafif asidik bir yapı göstermiştir. Arı ekmeği ile fermente edilen ürün ise, biyofonksiyonel zenginlik açısından öne çıkmıştır. Bu örnekte, toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan kapasite seviyeleri yüksek bulunmuştur. Mevcut durum, arı ekmeğinde doğal polifenolik bileşenlerinin varlığından kaynaklanmıştır. Fiziksel analizler de bu ayrımı desteklemiş; arı ekmeği örneği, doğal pigmentler nedeniyle daha koyu ve belirgin sarı tonlarda bir renk karakteristiği sergileyerek diğerlerinden kolayca ayırt edilmiştir. Ancak her iki üründe de LAB, fermentasyon sonrası şeker tüketiminde sınırlı kalmıştır.

Bu nedenle gerçekleştirilen farklı starter kültür denemeleri sonucunda fermente bal içeceğinin bazı kimyasal ve fonksiyonel niteliklerinin ayrıştığı görülmüştür. Asitlik ve şeker metabolizması açısından maya ve izolat ko-fermentasyonu tüm gruplar arasında en güçlü metabolik aktiviteyi sergilemiştir. En yüksek asit üretimi ve en kapsamlı şeker tüketimine ulaşan örnek olmuştur. Diğer yandan, karışık kültür ve tek izolat fermentasyonları daha ılımlı bir asitlik gelişimi ve daha sınırlı şeker tüketimi göstermiştir. Sonuç olarak, maya ve izolat ko-fermentasyonu metabolik etkinliği ile öne çıkarken, arı ekmeği ile fermente edilen ürün biyofonksiyonel zenginlik açısından en tatmin edici sonuçları sunmuştur.

İçecekler üzerine yapılan tanımlayıcı analizler ve duyusal değerlendirmeler ürünün tüketici kabulüne açık olduğunu ve ticari potansiyel taşıdığını göstermektedir. İçecekler panelistlerden genel olarak yüksek puanlar almış olmasına rağmen, duyusal değerlendirme sonuçları, alternatif uygulamaların aroma ve tat profillerini

geliştirebileceğini ve onları daha çekici hale getirebileceğini göstermektedir. Bununla birlikte fermentasyon süreçlerinin standardizasyonu, ürünün fonksiyonel özelliklerinin daha kapsamlı araştırılması ve kullanılan izolatın güvenlik değerlendirmelerinin derinleştirilmesi gibi atılacak birçok adım bulunmaktadır.

Raf ömrü boyunca değerlendirilen bulgulara göre; izolatla fermente edilen ballı içecek daha uzun süreli mikrobiyal denge ve daha stabil ürün profili sağlamaktadır. Arı ekmeğiyle fermente edilen örnek ise daha hızlı fermentasyon sağlayabilmesine rağmen kısa vadede asidifikasyonun hızlanması ve LAB sayılarının hızlı düşüşü gibi dezavantajlara sahip bulunmuştur. Bu veriler ışığında, her iki fermentasyon stratejisinin de farklı pazar gereksinimlerine hitap ettiği ve geliştirilmesi gerektiği düşünülmektedir. Karışık kültür ile fermente edilen bal içeceğinin sahip olduğu değerlendirmeler de bu görüşü destekler niteliktedir. Optimize edilmiş bir starter kültür ve bileşim ile formüle edilen ballı içecek, üstün bir fonksiyonel profile kavuşturulabilir. Bu strateji, ürün kalitesini en üst düzeye çıkarırken, modern ambalajlama çözümleriyle desteklendiğinde uzun raf ömrü olan, ticari açıdan uygulanabilir bir probiyotik içecek prototipinin ortaya çıkmasını sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Afolabi, F. T., Adewale, O. P., & Adeyemo, S. M. (2022). Isolation, production and optimization of beta-galactosidase by utilizing yeasts isolated from selected dairy products. *Journal of Food Safety and Hygiene*, *8(3)*, 170-182.

Afolabi, I. S., Adigun, A. J., Garuba, P. A., Ahuekwe, E. F., Odutayo, O. E., & Adeyemi, A. O. (2023). *Enterococcus faecalis*-Aided Fermentation to Facilitate Edible Properties and Bioactive Transformation of Underutilized Cyathea dregei Leaves. *Fermentation*, *9(8)*. https://doi.org/10.3390/fermentation9080707

Akgün, N., Çelik, Ö. F., & Kelebekli, L. (2021). Physicochemical properties, total phenolic content, and antioxidant activity of chestnut, rhododendron, acacia and multifloral honey. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *15(4)*, 3501-3508. https://doi.org/10.1007/s11694-021-00937-3

Akhmetova, R., Sibgatullin, J., Garmonov, S., & Akhmetova, L. (2012). Technology for extraction of bee-bread from the honeycomb. *Procedia Engineering*, *42*, 1822-1825. https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.07.577

Aksoy, A., Altunatmaz, S. S., Aksu, F., Tokatlı Demirok, N., Yazıcı, K., & Yıkmış, S. (2024). Bee bread as a functional product: phenolic compounds, amino acid, sugar, and organic acid profiles. *Foods*, *13(5)*, 795. https://doi.org/10.3390/foods13050795

Almeida-Santos, A. C., Novais, C., Peixe, L., & Freitas, A. R. (2021). *Enterococcus* spp. as a producer and target of bacteriocins: a double-edged sword in the antimicrobial resistance crisis context. *Antibiotics*, *10(10)*, 1215.

Alp, D., & Ertürkmen, P. (2017). Probiyotik olarak kullanılan *Lactobacillus* spp. suşlarının kolesterol düşürücü etkileri ve olası mekanizmalar. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, *8(1)*, 108-113.

Anandharaj, M., Sivasankari, B., & Parveen Rani, R. (2014). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on hypercholesterolemia: A review. *Chinese Journal of Biology*, *2014*, 1-7. https://doi.org/10.1155/2014/572754

Anderson, K. E., Carroll, M. J., Sheehan, T., Mott, B. M., Maes, P., & Corby-Harris, V. (2014). Hive-stored pollen of honey bees: Many lines of evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion. *Molecular Ecology*, *23(23)*, 5904-5917. https://doi.org/10.1111/mec.12966

Anderson, K. E., Sheehan, T. H., Eckholm, B. J., Mott, B. M., & DeGrandi-Hoffman, G. (2011). An emerging paradigm of colony health: Microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). *Insectes Sociaux* (*C. 58*, Sayı 4, ss. 431-444). https://doi.org/10.1007/s00040-011-0194-6

Anderson, K. E., Sheehan, T. H., Mott, B. M., Maes, P., Snyder, L., Schwan, M. R., Walton, A., Jones, B. M., & Corby-Harris, V. (2013). Microbial ecology of the hive and pollination landscape: Bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE, 8(12).* https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083125

Angmo, K., Kumari, A., Savitri, & Bhalla, T. C. (2016). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT, 66,* 428-435. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.057

Anjum, S. I., Ullah, A., Khan, K. A., Attaullah, M., Khan, H., Ali, H., Bashir, M. A., Tahir, M., Ansari, M. J., Ghramh, H. A., Adgaba, N., & Dash, C. K. (2019). Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi Journal of Biological Sciences* (*C. 26*, Sayı 7, ss. 1695-1703). *Elsevier B.V.* https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.08.013

Anonim, 2002, AOAC 990.03-2002. Protein (Crude) in animal feed. http://www.aoacofficialmethod.org/index.php?main_page=product_info&products_id=1983. Erişim: 23.03.2025

Anonim, 2008a, TSE 13359. Bal Standardı Türk Standartları Enstitüsü, Ankara. https://intweb.tse.org.tr/standard/standard/Standard.aspx?081118051115108051104119110104055047105102120088111043113104073097106122089121097102053048082055. Erişim: 29.05.2025

Anonim, 2008b, TSE 13357. Bal Standardı Türk Standartları Enstitüsü, Ankara. https://intweb.tse.org.tr/standard/standard/Standard.aspx?081118051115108051104119110104055047105102120088111043113104073084099047106122117049066109081121. Erişim: 29.05.2025

Anonim, 2008c, TSE 13366. Bal Standardı Türk Standartları Enstitüsü, Ankara. https://intweb.tse.org.tr/standard/standard/Standard.aspx?081118051115108051104119110104055047105102120088111043113104073102065099048117080050122103051110. Erişim: 25.09.2025

Anonim, 2015, TS EN ISO 12966-4: Hayvansal ve bitkisel yağlar — Yağ asidi metil esterlerinin gaz kromatografisi — Bölüm 4: Kapiler gaz kromatografisiyle belirleme. *Türk Standardları Enstitüsü*.

Anonim, 2018, EFSA. On Additives, E. P., Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., de Lourdes Bastos, M., ... & Galobart, J. (2018). Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. *Efsa Journal*, 16(3), e05206.

Anonim, 2020, Türk Gıda Kodeksi. 2020/7 Sayılı Bal Tebliğ https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2020/04/20200422-13.htm

AOAC (2020). Official methods of analysis of AOAC International (21. baskı). Association of Official Analytical Chemists International.

Apaydın, D. (2022). Trakya yöresi ballarının mineral içeriği ve bazı tipik kalite parametreleri açısından değerlendirilmesi. *Gıda, 47(5),* 804-819. https://doi.org/10.15237/gida.gd22057

Arafat, H. H., Shoulkamy, M. A., Imam, M. M., & Ali, A. (2025). A novel *Enterococcus durans* with antimicrobial, anti-diabetes and anti-alzheimer activities isolated from Egypt. *AMB Express*, *15(1),* 1-13.

Arias, C. A., & Murray, B. E. (2012). The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*, *10(4),* 266-278.

Association of Official Analytical Chemists. (2000). Official methods of analysis (17th ed., Method 930.35: Reducing and total sugars by Lane–Eynon titration). AOAC International.

Atabey, S. (2023). A journey from antiquity to the present: A comparative analysis from oxymellite to sirkencebin. *Journal of Current Researches on Social Sciences (JoCReSS).* https://doi.org/10.26579/jocress.13.3.7

Avşar, C., Özler, H., Berber, I., & Civek, S. (2016). Phenolic composition, antimicrobial and antioxidant activity of Castanea sativa Mill. pollen grains from Black Sea region of Turkey. *International Food Research Journal*, *23(4).*

Aylanc, V., Falcão, S. I., & Vilas-Boas, M. (2023). Bee pollen and bee bread nutritional potential: Chemical composition and macronutrient digestibility under in vitro gastrointestinal system. *Food Chemistry*, 413. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135597

Aylanc, V., Falcão, S. I., Ertosun, S., & Vilas-Boas, M. (2021). From the hive to the table: Nutrition value, digestibility and bioavailability of the dietary phytochemicals present in the bee pollen and bee bread. *Trends in Food Science and Technology*, *109,* 464-481. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.042

Ayyash, M. M., Abdalla, A. K., AlKalbani, N. S., Baig, M. A., Turner, M. S., Liu, S. Q., & Shah, N. P. (2021). Invited review: Characterization of new probiotics from dairy and nondairy products—Insights into acid tolerance, bile metabolism and tolerance, and adhesion capability. *Journal of Dairy Science* (*C. 104*, Sayı 8, ss. 8363-8379). Elsevier Inc. https://doi.org/10.3168/jds.2021-20398

Azarkhavarani, P. R., Ziaee, E., & Hosseini, S. M. H. (2019). Effect of encapsulation on the stability and survivability of *Enterococcus faecium* in a non-dairy probiotic beverage. *Food Science And Technology International*, *25(3),* 233-242.

Bağcı, U. (2012). *Anne Sütünden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Gıda Teknolojisi Bakımından Önemli Olan Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi.* [Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi].

Bakour, M., Fernandes, Â., Barros, L., Sokovic, M., Ferreira, I. C. F. R., & Badiaa lyoussi. (2019). Bee bread as a functional product: Chemical composition and bioactive properties. LWT, *109,* 276-282. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.008

Bakour, M., Laaroussi, H., Ousaaid, D., El Ghouizi, A., Es-Safi, I., Mechchate, H., & Lyoussi, B. (2022). bee bread as a promising source of bioactive molecules and functional properties: An up-to-date review. *Antibiotics* (*C. 11*, Sayı 2). MDPI. https://doi.org/10.3390/antibiotics11020203

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* (*C. 6,* Sayı 2, ss. 71-79). Xi'an Jiaotong University. https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005

Banerjee, G., Nandi, A., & Ray, A. K. (2017). Assessment of hemolytic activity, enzyme production and bacteriocin characterization of *Bacillus subtilis* LR1 isolated from the gastrointestinal tract of fish. *Archives of Microbiology*, *199(1),* 115-124.

Barbieri, F., Montanari, C., Gardini, F., & Tabanelli, G. (2019). Biogenic amine production by lactic acid bacteria: A review. *Foods* (*C. 8,* Sayı 1). MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute. https://doi.org/10.3390/foods8010017

Barta, D. G., Cornea-Cipcigan, M., Margaoan, R., & Vodnar, D. C. (2022). Biotechnological processes simulating the natural fermentation process of bee bread and therapeutic properties—An overview. *Frontiers in Nutrition (C. 9).* Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fnut.2022.871896

Begley, M., Hill, C., & Gahan, C. G. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, *72(3),* 1729-1738.

Belhadj, H., Harzallah, D., Khennouf, S., Dahamna, S., Bouharati, S., & Baghiani, A. (2009). *Isolation, identification and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from Algerian honeybee collected pollen*. In XIII International Conference on Medicinal and Aromatic Plants *854 (*pp. 51-58).

Ben Braiek, O., & Smaoui, S. (2019). *Enterococci*: between emerging pathogens and potential probiotics. *Biomed Research International*, *2019(1),* 5938210.

Ben-Miled, H., Benoit-Biancamano, M. O., Ben-Mahrez, K., & Réjiba, S. (2023b). Alpha-amylase and alphaglucosidase inhibitory properties, beta-galactosidase activity, and probiotic potential of lactic acid bacteria and *bifidobacteria* from *Apis mellifera* intermissa and its products. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *39(8).* https://doi.org/10.1007/s11274-023-03648-7

Ben-Miled, H., Semmar, N., Castellanos, M. S., Ben-Mahrez, K., Benoit-Biancamano, M. O., & Réjiba, S. (2023a). Effect of honey bee forage plants in Tunisia on diversity and antibacterial potential of lactic acid bacteria and bifidobacteria from *Apis mellifera* intermissa and its products. *Archives of Microbiology, 205(8).* https://doi.org/10.1007/s00203-023-03630-9

Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., & Facino, R. M. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta, 533(2),* 185-191.

Beykaya, M., Tanuğur Samancı, A. E., Samancı, T., Önder, E. Y., Uzun, E. M., & Tosun, F. (2021). Investigation of nutritional and antioxidant properties of anatolian bee bread. *Journal of Apicultural Science, 65(2),* 255-263. https://doi.org/10.2478/jas-2021-0017

Bhat, B. A., Mir, R. A., Qadri, H., Dhiman, R., Almilaibary, A., Alkhanani, M., & Mir, M. A. (2023). Integrons in the development of antimicrobial resistance: critical review and perspectives. *Frontiers in Microbiology, 14,* 1231938.

Bilginer, H., & Çetin, B. (2019). Probiyotikler ve belirlenmelerinde kullanılan in vitro testler. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi,* 312-325. https://doi.org/10.17097/ataunizfd.549552

Bin Hafeez, A., Pełka, K., Worobo, R., & Szweda, P. (2024). In silico safety assessment of *bacillus* ısolated from polish bee pollen and bee bread as novel probiotic candidates. *International Journal of Molecular Sciences, 25(1).* https://doi.org/10.3390/ijms25010666

Binda, S., Hill, C., Johansen, E., Obis, D., Pot, B., Sanders, M. E., Tremblay, A., & Ouwehand, A. C. (2020). Criteria to qualify microorganisms as "probiotic" in foods and dietary supplements. *Frontiers in Microbiology (C. 11).* Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01662

Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology, 13(1),* 42-51.

Bo, L., Sun, H., Li, Y. D., Zhu, J., Wurpel, J. N., Lin, H., & Chen, Z. S. (2024). Combating antimicrobial resistance: the silent war. *Frontiers in Pharmacology, 15,* 1347750.

Bogdanov,S. (2011). *PollenBook* https://www.researchgate.net/publication/304011810

Borycka, K., Grabek-Lejko, D., & Kasprzyk, I. (2015). Propiedades antioxidantes y antibacterianas de productos comerciales de polen de abejas. *Journal of Apicultural Research, 54(5),* 491-502. https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1185309

Bosch, M., Nart, J., Audivert, S., Bonachera, M. A., Alemany, A. S., Fuentes, M. C., & Cuñé, J. (2012). Isolation and characterization of probiotic strains for improving oral

health. *Archives of Oral Biology, 57(5),* 539-549. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.10.006

Byappanahalli, M. N., Nevers, M. B., Korajkic, A., Staley, Z. R., & Harwood, V. J. (2012). *Enterococci* in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews, 76(4),* 685-706.

Cacan, E., Kokten, K., & Kilic, O. (2018). Leaf fatty acid composition of some *Lamiaceae* taxa from Turkey. *Progress in Nutrition, 20,* 231-236. https://doi.org/10.23751/pn.v20i1-S.5930

Cahyanti, A. N., Novianto, E., Sampurno, A., Sudjatinah, M., & Wibowo, C. H. (2022). *Viability of lactic acid bacteria and ıts sugar metabolism capability in fermentation using local salak extract.* In International Conference on Agricultural, Nutraceutical, And Food Science (ICANFS) 2022 (*Vol. 1*, pp. 174-179).

Campedelli, I., Mathur, H., Salvetti, E., Clarke, S., Rea, M.C., Torriani, S., Ross, R.P., Hill, C. and O'Toole, P.W. (2019). Genus-wide assessment of antibiotic resistance in *Lactobacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology, 85(1),* e01738-18.

Cani, P. D., & de Vos, W. M. (2017). Next-generation beneficial microbes: The case of *Akkermansia muciniphila*. *Frontiers in Microbiology* (*C. 8*, Sayı SEP). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01765

Cankurt, H. (2024). Studies on Ottoman sherbets from the past to present. *Osmanlı Medeniyeti Araştırmaları Dergisi, (22),* 350-371.

Carina Audisio, M., Torres, M. J., Sabaté, D. C., Ibarguren, C., & Apella, M. C. (2011). Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. *Microbiological Research, 166(1),* 1-13. https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.01.003

Casarotti, S. N., Carneiro, B. M., Todorov, S. D., Nero, L. A., Rahal, P., & Penna, A. L. B. (2017). In vitro assessment of safety and probiotic potential characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from water buffalo mozzarella cheese. *Annals of Microbiology, 67(4),* 289-301.

Cebrián, R., Baños, A., Valdivia, E., Pérez-Pulido, R., Martínez-Bueno, M., & Maqueda, M. (2012). Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. *Food Microbiology, 30(1),* 59-67. https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.002

Čeksteryte, V., Navakauskiene, R., Treigyte, G., Jansen, E., Kurtinaitiene, B., Dabkevičiene, G., & Balžekas, J. (2016). Fatty acid profiles of monofloral clover beebread and pollen and proteomics of red clover (*Trifolium pratense*) pollen. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 80(11),* 2100-2108. https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1204218

Cella, M.A., Coulson, T., MacEachern, S., Badr, S., Ahmadi, A., Tabatabaei, M.S., Labbe, A. and Griffiths, M.W. (2023). Probiotic disruption of quorum sensing reduces virulence and increases cefoxitin sensitivity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports, 13(1),* 4373.

Cemeroğlu, B. S. (2013). *Gıda Analizleri* (3. baskı). Bizim Grup Basımevi, Ankara.

Cholakov, R., Yanakieva, V., & Denkova, Z. (2014). Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* BG24, isolated from naturally fermented cereal beverage. https://www.researchgate.net/publication/275099385

CLSI, (2017). Performance Standarts for Antimicrobial Susceptibility Testing, CLSI Suplement M100. Clinical and Laboratory Standarts Institute.

Coburn, P. S., & Gilmore, M. S. (2003). The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cellular Microbiology, 5(10),* 661-669.

Codex Alimentarius Commission, "Standard For Honey," Codex Stan, *vol. 12*, p*p*. 1–8, 2001.

Coelho, M. C., Malcata, F. X., & Silva, C. C. G. (2022). Lactic acid bacteria in raw-milk cheeses: from starter cultures to probiotic functions. *Foods* (*C. 11,* Sayı 15). MDPI. https://doi.org/10.3390/foods11152276

Colautti, A., Arnoldi, M., Comi, G., & Iacumin, L. (2022). Antibiotic resistance and virulence factors in *lactobacilli*: something to carefully consider. *Food Microbiology* (C. 103). Academic Press. https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103934

Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology, 226(5),* 1065-1073.

Combey, R. (2017). Microbial and qualitative analyses of stingless bee bread using dry preservation methods. *European Journal of Zoological Research, 5(1),* 45-50.

Conte, G., Benelli, G., Serra, A., Signorini, F., Bientinesi, M., Nicolella, C., Mele, M., & Canale, A. (2017). Lipid characterization of chestnut and willow honeybee-collected pollen: Impact of freeze-drying and microwave-assisted drying. *Journal of Food Composition and Analysis, 55,* 12-19. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.11.001

Cui, S., & Kim, E. (2024). Quorum sensing and antibiotic resistance in polymicrobial infections. *Communicative & Integrative Biology, 17(1),* 2415598.

Cunningham, M., Azcarate-Peril, M. A., Barnard, A., Benoit, V., Grimaldi, R., Guyonnet, D., Holscher, H. D., Hunter, K., Manurung, S., Obis, D., Petrova, M. I., Steinert, R. E., Swanson, K. S., van Sinderen, D., Vulevic, J., & Gibson, G. R. (2021). Shaping the future

of probiotics and prebiotics. *Trends in Microbiology* (*C. 29*, Sayı 8, ss. 667-685). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.01.003

Cuvas-Limón, R. B., Ferreira-Santos, P., Cruz, M., Teixeira, J. A., Belmares, R., & Nobre, C. (2022). Novel bio-functional aloe vera beverages fermented by probiotic *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus lactis*. *Molecules*, *27(8).* https://doi.org/10.3390/molecules27082473

Damto, T., Birhanu, T., & Zewdu, A. (2023). Physicochemical and antioxidant characterization of commercially available honey sample from Addis Ababa market, Ethiopia. *Heliyon*, *9(10).*

Darilmaz, D. O., & Beyatli, Y. (2012). Investigating hydrophobicity and the effect of exopolysaccharide on aggregation properties of dairy propionibacteria isolated from Turkish homemade cheeses. *Journal of Food Protection*, *75(2)*, 359-365. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-225

Das, T. K., Pradhan, S., Chakrabarti, S., Mondal, K. C., & Ghosh, K. (2022). Current status of probiotic and related health benefits. *Applied Food Research* (*C. 2*, Sayı 2). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100185

Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., & Greenberg, E. P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, *280(5361)*, 295-298.

De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2004). Environmental stress responses in *Lactobacillus*: A review. *Proteomics (C. 4*, Sayı 1, ss. 106-122). https://doi.org/10.1002/pmic.200300497

Deghorain, M., Goffin, P., Fontaine, L., Mainardi, J.L., Daniel, R., Errington, J., Hallet, B. and Hols, P. (2007). Selectivity for D-lactate incorporation into the peptidoglycan precursors of *Lactobacillus plantarum*: role of Aad, a VanX-like D-alanyl-D-alanine dipeptidase. *Journal of Bacteriology*, *189(11)*, 4332-4337.

DeGrandi-Hoffman, G., Chen, Y., Rivera, R., Carroll, M., Chambers, M., Hidalgo, G., & de Jong, E. W. (2016). Honey bee colonies provided with natural forage have lower pathogen loads and higher overwinter survival than those fed protein supplements. *Apidologie*, *47(2)*, 186-196. https://doi.org/10.1007/s13592-015-0386-6

Delcenserie, V., Martel, D., Lamoureux, M., Amiot, J., Boutin, Y., & Roy, D. (2008). Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Current Issues in Molecular Biology*, *10(1/2)*, 37.

Demarinis, C., Verni, M., Pinto, L., Rizzello, C. G., & Baruzzi, F. (2022). Use of selected lactic acid bacteria for the fermentation of legume-based water extracts. *Foods*, *11(21).* https://doi.org/10.3390/foods11213346

Deng, C., Pan, J., Zhu, H., & Chen, Z. Y. (2023). Effect of gut microbiota on blood cholesterol: A review on mechanisms. *Foods, 12(23),* 4308.

Desbois, A. P., & Smith, V. J. (2010). Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology, 85(6),* 1629-1642.

Detry, R., Simon-Delso, N., Bruneau, E., & Daniel, H. M. (2020). Specialisation of yeast genera in different phases of bee bread maturation. *Microorganisms, 8(11),* 1789.

Di Cagno, R., Filannino, P., Cantatore, V., & Gobbetti, M. (2019). Novel solid-state fermentation of bee-collected pollen emulating the natural fermentation process of bee bread. *Food Microbiology, 82,* 218-230. https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.02.007

Didaras, N. A., Karatasou, K., Dimitriou, T. G., Amoutzias, G. D., & Mossialos, D. (2020). Antimicrobial activity of bee-collected pollen and beebread: State of the art and future perspectives. *Antibiotics* (*C. 9,* Sayı 11, ss. 1-29). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/antibiotics9110811

Disayathanoowat, T., Li, H., Supapimon, N., Suwannarach, N., Lumyong, S., Chantawannakul, P., & Guo, J. (2020). Different dynamics of bacterial and fungal communities in hive-stored bee bread and their possible roles: A case study from two commercial honey bees in china. *Microorganisms, 8(2).* https://doi.org/10.3390/microorganisms8020264

Doan, L. P., Nguyen, T. T., Pham, M. Q., Tran, Q. T., Pham, Q. L., Tran, D. Q., Than, V. T., & Bach, L. G. (2019). Extraction process, identification of fatty acids, tocopherols, sterols and phenolic constituents, and antioxidant evaluation of seed oils from five fabaceae species. *Processes, 7(7),* 1-11. https://doi.org/10.3390/pr7070456

Doğan, O., & Cebeci, A. (2021). Bazı geleneksel Türk gıdalarından laktik asit bakterilerinin izolasyonu. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 58(1),* 87-95. https://doi.org/10.20289/zfdergi.658513

Domingos-Lopes, M. F. P., Stanton, C., Ross, P. R., Dapkevicius, M. L. E., & Silva, C. C. G. (2017). Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food Microbiology, 63,* 178-190.

Dong, Z., Yang, S., Tang, C., Li, D., Kan, Y., & Yao, L. (2025). New insights into microbial bile salt hydrolases: from physiological roles to potential applications. *Frontiers in Microbiology, 16,* 1513541.

Dranca, F., Ursachi, F., & Oroian, M. (2020). Bee bread: Physicochemical characterization and phenolic content extraction optimization. *Foods, 9(10).* https://doi.org/10.3390/foods9101358

Dreyer, A., Lenz, C., Groß, U., Bohne, W., & Zautner, A. E. (2024). Comparative analysis of proteomic adaptations in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* after long term bile acid exposure. *BMC Microbiology, 24(1),* 110.

Duche, R.T., Singh, A., Wandhare, A.G., Sangwan, V., Sihag, M.K., Nwagu, T.N., Panwar, H. and Ezeogu, L.I. (2023). Antibiotic resistance in potential probiotic lactic acid bacteria of fermented foods and human origin from Nigeria. *BMC Microbiology, 23(1),* 142.

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

Eidt, G., Koehler, A., Dall Cortivo, P. R., Ayub, M. A. Z., Flôres, S. H., & Arthur, R. A. (2023). Development and consumer acceptance testing of a honey-based beverage fermented by a multi-species starter culture. *Food Bioscience, 56.* https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103182

Elnar, A. G., & Kim, G. B. (2025). Probiotic potential and safety assessment of bacteriocinogenic *Enterococcus faecalis* CAUM157. *Frontiers in Microbiology, 16,* 1563444.

Elzeini, H. M., Ali, A. R. A. A., Nasr, N. F., Elenany, Y. E., & Hassan, A. A. M. (2021). Isolation and identification of lactic acid bacteria from the intestinal tracts of honey bees, *Apis mellifera L.,* in Egypt. *Journal of Apicultural Research, 60(2),* 349-357.

Enan, G., Negm, S., Ismaiel, A. A., & Abdel-Shafi, S. (2018). Classification, antimicrobial potential, industrial applications and probiotic capability of lactic acid bacteria: a review article Fungal endophytes and their secondary metabolites. *Journal of Applied Sciences*. https://www.researchgate.net/publication/330006181

Evivie, S. E., Huo, G. C., Igene, J. O., & Bian, X. (2017). Some current applications, limitations and future perspectives of lactic acid bacteria as probiotics. *Food and Nutrition Research* (*C. 61,* Sayı 1). Taylor and Francis Ltd. https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1318034

Falà, A. K., Álvarez-Ordóñez, A., Filloux, A., Gahan, C. G., & Cotter, P. D. (2022). Quorum sensing in human gut and food microbiomes: Significance and potential for therapeutic targeting. *Frontiers in Microbiology, 13,* 1002185.

Feresu, S. B., & Muzondo, M. I. (1990). Identification of some lactic acid bacteria from two Zimbabwean fermented milk products. *World Journal of Microbiology and Biotechnology (C. 6).*

Fernández-Martínez, L. T., Javelle, A., & Hoskisson, P. A. (2024). Microbial primer: bacterial growth kinetics. *Microbiology, 170(2),* 001428.

Flahaut, S., Hartke, A., Giard, J. C., Benachour, A., Boutibonnes, P., & Auffray, Y. (1996). Relationship between stress response towards bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbiology Letters, 138(1),* 49-54.

Foley, M. H., O'Flaherty, S., Allen, G., Rivera, A. J., Stewart, A. K., Barrangou, R., & Theriot, C. M. (2021). *Lactobacillus* bile salt hydrolase substrate specificity governs bacterial fitness and host colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 118(6),* e2017709118.

Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Muñoz-Quezada, S., & Gil, A. (2013). Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition, 109* (SUPPL. 2). https://doi.org/10.1017/S0007114512004011

Forssten, S. D., Sindelar, C. W., & Ouwehand, A. C. (2011). Probiotics from an industrial perspective. *Anaerobe, 17(6),* 410-413. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.04.014

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

Freiwald, A., & Sauer, S. (2009). Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nature Protocols, 4(5),* 732-742. https://doi.org/10.1038/nprot.2009.37

Fu, J., Liu, J., Wen, X., Zhang, G., Cai, J., Qiao, Z., An, Z., Zheng, J. and Li, L. (2023). Unique probiotic properties and bioactive metabolites of *Saccharomyces boulardii*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins, 15(4),* 967-982.

Fujii, A., Kawada-Matsuo, M., Le, M.N.T., Suzuki, Y., Nishihama, S., Shiba, H., Aikawa, T. and Komatsuzawa, H. (2025). Comprehensive analysis of bacteriocins produced by clinical enterococcal isolates and their antibacterial activity against *Enterococci* including VRE. *Scientific Reports, 15(1),* 4846.

Galgano, M., Pellegrini, F., Catalano, E., Capozzi, L., Del Sambro, L., Sposato, A., Lucente, M.S., Vasinioti, V.I., Catella, C., Odigie, A.E. and Tempesta, M. (2025). Acquired bacterial resistance to antibiotics and resistance genes: from past to future. *Antibiotics, 14(3),* 222.

Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science, 2,* 106-117.

Garcia, C., Guerin, M., Souidi, K., & Remize, F. (2020). Lactic fermented fruit or vegetable juices: Past, present and future. *Beverages (C. 6,* Sayı 1, ss. 1-31). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/beverages6010008

Gasser, C., Faurie, J. M., & Rul, F. (2024). Regulation of lactose, glucose and sucrose metabolisms in *S. thermophilus*. *Food Microbiology, 121,* 104487

Gawkowski, D., & Chikindas, M. L. (2013). Non-dairy probiotic beverages: The next step into human health. *Beneficial Microbes, 4(2),* 127-142. https://doi.org/10.3920/BM2012.0030

Geniş, B., Öztürk, H., Özden Tuncer, B., & Tuncer, Y. (2024). Safety assessment of enterocin-producing *Enterococcus* strains isolated from sheep and goat colostrum. *BMC Microbiology, 24(1),* 391.

Gharehyakheh, S., Elhami Rad, A. H., Nateghi, L., & Varmira, K. (2019a). Production of GABA-enriched honey syrup using *Lactobacillus* bacteria isolated from honey bee stomach. *Journal of Food Processing and Preservation, 43(8).* https://doi.org/10.1111/jfpp.14054

Ghosh, S., Namin, S. M., & Jung, C. (2022). Differential bacterial community of bee bread and bee pollen revealed by 16s rrna high-throughput sequencing. *Insects, 13(10).* https://doi.org/10.3390/insects13100863

Giaouris, E., Chapot-Chartier, M. P., & Briandet, R. (2009). Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties. *International Journal of Food Microbiology, 131(1),* 2-9. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.006

Gilliam, M., Buchmann, S. L., Lorenz, B. J., & Roubik, D. W. (1985). Microbiology of the larval provisions of the stingless bee, *Trigona hypogea*, an obligate necrophage. *Biotropica*, 28-31.

Gilliam, M., Roubik, D. W., & Lorenz, B. J. (1990). Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. *Apidologie, 21(2),* 89-97.

Giraffa, G. (2003). Functionality of *enterococci* in dairy products. *International journal of food microbiology*, *88(2-3)*, 215-222.

Goh, L.P.W., Molujin, A.M., Muthu, K., Abdulla, R., Sabullah, M.K., Mohd Faik, A.A., Gansau, J.A. and Jawan, R. (2021). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from Sabah (North Borneo) stingless bees for probiotic and food applications. *International Journal of Food Properties, 24(1),* 564-578.

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

Gülhan, A. (2023). Physıcochemıcal, microbiological and sensory analyses of functional detox juices fermented with water kefir graıns. *Gıda, 48(4),* 715-727. https://doi.org/10.15237/gida.gd23039

Gülmez, M. (2022). Antimikrobiyel direnç: Küresel bir sorun. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, *15(1)*, 53-58.

Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., & Hammami, R. (2018). The genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns—an update. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 1791.

Hasnul Hadi, M. H., Ker, P. J., Thiviyanathan, V. A., Tang, S. G. H., Leong, Y. S., Lee, H. J., Hannan, M. A., Jamaludin, M. Z., & Mahdi, M. A. (2021). The amber-colored liquid: A review on the color standards, methods of detection, issues and recommendations. *Sensors* (*C. 21*, Sayı 20). MDPI. https://doi.org/10.3390/s21206866

Hedin, K.A., Mirhakkak, M.H., Vaaben, T.H., Sands, C., Pedersen, M., Baker, A., Vazquez-Uribe, R., Schäuble, S., Panagiotou, G., Wellejus, A. and Sommer, M.O.A. (2024). *Saccharomyces boulardii* enhances anti-inflammatory effectors and AhR activation via metabolic interactions in probiotic communities. *The ISME Journal*, *18(1)*, wrae212.

Hetényi, K., Németh, Á., & Sevella, B. (2011). Role of pH-regulation in lactic acid fermentation: Second steps in a process improvement. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, *50(3)*, 293-299. https://doi.org/10.1016/j.cep.2011.01.008

Human, H., & Nicolson, S. W. (2006). Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii var. davyana* (Asphodelaceae). *Phytochemistry*, *67(14)*, 1486-1492. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.05.023

Hummel, A., Holzapfel, W. H., & Franz, C. M. (2007). Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from *enterococci* isolated from food. *Systematic and Applied Microbiology*, *30(1)*, 1-7.

Huseynov, V. (2023). *Tüberküloz Dişi Mikobakterilerin MALDI-TOF Ms Yöntemi ile Tanimlanmasi*. [Doktora Tezi, Bursa Uludag University].

Ilie, C. I., Spoiala, A., Geana, E. I., Chircov, C., Ficai, A., Ditu, L. M., & Oprea, E. (2024). Bee bread: A promising source of bioactive compounds with antioxidant properties—first report on some antimicrobial features. *Antioxidants*, *13(3)*. https://doi.org/10.3390/antiox13030353

Im, E. J., Lee, H. H. Y., Kim, M., & Kim, M. K. (2023). Evaluation of *enterococcal* probiotic usage and review of potential health benefits, safety, and risk of antibiotic-resistant strain emergence. *Antibiotics*, *12(8)*, 1327.

Imam, U. A., Zahrau, A., & Obeagu, E. I. (2024). The threat of antimicrobial resistance in developing countries: Causes and control strategies. *Idosr Journal of Scientific Research*, *9(1)*, 20-28. https://doi.org/10.59298/IDOSRJSR/2024/1.1.2028.100

Imperial, I. C., & Ibana, J. A. (2016). Addressing the antibiotic resistance problem with probiotics: reducing the risk of its double-edged sword effect. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1983.

Ishimwe, N., Daliri, E. B., Lee, B. H., Fang, F., & Du, G. (2015). The perspective on cholesterol-lowering mechanisms of probiotics. *Molecular Nutrition and Food Research (C. 59,* Sayı 1, ss. 94-105). Wiley-VCH Verlag. https://doi.org/10.1002/mnfr.201400548

Ispirli, H., & Dertli, E. (2021). Detection of fructophilic lactic acid bacteria (FLAB) in bee bread and bee pollen samples and determination of their functional roles. *Journal of Food Processing and Preservation, 45(5).* https://doi.org/10.1111/jfpp.15414

Ivanišová, E., Kačániová, M., Frančáková, H., Petrová, J., Hutková, J., Brovarskyi, V., Velychko, S., Adamchuk, L., Schubertová, Z., & Musilová, J. (2015). Bee bread - Perspective source of bioactive compounds for future. *Potravinarstvo, 9(1),* 592-598. https://doi.org/10.5219/558

İzol, E., Gülçin, İ., & Yılmaz, M. A. (2023). Health effects of honey and honey sherbet with spiritual and scientific sources. *Functional Foods*, ed. Haspolat YK, Kavak V., Asena M., Orient Publications, 89-95.

Jaimee, G., & Halami, P. M. (2016). High level aminoglycoside resistance in *Enterococcus, Pediococcus* and *Lactobacillus* species from farm animals and commercial meat products. *Annals of Microbiology, 66(1),* 101-110.

James, G., Radhakrishnan, V., Marathippallam Jamal, J., Prasannan Geetha, P., Pillai, D., & Vattiringal Jayadradhan, R. K. (2025). Exploring the probiotic potential of *B. cereus* and *B. velezensis* associated with mangrove sediments in aquaculture. *Discover Oceans, 2(1),* 15.

Janashia, I., Carminati, D., Rossetti, L., Zago, M., Fornasari, M. E., Haertlé, T., Chanishvili, N., & Giraffa, G. (2016). Characterization of fructophilic lactic microbiota of *Apis mellifera* from the Caucasus Mountains. *Annals of Microbiology, 66(4),* 1387-1395. https://doi.org/10.1007/s13213-016-1226-2

Janashia, I., Choiset, Y., Jozefiak, D., Déniel, F., Coton, E., Moosavi-Movahedi, A. A., Chanishvili, N., & Haertlé, T. (2018). Beneficial protective role of endogenous lactic acid bacteria against mycotic contamination of honeybee beebread. *Probiotics and Antimicrobial Proteins, 10(4),* 638-646. https://doi.org/10.1007/s12602-017-9379-2

Janković, T., Frece, J., Abram, M., & Gobin, I. (2012). Aggregation ability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *International Journal of Sanitary Engineering Research* (*C. 6,* Sayı 1).

Jaya, F., Rosyidi, D., Radiati, L. E., Minarti, S., Mustakim, Susilo, A., Muslimah, R. H., & Husolli, M. (2020). Antioxidant activity and microbiological quality of bee bread collected from three different species honey bee. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 475(1).* https://doi.org/10.1088/1755-1315/475/1/012033

Kahraman-Ilıkkan, Ö. (2023). Bacterial profile and fatty acid composition of anatolian bee bread samples by metataxonomic and metabolomic approach. *Current Microbiology, 80(3).* https://doi.org/10.1007/s00284-023-03195-2

Kalaycıoğlu, Z., Kanbur, E. D., Kolaylı, S., & Erim, F. B. (2023). Antioxidant activities, aliphatic organic acid and sugar contents of Anatolian bee bread: characterization by principal component analysis. *European Food Research and Technology, 249(5),* 1351-1361. https://doi.org/10.1007/s00217-023-04218-9

Kalkan, S., Kirkkoçoğlu, E., Kaya, Z., & Otağ, M. (2024). Yeşil meyveli soğuk içeceklerin probiyotik bakteriler ile fermantasyonu: biyoaktif, mikrobiyolojik ve fizikokimyasal özellikleri. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi, 14(3),* 1384-1400. https://doi.org/10.31466/kfbd.1465102

Kaplan, M., Karaoglu, Ö., & Silici, S. (2019). An evaluation on bee bread: chemical and palynological analysis. *Mellifera* (*C. 19,* Sayı 1).

Kaplan, Muammer, Öznur Karaoglu, Nazife Eroglu, and Sibel Silici (2016). Fatty acid and proximate composition of bee bread. *Food Technology and Biotechnology*. *54,* no. 4 (2016): 497-504.

Karaman, M., Artık, N., Küçükersan, K., Halıcı, Z., & Çelik, M. (2017). *Sağlıklı beslenme ve apiterapi için değerli bir arı ürünü: Perga (Bee Bread).*

Karska-Wysocki, B., Bazo, M., & Smoragiewicz, W. (2010). Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbiological Research, 165(8),* 674-686. https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.11.008

Kaushik, J. K., Kumar, A., Duary, R. K., Mohanty, A. K., Grover, S., & Batish, V. K. (2009). Functional and probiotic attributes of an indigenous isolate of *lactobacillus plantarum*. *PLoS ONE, 4(12).* https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008099

Kaya, B., & Zorba, N. N. D. (2018). Farklı su aktivitesine sahip çeşitli gıdalarda küf ve maya yükünün belirlenmesi için kullanılan DRBC ve DG18 besiyerlerinin etkinliğinin karşılaştırılması. *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi, 8(2),* 206-214.

Keller, M. K., Hasslöf, P., Stecksén-Blicks, C., & Twetman, S. (2011). Co-aggregation and growth inhibition of probiotic *lactobacilli* and clinical isolates of mutans *streptococci*: An in vitro study. *Acta Odontologica Scandinavica, 69(5),* 263-268. https://doi.org/10.3109/00016357.2011.554863

Khalifa, S. A. M., Elashal, M., Kieliszek, M., Ghazala, N. E., Farag, M. A., Saeed, A., Xiao, J., Zou, X., Khatib, A., Göransson, U., & El-Seedi, H. R. (2020). Recent insights into chemical and pharmacological studies of bee bread. *Trends in Food Science and Technology* (*C. 97,* ss. 300-316). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.021

Khalifa, S. M., Abd El-Aziz, A. M., Hassan, R., & Abdelmegeed, E. S. (2021). β-lactam resistance associated with β-lactamase production and porin alteration in clinical isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae*. *PLoS One, 16(5),* e0251594.

Khan, H., Flint, S. H., & Yu, P. L. (2013). Determination of the mode of action of enterolysin A, produced by *Enterococcus faecalis* B9510. *Journal of Applied Microbiology*, *115(2),* 484-494.

Khare, A., & Gaur, S. (2020). Cholesterol-Lowering Effects of *Lactobacillus* Species. *Current Microbiology* (*C. 77,* Sayı 4, ss. 638-644). Springer. https://doi.org/10.1007/s00284-020-01903-w

Kıprıjanovska, H., Hajrulaı-Muslıu, Z., Golubovskı, M., & Dıkena, D. (2025). Physıcochemıcal propertıes of chestnut honey (*Castanea satıva mıll.)* produced ın the polog regıon of the republıc of north macedonıa. *International Journal of Food Technology and Nutrition*, 8(15-16), 35-42**.**

Kieliszek, M., Piwowarek, K., Kot, A. M., Błażejak, S., Chlebowska-Śmigiel, A., & Wolska, I. (2018). Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. *Trends in Food Science and Technology* (*C. 71,* ss. 170-180). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.021

Kim, D. H., Kim, S. A., Jo, N. G., Bae, J. H., Nguyen, M. T., Jo, Y. M., & Han, N. S. (2023). Phenotypic and genomic analyses of bacteriocin-producing probiotic *Enterococcus faecium* EFEL8600 isolated from Korean soy-meju. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1237442.

Kim, J., Liao, X., Hasan, M., Elafify, M., Kim, J. C., Ding, T., & Ahn, J. (2025). The impact of probiotics on antibiotic resistance: mechanisms, food safety risks, and regulatory considerations. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-28.

Kim, S. H., Woo, H. G., Choi, Y. R., Lee, C. M., Jeong, J. H., Lee, D. H., Lee, C. Y., Oh, I. K., Ha, H. K., Kim, J. S., Choi, B. K., & Huh, C. K. (2022). Quality characteristics of yakju added with lactic acid bacteria-fermented ginseng sprouts. *Korean Journal of Food Preservation, 29(2).* https://doi.org/10.11002/kjfp.2022.29.2.263

Kim, Y., Yoon, S., Shin, H., Jo, M., Lee, S., & Kim, S. H. (2021). Isolation of the cholesterol-assimilating strain *pediococcus acidilactici* LRCC5307 and production of low-cholesterol butter. *Food Science of Animal Resources*, *41(2)*, 300-311. https://doi.org/10.5851/kosfa.2020.e101

Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., Hildebrandt, B., Müller-Bertling, S., Witte, W. and Goossens, H. (2007). Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *59(5)*, 900-912.

Koca, I., Tekguler, B., Turkyilmaz, B., & Tasci, B. (2017, October). *Some physical, chemical and antioxidant properties of chestnut (Castanea sativa Mill.) honey produced in Turkey.* In VI International Chestnut Symposium 1220 (pp. 227-234).

Kolayli, S., Can, Z., Yildiz, O., Sahin, H., & Karaoglu, S. A. (2016). A comparative study of the antihyaluronidase, antiurease, antioxidant, antimicrobial and physicochemical properties of different unifloral degrees of chestnut (*Castanea sativa Mill*.) honeys. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 31,* 96-104. https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1209494

Koloh, R., Balázs, V. L., Nagy-Radványi, L., Kocsis, B., Kerekes, E. B., Kocsis, M., & Farkas, Á. (2024). Chestnut honey is effective against mixed biofilms at different stages of maturity. *Antibiotics, 13(3),* 255.

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

Kumar, G., Balakrishna, K., Mukhopadhyay, C., & Kalwaje Eshwara, V. (2024). Comparison of integron mediated antimicrobial resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from urinary and bacteremic sources. *BMC Microbiology, 24(1),* 102.

Kumari, M., Patel, H. K., Kokkiligadda, A., Bhushan, B., & Tomar, S. K. (2022). Characterization of probiotic lactobacilli and development of fermented soymilk with improved technological properties. *LWT, 154*. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112827

Kurek-Górecka, A., Górecki, M., Rzepecka-Stojko, A., Balwierz, R., & Stojko, J. (2020). Bee products in dermatology and skin care. *Molecules* (*C. 25,* Sayı 3). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/molecules25030556

Küçükgöz, K., Franczak, A., Borysewicz, W., Kamińska, K., Salman, M., Mosiej, W., Kruk, M., Kołożyn-Krajewska, D. and Trząskowska, M. (2024). Impact of lactic acid fermentation on the organic acids and sugars of developed oat and buckwheat beverages. *Fermentation, 10(7),* 373.

Lajunen, T. J., Sullman, M. J., Baddal, B., Tekeş, B., & Apostolou, M. (2023). Antibiotics knowledge, attitudes and behaviours among the population living in Greece and Turkey. *Antibiotics, 12(8),* 1279.

Lazo-Vélez, M. A., Serna-Saldívar, S. O., Rosales-Medina, M. F., Tinoco-Alvear, M., & Briones-García, M. (2018). Application of *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* in food processing: a review. *Journal of Applied Microbiology, 125(4),* 943-951.

Le Bouguénec, C., & Schouler, C. (2011). Sugar metabolism, an additional virulence factor in enterobacteria. *International Journal of Medical Microbiology, 301(1),* 1-6.

LeBlanc, J. G., Laiño, J. E., del Valle, M. J., de Giori, G. S., Sesma, F., & Taranto, M. P. (2015). B-group vitamins production by probiotic lactic acid bacteria. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications: Second Edition* (ss. 279-296). wiley. https://doi.org/10.1002/9781118868386.ch17

Letizia, F., Albanese, G., Testa, B., Vergalito, F., Bagnoli, D., Di Martino, C., Carillo, P., Verrillo, L., Succi, M., Sorrentino, E., Coppola, R., Tremonte, P., Lombardi, S. J., Di Marco, R., & Iorizzo, M. (2022). In vitro assessment of bio-functional properties from *Lactiplantibacillus plantarum* strains. *Current Issues in Molecular Biology, 44(5),* 2321-2334. https://doi.org/10.3390/cimb44050158

Li, Q., Cebrián, R., Montalbán-López, M., Ren, H., Wu, W., & Kuipers, O. P. (2021). Outer-membrane-acting peptides and lipid II-targeting antibiotics cooperatively kill Gram-negative pathogens. *Communications Biology, 4(1),* 31.

Lignon, V. A., Mas, F., Jones, E. E., Kaiser, C., & Dhami, M. K. (2025). The floral interface: a playground for interactions between insect pollinators, microbes, and plants. *New Zealand Journal of Zoology, 52(2),* 218-237.

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

Liu, Y. K., Kuo, H. C., Lai, C. H., & Chou, C. C. (2020). Single amino acid utilization for bacterial categorization. *Scientific Reports, 10(1),* 12686.

Louveaux, J., Maurizio, A., & Vorwohl, G. (1978). Methods of melissopalynology. *Bee World, 59(4),* 139-157.

Luo, C., Peng, S., Li, M., Ao, X., & Liu, Z. (2022). The efficacy and safety of probiotics for allergic rhinitis: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Immunology, 13.* https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.848279

Lye, H. S., Rahmat-Ali, G. R., & Liong, M. T. (2010). Mechanisms of cholesterol removal by *lactobacilli* under conditions that mimic the human gastrointestinal tract. *International Dairy Journal, 20(3),* 169-175.

Machado De-Melo, A. A., Almeida-Muradian, L. B. de, Sancho, M. T., & Pascual-Maté, A. (2018). Composición y propiedades de la miel de *Apis mellifera*: una revisión. *Journal of Apicultural Research (C. 57,* Sayı 1, ss. 5-37). Taylor and Francis Ltd. https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1338444

Magwaza, L. S., & Opara, U. L. (2015). Analytical methods for determination of sugars and sweetness of horticultural products—A review. *Scientia Horticulturae, 184,* 179-192.

Malganji, S., Sohrabvandi, S., Jahadi, M., Nematollahi, A., & Sarmadi, B. (2016). Effect of refrigerated storage on sensory properties and viability of probiotic in grape drink. Short communication, *Applied Food Biotechnology, 3(1),* 59-62. www.journals.sbmu.ac.ir/afb

Manshin, D., Kuntsova, M., Shilenko, A., & Andreeva, A. (2025). Probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*: properties and peculiarities of use in functional foods development. *Functional Foods in Health and Disease, 15(5),* 296-315.

Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal, 16(3),* 189-199. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.02.009

Marković, J., Nedic, N., Anđelković, B., Jevtić, G., Mladenović, M., Petrović, M., & Nedić, N. (2012). Qualıty of pollen and honey bee bread collected ın sprıng. https://www.researchgate.net/publication/364030754

Marrubini, G., Papetti, A., Genorini, E., & Ulrici, A. (2017). Determination of the sugar content in commercial plant milks by near ınfrared spectroscopy and luff-schoorl total glucose titration. *Food Analytical Methods, 10(5),* 1556-1567. https://doi.org/10.1007/s12161-016-0713-1

Mathialagan, M., Thangaraj Edward, Y. S. J., David, P. M. M., Senthilkumar, M., Srinivasan, M. R., & Mohankumar, S. (2018). Isolation, characterization and ıdentification of probiotic lactic acid bacteria (LAB) from honey bees. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 7(04),* 894-906. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.704.096

Mathur, S., & Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International Journal of Food Microbiology, 105(3),* 281-295.

Maurizio, A. (1979). Beitrag zur Kenntnis des Pollenspektrums norwegischer Honige. *Apidologie, 10(4),* 359-393.

Mayda, N., Özkök, A., Ecem Bayram, N., Gerçek, Y. C., & Sorkun, K. (2020). Bee bread and bee pollen of different plant sources: determination of phenolic content, antioxidant activity, fatty acid and element profiles. *Journal of Food Measurement and Characterization, 14(4),* 1795-1809. https://doi.org/10.1007/s11694-020-00427-y

Meradji, M., Bachtarzi, N., Mora, D., & Kharroub, K. (2023). Characterization of lactic acid bacteria strains ısolated from Algerian honeybee and honey and exploration of their potential probiotic and functional features for human use. *Foods, 12(12).* https://doi.org/10.3390/foods12122312

Merenstein, D., Pot, B., Leyer, G., Ouwehand, A.C., Preidis, G.A., Elkins, C.A., Hill, C., Lewis, Z.T., Shane, A.L., Zmora, N. and Petrova, M.I. (2023). Emerging issues in probiotic safety: 2023 perspectives. *Gut Microbes, 15(1),* 2185034.

Mishra, S., & Acharya, S. (2021). A brief overview on probiotics: the health friendly microbes. *Biomedical and Pharmacology Journal, 14(4),* 1869-1880. https://doi.org/10.13005/bpj/2285

Mishra, S., Rath, S., & Mohanty, N. (2020). Probiotics—A complete oral healthcare package. *Journal of Integrative Medicine* (*C. 18,* Sayı 6, ss. 462-469). Elsevier (Singapore) Pte Ltd. https://doi.org/10.1016/j.joim.2020.08.005

Misra, S., & Mohanty, D. (2019). Psychobiotics: A new approach for treating mental illness? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition (C. 59,* Sayı 8, ss. 1230-1236). Taylor and Francis Inc. https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1399860

Moens, F., Duysburgh, C., van den Abbeele, P., Morera, M., & Marzorati, M. (2019). *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces cerevisiae boulardii* exert synergistic antipathogenic activity in vitro against enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Beneficial Microbes, 10(8),* 923-936.

Mohammad, S. M., Mahmud-Ab-Rashid, N. K., & Zawawi, N. (2020a). Botanical origin and nutritional values of bee bread of stingless bee (*Heterotrigona itama*) from Malaysia. *Journal of Food Quality*, 2020. https://doi.org/10.1155/2020/2845757

Mohammad, S. M., Mahmud-Ab-Rashid, N. K., & Zawawi, N. (2020b). Probiotic properties of bacteria isolated from bee bread of stingless bee *Heterotrigona itama*. *Journal of Apicultural Research, 60(1),* 172-187. https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1801152

Mohammad, S. M., Mahmud-Ab-Rashid, N. K., & Zawawi, N. (2021). Stingless bee-collected pollen (bee bread): Chemical and microbiology properties and health benefits. *Molecules* (*C. 26,* Sayı 4). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/molecules26040957

Monciozo Domingos, M., Tanure Werneck, H., Sant'Ana, M. R., & de São José, J. F. B. (2025). *Saccharomyces boulardii* as a promising microorganism for the development of probiotic beverages: An overview. *Food Reviews International, 41(5),* 1592-1607.

Mongi, R. J., & Ruhembe, C. C. (2024). Sugar profile and sensory properties of honey from different geographical zones and botanical origins in Tanzania. *Heliyon, 10(18),* e38094. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e38094

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

Mousavi Khaneghah, A., Abhari, K., Eş, I., Soares, M. B., Oliveira, R. B. A., Hosseini, H., Rezaei, M., Balthazar, C. F., Silva, R., Cruz, A. G., Ranadheera, C. S., & Sant'Ana, A. S. (2020). Interactions between probiotics and pathogenic microorganisms in hosts and foods: A review. *Trends in Food Science and Technology* (*C. 95,* ss. 205-218). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.11.022

Muda, K., Aris, A., Salim, M. R., Ibrahim, Z., van Loosdrecht, M. C. M., Nawahwi, M. Z., & Affam, A. C. (2014). Aggregation and surface hydrophobicity of selected microorganism due to the effect of substrate, pH and temperature. *International Biodeterioration and Biodegradation, 93,* 202-209. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.05.023

Muller, J. A., Ross, R. P., Sybesma, W. F. H., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2011). Modification of the technical properties of *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 by supplementing the growth medium with unsaturated fatty acids. *Applied and Environmental Microbiology, 77(19),* 6889-6898.

Mustar, S., & Ibrahim, N. (2022). A sweeter pill to swallow: A review of honey bees and honey as a source of probiotic and prebiotic products. *Foods, 11(14),* 2102.

Nagai, T., Nagashima, T., Myoda, T., & Inoue, R. (2004). Preparation and functional properties of extracts from bee bread. *Nahrung-Food, 48(3),* 226-229. https://doi.org/10.1002/food.200300421

Nakilcioğlu-Taş, E., & Nurko, E. (2022). Kovandaki gizli mucize: arı poleni ve arı ekmeği ile gıdaların zenginleştirilmesi. *Gıda, 47(4),* 604-615. https://doi.org/10.15237/gida.gd22044

Nasrollahzadeh, A., Mokhtari, S., Khomeiri, M., & Saris, P. E. J. (2022). Antifungal preservation of food by lactic acid bacteria. *Foods (C. 11,* Sayı 3). MDPI. https://doi.org/10.3390/foods11030395

Nazzaro, F., Fratianni, F., Nicolaus, B., Poli, A., & Orlando, P. (2012). The prebiotic source influences the growth, biochemical features and survival under simulated gastrointestinal conditions of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Anaerobe, 18(3),* 280-285. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.03.002

Nedyalkov, P., Qnkova-Nikolova, A., Kolev, N., & Vlahova-Vangelova, D. (2024). Sensory and antioxidant properties of mead with added beehive products. *Food Science and Applied Biotechnology, 7(2),* 231-238.

Neto, W. D. P. P., de Lucena, T. M. C., da Paixão, G. A., Shinohara, N. K. S., Pinheiro, A. C., Vicente, A. A., ... & de Morais Junior, M. A. (2025). Symbiotic honey beverages: a matrix which tells a story of survival and protection of human health from a gastronomic and industrial perspective. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 101183.

Ngalimat, M. S., Rahman, R. N. Z. R. A., Yusof, M. T., Syahir, A., & Sabri, S. (2019). Characterisation of bacteria isolated from the stingless bee, *Heterotrigona itama*, honey, bee bread and propolis. *PeerJ, 2019(8).* https://doi.org/10.7717/peerj.7478

Nyabako, B. A., Fang, H., Cui, F. J., Liu, K. Y., Tao, T. L., Zan, X. Y., & Sun, W. J. (2020). Enhanced acid tolerance in lactobacillus acidophilus by atmospheric and room temperature plasma (ARTP) coupled with adaptive laboratory evolution (ALE). *Applied Biochemistry and Biotechnology, 191(4),* 1499-1514. https://doi.org/10.1007/s12010-020-03264-3

Ogawa, J., Kishino, S., Ando, A., Sugimoto, S., Mihara, K., & Shimizu, S. (2005). Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 100(4),* 355-364. https://doi.org/10.1263/jbb.100.355

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

Özoğlu, Ö., Gumustas, M., Özkan, S. A., & Güneş Altuntaş, E. (2022). Doğal fermente gıdalardan izole edilen muhtemel laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktiviteleri ve laktik asit üretim düzeylerinin incelenmesi. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 36(1),* 25-40. https://doi.org/10.20479/bursauludagziraat.943244

Öztürk Oruç, S., & Çakır, İ. (2019). Probiyotik kültürlerle fermente karpuz suyu üretimi üzerine bir araştırma. *Gıda, 44(6),* 1030-1041. https://doi.org/10.15237/gida.gd19124

Pain, J., & Maugenet, J. (1966). Recherches biochimiques et physiologiques sur le pollen emmagasiné par les abeilles. *Les Annales de l'Abeille, 9(3),* 209-236.
Pankey, G. A., & Sabath, L. D. (2004). Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases, 38(6),* 864-870.

Paramithiotis, S., Gioulatos, S., Tsakalidou, E., & Kalantzopoulos, G. (2006). Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria in sourdough. *Process Biochemistry, 41(12),* 2429-2433.

Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., & Gan, S. H. (2017). Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity (C. 2017).* Hindawi Limited. https://doi.org/10.1155/2017/1259510

Pełka, K., Hafeez, A. Bin, Worobo, R. W., & Szweda, P. (2023). Probiotic potential of *Bacillus* ısolates from polish bee pollen and bee bread. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. https://doi.org/10.1007/s12602-023-10157-4

Pełka, K., Worobo, R. W., Walkusz, J., & Szweda, P. (2021). Bee pollen and bee bread as a source of bacteria producing antimicrobials. *Antibiotics, 10(6).* https://doi.org/10.3390/antibiotics10060713

Pereira, D. I. A., & Gibson, G. R. (2002). Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and *bifidobacteria* isolated from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology, 68(9),* 4689-4693. https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4689-4693.2002

Pessione, E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2,* 86.

Pimentel, T. C., Gomes de Oliveira, L. I., de Lourdes Chaves Macedo, E., Costa, G. N., Dias, D. R., Schwan, R. F., & Magnani, M. (2021). Understanding the potential of fruits, flowers, and ethnic beverages as valuable sources of techno-functional and probiotics strains: Current scenario and main challenges. *Trends in Food Science and Technology* (*C. 114*, ss. 25-59). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.024

Pinto, T., & Vilela, A. (2021). Healthy drinks with lovely colors: Phenolic compounds as constituents of functional beverages. *Beverages* (*C. 7*, Sayı 1, ss. 1-21). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/beverages7010012

Plavec, T. V., & Berlec, A. (2020). Safety aspects of genetically modified lactic acid bacteria. *Microorganisms, 8(2),* 297.

Popova-Krumova, P., Danova, S., Atanasova, N., & Yankov, D. (2024). Lactic acid production by *Lactiplantibacillus plantarum* AC 11S—Kinetics and modeling. *Microorganisms, 12(4),* 739.

Poyraz, F., Yalmanci, D., İspirli, H., & Dertli, E. (2023). Characterization of bee bread produced with defined starter cultures mimicking the natural fermentation process. *Fermentation, 9(2).* https://doi.org/10.3390/fermentation9020174

Pradhan, D., Mallappa, R. H., & Grover, S. (2020). Comprehensive approaches for assessing the safety of probiotic bacteria. *Food Control (C. 108).* Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106872

Pumbwe, L., Glass, D., & Wexler, H. M. (2006). Efflux pump overexpression in multiple-antibiotic-resistant mutants of *Bacteroides fragilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50(9),* 3150-3153.

Ramalho, R., de Souza, N. A. A., Moreira, T. F. M., De Oliveira, A., Perini, H. F., Furlaneto, M. C., Leimann, F. V., & Furlaneto-Maia, L. (2023). Antibacterial efficacy of *Enterococcus* microencapsulated bacteriocin on *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* and *Listeria ivanovi*. *Journal of Food Science and Technology, 60(1),* 262-271. https://doi.org/10.1007/s13197-022-05611-0

Ran, J., Tang, Y., Mao, W., Meng, X., Jiao, L., Li, Y., Zhao, R., & Zhou, H. (2024). Optimization of the fermentation process and antioxidant activity of mixed lactic acid bacteria for honeysuckle beverage. *Frontiers in Microbiology, 15.* https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1364448

Rather, I. A., Bajpai, V. K., Kumar, S., Lim, J., Paek, W. K., & Park, Y. H. (2016). Probiotics and atopic dermatitis: An overview. *Frontiers in Microbiology* (*C. 7,* Sayı APR). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00507

Ringø, E., Harikrishnan, R., Soltani, M., & Ghosh, K. (2022). The effect of gut microbiota and probiotics on metabolism in fish and shrimp. *Animals* (*C. 12,* Sayı 21). MDPI. https://doi.org/10.3390/ani12213016

Rizzoli, R., & Biver, E. (2020). Are probiotics the new calcium and vitamin d for bone health? *Current Osteoporosis Reports* (*C. 18,* Sayı 3, ss. 273-284). Springer. https://doi.org/10.1007/s11914-020-00591-6

Rocchetti, M. T., Russo, P., Capozzi, V., Drider, D., Spano, G., & Fiocco, D. (2021). Bioprospecting antimicrobials from lactiplantibacillus plantarum: Key factors underlying its probiotic action. *International Journal of Molecular Sciences* (*C. 22*, Sayı 21). MDPI. https://doi.org/10.3390/ijms222112076

Ronsisvalle, S., Lissandrello, E., Fuochi, V., Petronio Petronio, G., Straquadanio, C., Crascì, L., Panico, A., Milito, M., Cova, A. M., Tempera, G., & Furneri, P. M. (2019). Antioxidant and antimicrobial properties of *Casteanea sativa Miller* chestnut honey produced on Mount Etna (Sicily). *Natural Product Research*, *33(6),* 843-850. https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1413568

Ruiz Rodríguez, L. G., Mohamed, F., Bleckwedel, J., Medina, R., De Vuyst, L., Hebert, E. M., & Mozzi, F. (2019). Diversity and functional properties of lactic acid bacteria isolated from wild fruits and flowers present in Northern Argentina. *Frontiers in Microbiology*, *10,* 1091.

Sadiq, F. A., Yan, B., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., & Chen, W. (2019). Lactic acid bacteria as antifungal and anti-mycotoxigenic agents: a comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (*C. 18,* Sayı 5, ss. 1403-1436). Blackwell Publishing Inc. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12481

Saeid, A., Rahman, Md. A., Utsob, Md. R. H., Hosen, Md. U., Islam, Md. M., Islam, Md. S., & Halder, B. (2021). Development and quality assessment of honey nut drink. *Malaysian Journal of Halal Research*, *4(1),* 6-10. https://doi.org/10.2478/mjhr-2021-0002

Salman, M. K., Abuqwider, J., & Mauriello, G. (2023). Anti-quorum sensing activity of probiotics: the mechanism and role in food and gut health. *Microorganisms* (*C. 11*, Sayı 3). MDPI. https://doi.org/10.3390/microorganisms11030793

Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W.M., Fondén, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G. and Birkeland, S.E. (1998). Demonstration of safety of probiotics—a review. *International Journal of Food Microbiology*, *44(1-2),* 93-106.

Saral, Ö. (2023). An investigation into chestnut honeys from artvin province in Turkiye: Their physicochemical properties, phenolic profiles and antioxidant activities. *Chemistry & Biodiversity*, *20(3),* e202201162.

Saranyadevi, S., Abdullahi, A., & Navina, B. (2026). Microbial fermentation profiling: tools and techniques for food analysis. *In Novel Food Analysis* (pp. 295-320). Humana, New York, NY.

Sarıoğlan, M., & Cevizkaya, G. (2016). Türk mutfak kültürü: şerbetler. *Ordu Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Sosyal Bilimler Araştırmaları Dergisi*, *6(14),* 237-250.

Sarikaya, A. O., Ulusoy, E., ÖztÜrk, N., Tunçel, M., & Kolayli, S. (2009). Antioxidant activity and phenolic acid constituents of chestnut (*Castania Sativa Mill*.) honey and

propolis. *Journal of Food Biochemistry, 33(4),* 470-481. https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2009.00231.x

Semkiw, P., & Skubida, P. (2021). Bee bread production—a new source of income for beekeeping farms? *Agriculture, 11(6),* 468.https://doi.org/10.3390/agriculture11060468

Shahali, A., Soltani, R., & Akbari, V. (2023). Probiotic *Lactobacillus* and the potential risk of spreading antibiotic resistance: A systematic review. *Research in Pharmaceutical Sciences, 18(5),* 468-477.

Sharma, A., & Lee, H. J. (2025). Antimicrobial activity of probiotic bacteria isolated from plants: A review. *Foods, 14(3),* 495.

Sharma, P., Tomar, S. K., Goswami, P., Sangwan, V., & Singh, R. (2014). Antibiotic resistance among commercially available probiotics. *Food Research International* (*C. 57,* ss. 176-195). https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.025

Shimizu, M., Hashiguchi, M., Shiga, T., Tamura, H. O., & Mochizuki, M. (2015). Meta-analysis: effects of probiotic supplementation on lipid profiles in normal to mildly hypercholesterolemic individuals. *PloS one, 10(10),* e0139795.

Sikorska, H., & Smoragiewicz, W. (2013). Role of probiotics in the prevention and treatment of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* (*C. 42,* Sayı 6, ss. 475-481). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.08.003

Silici, S. (2019). Bal arısı ürünleri ve apiterapi. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology, 7(9),* 1249-1262. https://doi.org/10.24925/turjaf.v7i9.1249-1262.2141

Silici, S., & Ülgen, N. (2019). Bioactive properties of blossom and honeydew honeys. *Mellifera, 19(2),* 43-54.

Silva, D. R., Sardi, J. de C. O., Pitangui, N. de S., Roque, S. M., Silva, A. C. B. da, & Rosalen, P. L. (2020). Probiotics as an alternative antimicrobial therapy: Current reality and future directions. *Journal of Functional Foods* (*C. 73).* Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104080

Simon, B. O., Nnaji, N. D., Anumudu, C. K., Aleke, J. C., Ekwueme, C. T., Uhegwu, C. C., ... & Onyeaka, H. (2025). Microbiome-based interventions for food safety and environmental health. *Applied Sciences, 15(9),* 5219.

Sinpoo, C., Williams, G. R., & Chantawannakul, P. (2017). Dynamics of fungal communities in corbicular pollen and bee bread. *Chiang Mai J. Sci, 44(4),* 1235-1247.

Sionek, B., Szydłowska, A., Zielińska, D., Neffe-Skocińska, K., & Kołożyn-Krajewska, D. (2023). Beneficial bacteria ısolated from food in relation to the next generation of

probiotics. ıçinde microorganisms (*C. 11*, Sayı 7). *Multidisciplinary Digital Publishing Institute* (MDPI). https://doi.org/10.3390/microorganisms11071714

Smati, N. (2021). *Bee bread preservation methods: physical, chemical and microbial stability throughout storage* [Master's thesis, Instituto Politecnico de Braganca].

Sommano, S. R., Bhat, F. M., Wongkeaw, M., Sriwichai, T., Sunanta, P., Chuttong, B., & Burgett, M. (2020). Amino acid profiling and chemometric relations of black dwarf honey and bee pollen. *Frontiers in Nutrition*, *7*, 558579.

Sornsenee, P., Kooltheat, N., Wongprot, D., Suksabay, P., Nam, T.G., Permpoon, U., Saengsuwan, P. and Romyasamit, C. (2025). Antibacterial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of *Lacticaseibacillus paracasei* lysates ısolated from fermented Palm Sap. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-13.

Stavropoulou, E., & Bezirtzoglou, E. (2020). Probiotics in Medicine: A Long Debate. *Frontiers in Immunology* (*C. 11).* Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02192

Stone, H., Bleibaum, R. N., & Thomas, H. A. (2020). *Sensory evaluation practices.* Academic press.

Suleiman, J. B., Mohamed, M., Abu Bakar, A. B., Nna, V. U., Zakaria, Z., Othman, Z. A., & Aroyehun, A. B. (2021). Chemical profile, antioxidant properties and antimicrobial activities of malaysian *heterotrigona itama* bee bread. *Molecules*, *26(16).* https://doi.org/10.3390/molecules26164943

Swain, M. R., Anandharaj, M., Ray, R. C., & Parveen Rani, R. (2014). Fermented fruits and vegetables of asia: a potential source of probiotics. *Biotechnology Research International*, 2014, *1-19.* https://doi.org/10.1155/2014/250424

Syngai, G. G., Gopi, R., Bharali, R., Dey, S., Lakshmanan, G. M. A., & Ahmed, G. (2016). Probiotics-the versatile functional food ingredients. *Journal of Food Science and Technology* (*C. 53*, Sayı 2, ss. 921-933). Springer India. https://doi.org/10.1007/s13197-015-2011-0

Şimşek, F., Çetin, B., & Mutlu, C. (2023). Arı ekmeğinin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri ve sağlık üzerine etkileri. *Gıda*, *48(4)*, 807-818. https://doi.org/10.15237/gida.gd23038

Takó, M., Kerekes, E. B., Zambrano, C., Kotogán, A., Papp, T., Krisch, J., & Vágvölgyi, C. (2020). Plant phenolics and phenolic-enriched extracts as antimicrobial agents against food-contaminating microorganisms. *Antioxidants*, *9(2)*, 165.

Tamang, J. P., Shin, D. H., Jung, S. J., & Chae, S. W. (2016). Functional properties of microorganisms in fermented foods. *Frontiers in Microbiology* (*C. 7*, Sayı APR). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00578

Tamang, J. P., Thapa, N., Tamang, B., Rai, A., & Chettri, R. (2015). Microorganisms in fermented foods and beverages. *Health Benefits of Fermented Foods and Beverages*, *7*, 1-10.

Tananaki, C., Rodopoulou, M. A., Dimou, M., Kanelis, D., & Liolios, V. (2024). The total phenolic content and antioxidant activity of nine monofloral honey types. *Applied Sciences*, *14(10)*, 4329.

Taylor, T. M., Bruce, B. D., Weiss, J., & Davidson, P. M. (2008). *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 inhibition in vitro by liposome-encapsulated nisin and ethylene diaminetetraacetic acid. *Journal of Food Safety*, *28(2)*, 183-197. https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2008.00113.x

Terpou, A., Papadaki, A., Lappa, I. K., Kachrimanidou, V., Bosnea, L. A., & Kopsahelis, N. (2019). Probiotics in food systems: significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value. *Nutrients (C. 11*, Sayı 7). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/nu11071591

Thacharoen, C., Chuankid, W., Inkaewwong, T., Petchdee, P., Sompowloy, T., & Pisithkul, T. (2023). Biological properties and potential probiotic bacteria isolated from honey collected in Chiang Mai, Thailand. *Agriculture and Natural Resources*, *57(3)*, 491-502.

Tian, Q., Ye, H., Zhou, X., Wang, J., Zhang, L., Sun, W., ... & Wong, A. (2025). Evaluating the health risk of probiotic supplements from the perspective of antimicrobial resistance. *Microbiology Spectrum*, *13(1)*, e00019-24.

Tian, X., Wang, Y., Chu, J., Zhuang, Y., & Zhang, S. (2016). Enhanced L-lactic acid production in *Lactobacillus paracasei* by exogenous proline addition based on comparative metabolite profiling analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100(5)*, 2301-2310.

Tinrat, S., Khuntayaporn, P., Thirapanmethee, K., & Chomnawang, M. T. (2018). In vitro assessment of *Enterococcus faecalis* MTC 1032 as the potential probiotic in food supplements. *Journal of Food Science and Technology*, *55(7)*, 2384-2394.

Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2006). Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria: Comparison of the bacteriocins. *Process Biochemistry*, *41(1)*, 11-19. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.01.026

Tóth, A. G., Csabai, I., Judge, M. F., Maróti, G., Becsei, Á., Spisák, S., & Solymosi, N. (2021). Mobile antimicrobial resistance genes in probiotics. *Antibiotics*, *10(11)*, 1287.

Toutiaee, S., Mojgani, N., Harzandi, N., Moharrami, M., & Mokhberosafa, L. (2022). In vitro probiotic and safety attributes of *Bacillus* spp. isolated from beebread, honey samples and digestive tract of honeybees *Apis mellifera*. *Letters in Applied Microbiology*, *74(5)*, 656-665. https://doi.org/10.1111/lam.13650

Tsadila, C., Amoroso, C., & Mossialos, D. (2023). Microbial diversity in bee species and bee products: *Pseudomonad*s contribution to bee well-being and the biological activity exerted by honey bee products: A narrative review. *Diversity, 15(10),* 1088.

Ucurum, O., Tosunoglu, H., Takma, Ç., Birlik, P. M., Berber, M., & Kolaylı, S. (2024). Distinctive properties of the pine, oak, chestnut and multifloral blossom and honeydew honeys. *European Food Research and Technology, 250(6),* 1765-1774. https://doi.org/10.1007/s00217-024-04520-0

Urcan, A. C., Criste, A. D., Dezmirean, D. S., Bobiș, O., Bonta, V., Dulf, F. V., Mărgăoan, R., Cornea-Cipcigan, M., & Campos, M. G. (2021). Botanical origin approach for a better understanding of chemical and nutritional composition of beebread as an important value-added food supplement. *LWT, 142*. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111068

Urcan, A.C., Criste, A.D., Dezmirean, D.S., Bobiș, O., Bonta, V., Burtescu, R.F., Olah, N.K., Cornea-Cipcigan, M. and Mărgăoan, R. (2024). Enhancing antioxidant and antimicrobial activities in bee-collected pollen through solid-state fermentation: A comparative analysis of bioactive compounds. *Antioxidants, 13(3),* 292.

Urcan, A., Al mărghıtaș, L., Dezmirean, D. S., Bobiș, O., Bonta, V., Mureșan, C. I., & Mărgăoan, R. (2017). Chemical Composition and Biological Activities of Beebread-Review. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies, 74(1),* 1843-536. https://doi.org/10.15835/buasvmcn-asb

Uțoiu, E., Matei, F., Toma, A., Diguță, C.F., Ștefan, L.M., Mănoiu, S., Vrăjmașu, V.V., Moraru, I., Oancea, A., Israel-Roming, F. and Cornea, C.P. (2018). Bee collected pollen with enhanced health benefits, produced by fermentation with a Kombucha Consortium. *Nutrients, 10(10),* 1365.

Vásquez, A., & Olofsson, T. C. (2009). The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *Journal of Apicultural Research, 48(3),* 189-195. https://doi.org/10.3896/IBRA.1.48.3.07

Vásquez, A., Forsgren, E., Fries, I., Paxton, R. J., Flaberg, E., Szekely, L., & Olofsson, T. C. (2012). Symbionts as major modulators of insect health: Lactic acid bacteria and honeybees. *PLoS ONE, 7(3).* https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033188

Veith, N., Solheim, M., van Grinsven, K.W., Olivier, B.G., Levering, J., Grosseholz, R., Hugenholtz, J., Holo, H., Nes, I., Teusink, B. and Kummer, U. (2015). Using a genome-scale metabolic model of *Enterococcus faecalis* V583 to assess amino acid uptake and its impact on central metabolism. *Applied and Environmental Microbiology, 81(5),* 1622-1633.

Venturi V. (2006). Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiology Reviews, Volume 30, Issue 2,* March 2006, Pages 274–291, https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2005.00012.x

Vergalito, F., Testa, B., Cozzolino, A., Letizia, F., Succi, M., Lombardi, S. J., Tremonte, P., Pannella, G., Di Marco, R., Sorrentino, E., Coppola, R., & Iorizzo, M. (2020). Potential application of *Apilactobacillus kunkeei* for human use: Evaluation of probiotic and functional properties. *Foods, 9(11).* https://doi.org/10.3390/foods9111535

Verraes, C., Van Boxstael, S., Van Meervenne, E., Van Coillie, E., Butaye, P., Catry, B., De Schaetzen, M.A., Van Huffel, X., Imberechts, H., Dierick, K. and Daube, G. (2013). Antimicrobial resistance in the food chain: a review. *International Journal of Environmental Research And Public Health, 10(7),* 2643-2669.

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

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2008). Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of Food Science* (*C. 73,* Sayı 9). https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00966.x

Von Der Ohe, W., Oddo, L. P., Piana, M. L., Morlot, M., & Martin, P. (2004). Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie, 35(Suppl. 1),* S18-S25.

Wagner, T. M., Howden, B. P., Sundsfjord, A., & Hegstad, K. (2023). Transiently silent acquired antimicrobial resistance: an emerging challenge in susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 78(3),* 586-598.

Wang, G., Chen, Y., Xia, Y., Song, X., & Ai, L. (2022). Characteristics of probiotic preparations and their applications. *Foods* (*C. 11,* Sayı 16). MDPI. https://doi.org/10.3390/foods11162472

Wang, S., Li, L., Yu, L., Tian, F., Zhao, J., Zhai, Q., & Chen, W. (2024). Natural aggregation of *Lactobacillus*: Mechanisms and influencing factors. *Food Bioscience (C. 62).* Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.105007

Wang, X., Wang, W., Lv, H., Zhang, H., Liu, Y., Zhang, M., Wang, Y., & Tan, Z. (2021). Probiotic potential and wide-spectrum antimicrobial activity of lactic acid bacteria ısolated from ınfant feces. *Probiotics and Antimicrobial Proteins, 13(1),* 90-101. https://doi.org/10.1007/s12602-020-09658-3

Wang, Y., Ma, L., & Xu, B. (2023). Bee wisdom: exploring bee control strategies for food microflora by comparing the physicochemical characteristics and microbial composition of beebread. *Microbiology Spectrum, 11(6).* https://doi.org/10.1128/spectrum.01818-23

Watawana, M. I., Jayawardena, N., Ranasinghe, S. J., & Waisundara, V. Y. (2017). Evaluation of the effect of different sweetening agents on the polyphenol contents and antioxidant and starch hydrolase inhibitory properties of Kombucha. *Journal of Food Processing and Preservation, 41(1),* e12752.

Wen, H., Ou, C., Tang, H., Sang, S., Du, Y., & Chen, J. (2023). Development, characterization and application of a three-layer intelligent ph-sensing indicator based on bromocresol green (BCG) for monitoring fish freshness. *Journal of Ocean University of China*, *22(2)*, 565-575.

Wendel, U. (2022). Assessing Viability and Stress Tolerance of Probiotics—A Review. *Frontiers in Microbiology* (*C. 12).* Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.818468

WHO (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group: Geneva, Switzerland.

Wu, M., Dong, Q., Ma, Y., Yang, S., Zohaib Aslam, M., Liu, Y., & Li, Z. (2022). Potential antimicrobial activities of probiotics and their derivatives against *Listeria monocytogenes* in food field: A review. *Food Research International* (*C. 160).* Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111733

Wu, Y., Hu, S., Wu, C., Gu, F., & Yang, Y. (2022). Probiotics: Potential novel therapeutics against fungal ınfections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology (C. 11).* Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.793419

Xu, H., Jeong, H. S., Lee, H. Y., & Ahn, J. (2009). Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Letters in Applied Microbiology*, *49(4)*, 434-442. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02684.x

Xu, X., Luo, D., Bao, Y., Liao, X., & Wu, J. (2018). Characterization of diversity and probiotic efficiency of the autochthonous lactic acid bacteria in the fermentation of selected raw fruit and vegetable juices. *Frontiers in Microbiology*, *9(OCT).* https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02539

Yaa'ri, R., Schneiderman, E., Ben Aharon, V., Stanevsky, M., & Drori, E. (2024). Development of a novel approach for controlling and predicting residual sugars in wines. *Fermentation*, *10(3)*, 125.

Yahsi, Y., & Sengun, I. (2024). Development of fruit-based drinks fortified with probiotics, *Spirulina platensis* and pea protein. *Journal of Food Measurement and Characterization.* https://doi.org/10.1007/s11694-024-02879-y

Yan, X. T., Zhang, Z., Wang, Y., Zhang, W., Zhang, L., Liu, Y., Chen, D., Wang, W., Ma, W., Qian, J. Y., & Gu, R. (2023). Antioxidant capacity, flavor and physicochemical properties of FH06 functional beverage fermented by lactic acid bacteria: a promising method to improve antioxidant activity and flavor of plant functional beverage. *Applied Biological Chemistry*, *66(1).* https://doi.org/10.1186/s13765-022-00762-2

Yang, J., Liu, Y., Cui, Z., Wang, T., Liu, T., & Liu, G. (2024). Analysis of free amino acid composition and honey plant species in seven honey species in China. *Foods*, *13(7)*, 1065.

Yang, R., Ahmad, S., Liu, H., Xu, Q., Yin, C., Liu, Y., Zhang, H., & Yan, H. (2023). Biodegradation of Cholesterol by *Enterococcus faecium* YY01. *Microorganisms*, *11(12).* https://doi.org/10.3390/microorganisms11122979

Yao, P., Mohd Esah, E., & Zhao, C. (2025). Regulatory mechanisms and applications of Lactobacillus biofilms in the food industry. *Frontiers in Microbiology*, *15*, 1465373.

Yoldas, T., Karagül, B., & Düvenci, E. S. (2023). Investigation of some quality criteria in chestnut honey of Düzce province. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi,* 11(5), 2255-2264.

Yu, X., Liu, Z., Liu, Y., Li, X., Wang, B., & Yin, J. (2025). Antimicrobial roles of probiotics: Molecular mechanisms and application prospects. *Trends in Food Science & Technology*, 105146.

Yun, J. S., Wee, Y. J., & Ryu, H. W. (2003). Production of optically pure L(+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. *Enzyme and Microbial Technology*, *33(4),* 416-423. https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00139-X

Zengler, K., & Zaramela, L. S. (2018). The social network of microorganisms—how auxotrophies shape complex communities. *Nature Reviews Microbiology*, *16(6),* 383-390.

Zhang, Q.Y., Yan, Z.B., Meng, Y.M., Hong, X.Y., Shao, G., Ma, J.J., Cheng, X.R., Liu, J., Kang, J. and Fu, C.Y. (2021). Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. *Military Medical Research, 8(1),* 48.

Zheng, M., Zhang, R., Tian, X., Zhou, X., Pan, X., & Wong, A. (2017). Assessing the risk of probiotic dietary supplements in the context of antibiotic resistance. *Front Microbiology*, *2017; 8:* 908.

Zheplinska, M., Mushtruk, M., Shablii, L., Shynkaruk, V., Slobodyanyuk, N., Rudyk, Y., Chumachenko, I., Marchyshyna, Y., Omelian, A., & Kharsika, I. (2022). Development and shelf-life assessment of soft-drink with honey. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, *16,* 114-126. https://doi.org/10.5219/1738

Zou, Q., Dong, H., & Cronan, J. E. (2024). The Enteric Bacterium *Enterococcus faecalis* Elongates and Incorporates Exogenous Short and Medium Chain Fatty Acids Into Membrane Lipids. *Molecular Microbiology*. https://doi.org/10.1111/mmi.15322

Zuluaga, C. M., Serrato, J. C., & Quicazan, M. C. (2015). Chemical, nutritional and bioactive characterization of Colombian bee-bread. *Chemical Engineering Transactions*, *43*, 175-180. https://doi.org/10.3303/CET1543030

Žuntar, I., Petric, Z., Kovacevíc, D. B., & Putnik, P. (2020). Safety of probiotics: Functional fruit beverages and nutraceuticals. *Foods (C. 9,* Sayı 7). MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute. https://doi.org/10.3390/foods9070947