

**PROBİYOTİK OLARAK KULLANILABİLECEK BAZI LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN KOLESTEROL GİDERİMİ ÖZELLİKLERİ VE SAFRA
TUZU DEKONJUGASYONU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Esra TOK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TEMMUZ 2007
ANKARA**

Esra TOK tarafından hazırlanan PROBİYOTİK OLARAK KULLANILABİLECEK BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN KOLESTEROL GİDERİMİ ÖZELLİKLERİ VE SAFRA TUZU DEKONJUGASYONU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Belma ASLIM
Tez Yöneticisi

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof: Dr. Yavuz BEYATLI

Üye : Prof. Dr. Emir CANSUNAR

Üye : Prof. Dr. Nedim SULTAN

Üye : Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ

Üye : Prof. Dr. Belma ASLIM

Tarih :06/07/2007

Bu tez, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur.

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Esra TOK

**PROBİYOTİK OLARAK KULLANILABİLECEK BAZI LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN KOLESTEROL GİDERİMİ ÖZELLİKLERİ VE SAFRA
TUZU DEKONJUGASYONU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI
(Yüksek Lisans Tezi)**

Esra TOK

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Temmuz 2007**

ÖZET

Bu çalışmada, köy yoğurtlarından izole edilmiş ve ekzopolisakkarit üretimi miktarlarına göre seçilen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türüne ait 5 suşun ekzopolisakkarit üretimi miktarları ile kolesterol giderimi oranları arasındaki ilişkinin belirlenmesi ve bu suşların safra tuzu dekonjugasyonu aktivitelerinin tespit edilmesi hedeflenmiştir. Kolesterolün ve farklı safra konsantrasyonlarının suşların gelişimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Kolesterolün gelişimi artırdığı ve %0,0'dan %0,3'e doğru artan safra konsantrasyonlarına bağlı olarak tüm suşların canlılık oranlarının düştüğü tespit edilmiştir. Suşların %0,3'lük safra konsantrasyonundaki canlılık yüzdelerinin %0-24 değerleri arasında olduğu belirlenmiştir. Kolesterol giderimi üzerine farklı safra konsantrasyonlarının etkisi araştırılmıştır. Yüksek ekzopolisakkarit üretimine sahip olan suşların (B3, ATCC 11842, G11) düşük ekzopolisakkarit üretimine sahip suşlara (B2, A13) kıyasla besiortamından daha fazla kolesterolü uzaklaştırabildiği belirlenmiş ve en yüksek kolesterol gideriminin (%31) %0,3'lük safra konsantrasyonunda B3 suşu tarafından gerçekleştirildiği gözlenmiştir. Dinlenme halindeki ve cansız hücreler tarafından kolesterol giderim

miktarları tespit edilmiş ve bu oranların sırasıyla %4-14 ile %3-10 değerleri arasında olduğu saptanmıştır. Yüksek oranda ekzopolisakkarit üretimine sahip, safraya karşı dirençli ve kolesterol gideriminde etkili olan B3 suşu seçilerek tutuklama çalışmasında kullanılmıştır. Tutuklanmış ve serbest hücreler tarafından kolesterol giderimi çalışılmış ve tutuklanmış hücrelerin serbest hücrelere kıyasla kolesterol gideriminde daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Kolesterolün suşların ekzopolisakkarit üretimleri üzerine etkisi araştırılmış ve kolesterolün ekzopolisakkarit üretimini stimüle ettiği saptanmıştır. Suşların taurokolik asit üzerindeki dekonjugasyon aktiviteleri araştırılmış ve bunların %15,0-35,5 değerleri arasında olduğu saptanmıştır.

Bilim Kodu	: 203.1.023
Anahtar Kelimeler	: Probiyotik, Laktik asit bakterileri, kolesterol giderimi, dekonjugasyon
Sayfa Adedi	: 80
Tez Yöneticisi	: Prof. Dr. Belma ASLİM

**RESEARCH OF CHOLESTEROL REMOVAL FEATURES AND BILE SALT
DECONJUGATION EFFECTS OF SOME LACTIC ACID BACTERIA THAT
CAN BE USED AS PROBIOTIC
(M.Sc. Thesis)**

Esra TOK

**GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
June 2007**

ABSTRACT

In this study, it has been targeted to determine the relationship between exopolysaccharide production and cholesterol removal ratios, and bile salt deconjugation activities of 5 strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, isolated from hand-made yoghurt and selected according to exopolysaccharide production capacity. Effect of cholesterol and different bile concentrations on growth was tested. It was found that cholesterol stimulated growth and according to increasing bile concentrations from 0,0 to 0,3% viability of the strains decreased. The viability of the strains was found between 0%-24% in 0,3% bile concentration. It has been studied influence of different bile concentrations on cholesterol removal. It has been confirmed that strains which produce high amount of exopolysaccharide (B3, ATCC 11842, G11) were able to remove much cholesterol from the medium than those produce low amount of exopolysaccharide (B2, A13) and the highest cholesterol removal (31%) was observed by strain B3 in 0,3% bile concentration. It has been determined cholesterol removal by resting and dead cells and it was found between 4-14% and 3-10%, respectively. For immobilization study, B3 strain which produce high

amount of exopolysaccharide, resistant to bile and effective in cholesterol removal was selected. Cholesterol removal by immobilized and free cells was studied and it has been determined that immobilized cells were more effective. Influence of cholesterol on exopolysaccharide production has been tested and it was found that cholesterol stimulated production. Deconjugation activity of the strains on taurocholic acid was studied and it was confirmed between 15,0-35,5%.

Science Code : 203.1.023
Key words : Probiotic, Lactic acid bacteria, cholesterol removal, deconjugation.
Page Number : 80
Adviser : Prof. Dr. Belma ASLIM

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren sayın Hocam Prof. Dr. Belma ASLİM'a yine kıymetli tecrübelerinden faydalandığım hocam Prof. Dr. Yavuz BEYATLI'ya, tüm Biyoteknoloji Laboratuvarı çalışanlarına, manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan değerli aileme ve yurtiçi yüksek lisans bursu programı kapsamında çalışmalarına yapmış olduğu katkılarından dolayı TÜBİTAK BİDEB'e teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. İnsan Mikrobiyal Ekosistemi.....	3
2.2. Lactobacillus Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri	4
2.3. EPS (Ekzopolisakkaritler).....	5
2.4. Probiyotikler	7
2.5. Probiyotik Mikroorganizmalarda Bulunması Gereken Özellikler.....	8
2.6. Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar.....	9
2.7. Probiyotiklerin Etki Mekanizması	10
2.8. Probiyotik Mikroorganizmaların İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri	11
2.8.1. Bağırsak sistemi rahatsızlıkları üzerindeki etkileri.....	11
2.8.2. Mide üzerindeki etkileri	12
2.8.3. Laktoz intoleransı üzerindeki etkileri	12
2.8.4. Antikanserojenik etkileri	12

	Sayfa
2.8.5. Antimikrobiyal etkisi.....	12
2.8.6. Başışıklık sistemine etkisi	12
2.8.7. Vitamin metabolizmasını iyileştirme etkisi	13
2.8.8. Diğer olumlu etkiler	13
2.8.9. Kolesterol dūřurūcū etkisi	13
2.9. Kolesterol Metabolizması.....	14
2.9.1. Kandaki kolesterol seviyesinin önemi	17
2.9.2. Kolesterol dengesinde safra asitlerinin rolū.....	18
2.9.3. Safra asitleri ve safra tuzları.....	18
2.9.4. Enterohepatik dolaşım	20
2.10. Probiyotiklerin Kolesterol Konsantrasyonunu Dūřürmesini Sađlayan Olası Mekanizmalar	21
2.10.1. Diyetle alınan kolesterolūn bađırsaklardan emiliminin azaltılması	22
2.10.2. Safra tuzlarının dekonjugasyonu.....	25
2.11. Tutuklama (İmmobilizasyon)	28
2.11.1. Probiyotik mikroorganizmaların tutuklanması	29
2.11.2. Tutuklanmış mikroorganizmalar tarafından kolesterol giderimi	30
3. MATERYAL VE METOT	31
3.1. Materyal	31
3.1.1. Materyal örnekleri	31
3.1.2. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları	31
3.1.3. Araştırmada kullanılan besiortamları.....	31

	Sayfa
3.2. Metot	32
3.2.1. Bakterilerin muhafazası	32
3.2.2. Kolesterolün ve farklı safra konsantrasyonlarının gelişim üzerine etkisi	32
3.2.3. Safranın kolesterol giderimi üzerine etkisinin belirlenmesi	34
3.2.4. Gelişmekte olan, dinlenme halindeki ve cansız hücreler tarafından kolesterol gideriminin belirlenmesi	36
3.2.5. Tutuklanmış ve serbest kültürler tarafından kolesterol giderimi miktarının tespiti	37
3.2.6. Kolesterolün EPS üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	39
3.2.7. Taurokolik asit (TCA) dekonjugasyon miktarının tespiti.....	40
3.2.8. İstatistiksel analizler	41
4. DENEYSEL BULGULAR	42
4.1. Suşların EPS Üretim Miktarlarına Göre Seçilmesi	42
4.2. Kolesterolün ve Farklı Safra Konsantrasyonlarının Gelişim Üzerine Etkisi	42
4.3. Safranın Kolesterol Giderimi Üzerine Etkisi	45
4.4. Gelişmekte Olan, Dinlenme Halindeki ve Cansız Hücreler Tarafından Kolesterol Giderimi	48
4.5. Tutuklanmış ve Serbest Kültürler Tarafından Kolesterol Giderimi	49
4.6. Kolesterolün EPS Üretimi Üzerine Etkisi	51
4.7. Safra Tuzu Dekonjugasyonu Miktarının Tespiti	52
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	53
6. KAYNAKLAR	71

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Sindirim sisteminde yaygın olarak bulunan mikroorganizmalar.....	3
Çizelge 2.2. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar	10
Çizelge 3.1. MRS (Man Rogosa and Sharpe) Sıvı Besiortamı.....	32
Çizelge 4.1. Seçilen suşların EPS üretim miktarları	42
Çizelge 4.2. Kolesterolün ve farklı safra konsantrasyonlarının suşların gelişimi üzerine etkisi.....	43
Çizelge 4.3. Farklı safra konsantrasyonlarındaki canlılık oranları (%).....	44
Çizelge 4.4. Farklı safra konsantrasyonlarında kolesterol giderimi	46
Çizelge 4.5. Tutuklanmış ve serbest B3 suşu hücreleri tarafından kolesterol giderimi	50
Çizelge 4.6. Tutuklanmış ve serbest B3 kültüründeki canlı mikroorganizma sayısı (cfu/mL).....	51
Çizelge 4.7. Kolesterolün EPS üretimi üzerine etkisi	51
Çizelge 4.8. Taurokolik asit (TCA) safra tuzunun dekonjugasyon miktarı	52

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Kolesterolün yapısı	14
Şekil 2.2. Karaciğer kolesterolünün kaynakları ve kolesterolün karaciğerden ayrılma yolları	15
Şekil 2.3. Koprostanol ve Kolestanol'ün yapısı	16
Şekil 2.4. Kolesterolün arter duvarında birikme aşamaları	17
Şekil 2.5. Primer safra asitleri olan kolik asit ve kenodeoksikolik asitlerin sentezi	19
Şekil 2.6. Glisin ve taurin amino asitleri ile konjuge olmuş safra asitleri (Safra Tuzları)	20
Şekil 2.7. Safra tuzları ve safra asitlerinin enterohepatik dolaşımı	21
Şekil 4.1. Gelişmekte olan, dinlenme halindeki ve ısı ile öldürülmüş hücreler tarafından kolesterol giderimi	48

RESİMLERİN LİSTESİ**Resim****Sayfa**

Resim 2. 1. <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> türünün morfolojik görüntüsü.....	5
---	---

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
°C	Santigrat derece
nm	Nanometre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
g	Gram
M	Molar
N	Normal
pH	Asitlik Bazlık Birimi
spp	Species (Türleri)
subsp	Subspecies (Alt Tür)

Kısaltmalar	Açıklama
ATCC	American Type Culture Collection
Bkz.	Bakınız
Cfu	Colony forming unit
dk	Dakika
Eş	Eşitlik
EPS	Ekzopolisakkarit
LAB	Laktik Asit Bakterileri
MRS	Man-Rogosa Sharpe
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
rpm	Devir Sayısı
TCA	Taurokolik asit

1. GİRİŞ

İnsan vücudu dinamik bir ekosistem olup, trilyonlarca mikroorganizmanın konakçısı durumundadır. Bu mikroorganizmalar temelde faydalı ve zararlı olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Sağlıklı bir konakçıda bu iki grup dinamik bir denge halinde olup faydalı mikroorganizmalar baskın mikroflorayı oluşturmaktadır [1]. Yeni doğanlar, vücutlarındaki yerleşik mikroflorayı öncelikle doğum sırasında, daha sonra ise çevrelerinden edinirler. Gününü tam olarak doldurmuş bir şekilde dünyaya gelen bir canlı, özellikle eğer anne sütüyle besleniyorsa, bu canlının mikroflorasının en baskın üyeleri laktik asit bakterileridir [2]. Bağırsaklarda yaşayan tüm bakterilerin ayrı bir nişi olup, her bir cinsin sayısı yaklaşık olarak sabittir. Bağırsakların sağlıklı olarak fonksiyon gösterebilmesi için intestinal ekosistemin dengesinin korunması gerekmektedir [3]. İntestinal ekosistemin fizyolojik dengesi hastalık, yaşlılık, stres, antibiyotik veya ilaç kullanımı, diyet alışkanlıklarının değiştirilmesi, iklim koşullarında meydana gelen değişimler ve çevresel toksik maddeler gibi faktörlerden doğrudan veya dolaylı olarak etkilenebilmektedir. İntestinal sistemin dengesinde meydana gelen bu dengesizlikler “disbiosis” olarak adlandırılmaktadır. Disbiosisin tersi bir durum olarak, intestinal sistemde bulunan faydalı mikroorganizmaların sistemin fizyolojik dengesine olumlu yönde katkıda bulunmasına “probiyosiz”, bu mikroorganizmalara da “probiyotik mikroorganizmalar” denilmektedir [4].

Probiyotik mikroorganizmalar ürettikleri maddeler yardımıyla gıdaların sindirimine, vitamin üretimine ve zararlı mikroorganizmaların neden olduğu hastalıkların önlenmesine yardımcı olarak doğal floranın dengesini korur. Bu özelliklerinden dolayı son yıllarda bu faydalı bakteriler, yoğurt gibi fermente süt ürünlerine eklenerek, probiyotik ürün olarak piyasaya sunulmaktadır [5].

En çok kullanılan probiyotik laktik asit bakterileri bağırsaklarda canlılığını sürdürebilen laktobasiller ve bifidobakterilerdir. Bu gruba ait türlerin insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri konusunda yapılan kapsamlı çalışmalar

bildirilmiştir [6]. Bu yararlı etkiler arasında kandaki yüksek kolesterol seviyelerinin düşürülmesi de yer almaktadır ve probiyotik bakterilerin bu alanda kullanımı son yıllarda önem kazanmıştır. İlk kez Mann ve Spoerry (1974) adlı araştırmacılar tarafından laktobasiller ile fermente edilmiş sütün insanlarda kolesterol düşürücü etkilere sahip olabileceğini ortaya konulmuştur [7,8]. Bu tarihten itibaren bugüne kadar bu konu üzerinde çeşitli in vitro ve in vivo çalışmalar yapılmış ve özellikle belirli *Lactobacillus* veya *Bifidobacterium* türlerini içeren probiyotik ürünlerin kandaki yüksek kolesterol seviyelerini azalttığı gösterilmiştir [9]. Dolayısıyla probiyotiklerin bu alanda kullanımı konusunda yapılan araştırmalar gün geçtikçe artmaktadır.

Bu alanda bugüne kadar yapılmış diğer çalışmalardan farklı olarak, bu çalışmada, yoğurt ve süt kökenli laktik asit bakterilerinin, kolesterol giderimi yetenekleri ile bakteriler tarafından üretilen EPS arasındaki ilişkinin tespit edilmesi ve bu bakteriler tarafından kolesterol gideriminde safra tuzu dekonjugasyonu etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada;

- El yapımı yoğurtlardan izole edilip, tanımlanan *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türüne ait suşların gelişimi üzerine kolesterolün ve farklı safra konsantrasyonlarının etkisinin araştırılması,
- Safranın kolesterol giderimi üzerine etkisinin tespit edilmesi,
- Gelişmekte olan, dinlenme halindeki ve cansız hücreler tarafından kolesterol giderimi miktarının belirlenmesi,
- Tutuklanmış ve serbest kültürler tarafından kolesterol giderimi miktarının tespit edilmesi,
- Kolesterolün ekzopolisakkarit (EPS) üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi,
- Taurokolik asit (TCA) isimli safra tuzunun dekonjugasyon miktarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. İnsan Mikrobiyal Ekosistemi

İntestinal sistemde, deride, ürogenital sistemde, ağız ve burun boşluklarında, kısacası insan vücudunun dış ortamın etkisi altındaki ve bakterilerin hayatta kalması için uygun şartlara sahip olan her kısmında farklı grup ve türlere ait çok sayıda mikroorganizmadan meydana gelen bir mikroflora vardır. Bu mikroflora üyelerinin sayısının 10^{13} - 10^{14} gibi rakamlara ulaştığı tahmin edilmektedir ki bu rakam toplam insan vücut hücrelerinin sayısından fazladır. Sağlıklı bir insanın sindirim kanalı da çok fazla sayıda ve çeşitteki mikroorganizmadan meydana gelen kompleks bir ekosisteme sahiptir [11, 12]. İnsanların yerleşik florasının ve sindirim kanalının en önemli üyeleri *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsine ait türlerdir [13]. Sindirim sisteminde yaygın olarak bulunan mikroorganizmalar Çizelge 2.1’de verilmiştir [4].

Çizelge 2. 1. Sindirim sisteminde yaygın olarak bulunan mikroorganizmalar

Sindirim sistemi bölgesi	Baskın flora
Ağız boşluğu	<i>Lactobacillus</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Fusobacterium</i>
Yutak	<i>Lactobacillus</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Fusobacterium</i>
Mide	<i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Fusobacterium</i>
Duedonum	<i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Eubacterium</i>
Jejenum	<i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Eubacterium</i>
İnce bağırsak	<i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Eubacterium</i>
Kör bağırsak	<i>Bifidobacterium</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>E. coli</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Fusobacterium</i>
Kalın bağırsak	<i>Bifidobacterium</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>E. coli</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Fusobacterium</i>
Anüs	<i>Bifidobacterium</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>E. coli</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Fusobacterium</i>

2.2. *Lactobacillus* Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri

Lactobacillus cinsi bakteriler, *Lactobacillaceae* familyasına ait olup Laktik asit bakterileri grubundandır. *Lactobacillus* spp.'ler anaerobik, gram (+) bakterilerdir ve spor oluşturmazlar. Çoğu *Lactobacillus* spp. basil ancak bazı türleri koko-basil şeklindedir. Bu mikroorganizmalar gelişebilmeleri için amino asit, peptit, nükleik asit türevi vitamin, tuz, yağ asidi veya yağ asidi esterleri ile fermente edebilecekleri besin maddelerine ihtiyaç duyarlar [14].

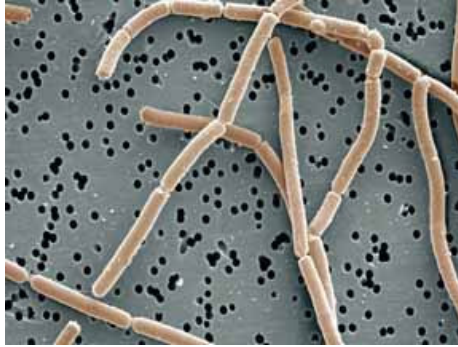
Lactobacillus spp. suşları 2-53°C'de (Optimum 30-40°C) gelişirler. Aynı zamanda, bu bakteriler % 1-3 oranında laktik asit oluşturarak pH'yı 3,2–3,5'e kadar düşürürler. Bu nedenle aside dayanıklıdırlar [15].

Türlerin çoğu mikroaerobiktir. Fakat anaerobik ortamda daha iyi kolonize olurlar. Su ve toprakta hemen hemen hiç rastlanılmayan bu bakterilere, cins ve türe göre değişim göstererek süt ve süt ürünleri çalışma yerlerinde, bitki ve bitki atıklarında, insan ve diğer canlıların sindirim sistemlerinde rastlanılabilir. Teknikte kullanılan *Lactobacillus* türleri hastalıklara sebep olmazlar [16, 17]. Bununla birlikte bu bakteriler genellikle diş ve ağız, ayrıca akciğer enfeksiyonlarında patojenlerle karışık mikrofloradan, nadiren de idrar yolu, kalp dış zarı ve lokal enfeksiyonlardan da izole edilebilirler [15].

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* yoğurt üretiminde starter olarak kullanılan ve probiyotik özelliğine sahip yaygın bir laktik asit bakterisidir [18]. Literatürlerde ilk kez 1904 yılında yer alan bu bakteriye eski kitaplarda *Bacterium bulgaricum*, *Bacillus bulgaricus*, *Thermobacterium bulgaricum*, *Lactobacillus bulgaricus* isimleri ile de rastlamak mümkündür. Daha sonra bu isim değişmiş ve bugün hem *Lactobacillus bulgaricus* hem de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* şeklinde kullanılmaya başlanmıştır [19].

Bu bakteriler 10-30 µm uzunluğunda 0,7-2 µm kalınlığında, çubuk şeklinde tek tek veya zincirler şeklinde bulunur. Genç bakteriler genellikle zincir

oluşturmaz. Optimum olarak 40-45°C'de faaliyet gösterirler. 70°C'nin üzerindeki ısıtılarda ortadan kalkarlar [19]. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türünün morfolojik görüntüsü Resim 2.1'de verilmiştir [20].



Resim 2. 1. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türünün morfolojik görüntüsü

Lactobacillus spp. ve *Bifidobacterium* spp. en yaygın olarak kullanılan probiyotik mikroorganizmalardır. *Lactobacillus* cinsine ait probiyotik kültürler arasında *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türünün yanı sıra *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lactis* ve *Lactobacillus reuteri* türlerine ait suşlar; *Bifidobacterium* cinsine ait probiyotik kültürler arasında ise *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum* ve *Bifidobacterium breve* türlerine ait suşlar yer almaktadır [18, 21]. Bu mikroorganizmalar laktoz intoleransının hafifletilmesi, bazı diyare türlerinin tedavi edilmesi, immün sistemin kuvvetlendirilmesi, kanserin önlenmesi ve kolesterol seviyelerinin düşürülmesi gibi probiyotik özelliklere sahiplerdir [21].

2.3. EPS (Ekzopolisakkaritler)

Lactobacillus cinsi bakteriler, metabolik faaliyetleri sonucu laktik asit, EPS, hidrojen peroksit, asetaldehit, aseton, diasetil, etanol, asetoin gibi çok çeşitli organik maddeler sentezlerler. Bu metabolitlerin üretimi türden türe farklılık

göstermektedir. Üretilen metabolitin yapısı ve miktarı onu üreten bakterinin hangi alanda, ne amaçla kullanılacağını da belirler [5, 19].

Laktik asit bakterileri de diğer birçok bakteri gibi farklı özelliklerde polisakkarit üretme yeteneğine sahiptirler. Bu polisakkaritler hücresel konumlarına göre sınıflandırılırlar. Hücre duvarının dışına salgılanan polisakkaritlere ekzopolisakkarit ya da kısaca “EPS” adı verilir [22]. Hücresel lokasyonları, kimyasal ve fiziksel yapı özellikleri ile fonksiyonları esas alınarak mikrobiyal ekzopolisakkaritleri üç ana grup altında toplamak mümkündür. Bunlar; hücre yüzeyine kovalent bağlarla bağlı olan kapsüler polisakkaritler (CPS), hücre duvarının bir bileşeni olan polisakkaritler (LPS) ve dış çevreye salınan ya da hücre yüzeyi ile kovalent olmayan, gevşek bağlarla ilişkilendirilmiş polisakkaritlerdir (LAM) [23, 24]. CPS ve LPS genellikle üretici bakterilerin patojenitesini belirleyen yapılar olduğundan, tıbbi açıdan büyük önem taşımaktadır. LAM'nin ise gıda endüstrisinde geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır. Ancak laktik asit bakterileri gibi Genel olarak güvenli “Generally recognized as safe” (GRAS) şeklinde tanımlanan mikroorganizmalarda CPS ve LAM, üretiminde rol aldıkları gıdalara arzu edilen özellikleri kazandırmaktadır [25 - 27].

EPS'ler şeker veya şeker türevlerinin dallı, tekrar eden birimlerinden oluşan uzun zincirli polisakkaritlerdir. Bu şeker birimleri temel olarak farklı oranlardaki glikoz, galaktoz ve ramnoz'dur. Mikrobiyal kültürlerden elde edilen EPS'ler homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler olmak üzere iki grupta sınıflandırılabilir. Homopolisakkaritler yalnızca tek tip monosakkaritin (D-glukoz veya D-galaktoz) tekrar eden birimlerinden meydana gelirler. Bunun aksine, laktik asit bakterilerinden elde edilen heteropolisakkaritlerin tekrar eden birimleri arasında ufak farklılıklar söz konusudur [28].

Bakteriyel EPS'ler üretici mikroorganizma tarafından enerji kaynağı olarak kullanılmazlar. Bu maddelerin, hücrenin doğal çevresindeki kuraklık, fagositler ve protozoalar tarafından sindirim, faj saldırıları, antibiyotikler veya

toksik bileşikler ve osmotik stres gibi faktörlere karşı koruyucu bir fonksiyonu olduğu düşünülmektedir. EPS'ler ayrıca hücre tanımayı sağlama, yüzeylere yapışma ve çeşitli ekosistemlerde kolonizasyonu kolaylaştıran biyofilmlerin oluşturulmasında da rol oynar. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS'lerin oldukça karmaşık olan ekolojik fonksiyonları tam olarak belirlenememiştir ancak işlevlerinin farklı ortamlardaki hücre yapışması ve hücre koruması ile alakalı olduğu düşünülmektedir. Bu ekolojik fonksiyonlarının dışında laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS'ler çeşitli fermente süt ürünlerinin üretiminde de teknolojik öneme sahiptirler [22].

EPS üreten laktik asit bakterisi suşları yoğurt, peynir, tereyağı, kefir ve geleneksel fermente süt ürünlerinin üretiminde starter kültür suşları olarak kullanılmaktadırlar [5]. Starter kültürlerin EPS oluşturma yetenekleri, üretimde kullandıkları fermente süt ürünlerinin yapısal, aromatik ve reolojik özellikleri üzerinde belirgin bir şekilde etki etmektedir [29]. Ayrıca laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS'lerin antitümoral, bağışıklık sistemini düzenleyici ve kandaki kolesterol seviyelerini düşürücü etkilerinin olduğu da kanıtlanmıştır [28].

2.4. Probiyotikler

Probiyotik kelimesi Yunanca kökenli olup, “yaşam için” anlamına gelmektedir. Probiyotikler, tüketildiklerinde insan sağlığı üzerinde faydalı etkileri olan, canlı mikrobiyal yiyecek katkıları olarak tanımlanmışlardır [30, 31].

Probiyotik kavramı, ilk olarak Bulgar köylülerinin uzun ve sağlıklı yaşamlarının kaynağının fermente süt ürünleriyle beslenmeleri olduğunu öne sürerek Nobel Ödülü kazanan Rus bilim adamı Elie Metchnikoff tarafından 1900'lü yıllarda ortaya konulmuştur. Elie Metchnikoff, fermantasyon yeteneğine sahip basiller ile (*Lactobacillus*) beslenmenin toksik mikrobiyal aktiviteleri azaltarak, kolon mikroflorasını olumlu yönde etkilediğini öne

sürmüştür. Böylece Metchnikoff'un teorisi ile “probiyotik” kavramı doğmuştur [32, 33]. Bu gelişmeyi takiben, 1930'larda probiyotiklerin beslenme üzerine etkileri konusunda ilk klinik denemeler gerçekleştirilmiş; 1950'lerin sonlarında ise domuzlarda görülen bir *Escherichia coli* enfeksiyonunun tedavisinde ilaç olarak kullanılmak üzere Amerika Birleşik Devletleri Tarım Departmanı tarafından probiyotik bir ürüne lisans verilmiş ve böylece probiyotik kavramı 20. yüzyılın başlarında hipotez olmaktan çıkmaya başlamıştır. Ancak, “probiyotik” teriminin kullanımı, çok daha sonra, “bağırsağın mikrobiyal dengesine katkıda bulunan organizma ve maddeler”i ifade etmek üzere Parker tarafından önerilmiştir [32].

Probiyotiklerin, probiyotiği tüketen kişinin intestinal ekosistemi üzerindeki olumlu etkisi, Fuller tarafından 1989 yılında yapılan tanımlamada da mevcuttur. Bu yazara göre, “probiyotik, tüketicinin intestinal mikrobiyal dengesini düzenlemek ya da desteklemek suretiyle, sağlığı üzerinde faydalı etkisi olan, canlı mikrobiyal gıda katkısı”dır [30, 33, 34].

2.5. Probiyotik Mikroorganizmalarda Bulunması Gereken Özellikler

Mikroorganizmaların probiyotik olarak seçilmesini ve daha sonra bu suşların ticari olarak kullanılmasını sağlayan bir takım kriterler mevcuttur [4, 35, 36].

Laktik asit bakterilerinin probiyotik olarak kullanılmalarını sağlayan seçim kriterleri aşağıdaki şekilde özetlenebilir [32]:

- Toksik ve patojen olmama
- Mide ve ince bağırsak asidine tolerans
- Safra tuzlarına direnç
- Sindirim kanalında veya ürogenital kanalda canlı kalabilme ve üreyebilme
- Antimikrobiyal madde üretebilme
- Epitel yüzeylere yapışma

- Patojen bakterilerin tutunma ve kolonizasyonunu engelleme
- Klinik olarak kanıtlanmış ve belgelenmiş sağlık etkilerine sahip olma
- Ucuz kùltivasyon
- Yüksek yoğunlukta üretimde kolaylık
- Dondurularak kurutmada kararlılık
- Üretim sürecine dayanıklılık
- Ürün haline getirildikten sonra dayanıklılık [34, 35, 37].

2.6. Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar

Fermente gıdaların metabolizma üzerindeki faydalı etkileri ile sağlıklı yaşam arasındaki ilişki Elie Metchnikoff'un ilk incelemelerine bağılı olarak günümüzde hala doğruluğunu korumaktadır. Ancak, son yıllarda probiyotikler üzerine yapılan araştırmalar, fermente süt ürünlerinden izole edilen bakteriler dışında bağırsak kökenli bakterilerin de bu özelliklere sahip olduğunu göstermiştir [33].

Farklı cinslere ait birçok mikroorganizma probiyotik olarak kullanılmaktadır. En yaygın olarak kullanılan suşlar ise laktik asit bakterilerinin, enterokoklar, laktobasiller ve bifidobakterileri kapsayan heterojen bir grubundan oluşmaktadır. Özellikle laktobasiller probiyotik olarak kullanılan bakterilerin başında gelmektedir. Ancak artık günümüzde diğerk mikroorganizmalar da probiyotikler arasına girmiştir [36]. Laktik asit bakterileri dışında probiyotik olarak kullanılan diğerk organizmalar arasında *Bacillus* spp., mayalar (örneğin *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces boulardii*) ve filamentöz fungusler (örneğin *Aspergillus oryzae*) yer almaktadır [32]. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar Çizelge 2.2'de verilmiştir [30, 32, 36, 38].

Çizelge 2. 2. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar

Laktik Asit Bakterileri				Diğerleri
<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Bifidobacterium spp.</i>	<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>Bacillus spp.</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Ent.faecalis</i>	<i>S. cremoris</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Ent.faecium</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. (<i>bulgaricus</i>)	<i>B. animalis</i>		<i>S. diacetylactis</i>	<i>E. coli</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>B. infantis</i>		<i>S. intermedius</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. thermophilum</i>			<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>			
<i>L. lactis</i>				
<i>L. plantarum</i>				
<i>L. reuteri</i>				
<i>L. brevis</i>				

2.7. Probiyotiklerin Etki Mekanizması

Probiyotiklerin etki mekanizmasına yönelik çalışmalar, bağırsak florasının düzensizliğiyle ortaya çıkan gastrointestinal sistemdeki bozukluklara dayanarak yapılmaya başlanmıştır [39].

Probiyotiklerin konakçıyı intestinal sistem bozukluklarına karşı nasıl koruduğunu açıklamaya çalışan birçok mekanizma bulunmaktadır. Ancak yine de hangi patojenlere karşı hangi probiyotiklerin etkili olduğunun tam olarak belirlenmesi için daha fazla çalışmanın yapılmasına gereksinim vardır. Probiyotiklerin muhtemel etki mekanizmaları aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

İnhibe edici maddeler üreterek: Probiyotikler gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmalar üzerinde etkili birçok madde üretmektedir. Bunlardan bazıları laktik asit, hidrojen peroksit, bakteriosin ve bakteriosin benzeri maddelerdir [40].

Tutunma bölgelerini bloke ederek: Probiyotikler tutunma bölgeleri için patojenler ile rekabete girerek, intestinal sisteme yerleşmelerini engellemektedir [41].

Besin maddeleri için rekabet: Probiyotikler patojenler için de gerekli olan besin maddelerini tüketerek, onların sistemde uzun süre kalmasını engellemektedir [42].

Toksin resöptörlerinin yıkımı: Bu mekanizma hayvanlarda *S. boulardii*'nin intestinal mukozada bulunan *Clostridium difficile*'nin toksin resöptörlerini parçalayarak konakçıyı koruması nedeniyle ortaya atılmıştır [42].

Bağışıklık sistemini güçlendirmesi: Son yıllarda yapılan çalışmalar probiyotiklerin spesifik ve spesifik olmayan bağışıklık sistemini güçlendirerek intestinal hastalıklara karşı konakçıyı koruduğunu ortaya koymuştur [4, 43].

2.8. Probiyotik Mikroorganizmaların İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

İntestinal floradaki bakterilerin sağlık açısından önemleri günümüzde daha iyi anlaşılmış durumdadır. Bu bağlamda yapılan araştırmalar sağlıklı bir yaşam sürmek, vücut direncini artırmak, intestinal düzensizliklerle ve hastalıklarla mücadele etmek için probiyotik ürün tüketimini önermektedir [44, 45]. Probiyotiklerin insan sağlığı üzerine olumlu etkileri aşağıda sıralanmıştır:

2.8.1. Bağırsak sistemi rahatsızlıkları üzerindeki etkileri

Probiyotiklerin en fazla kullanıldığı alanlardan biri antibiyotik kaynaklı diyaredir. Bunun yanı sıra çocuklarda görülen diyarenin, *C. difficile* ile alakalı enfeksiyonların ve bağırsaklarda *Candida*'nın aşırı geliştiği durumların tedavisinde de probiyotiklerden faydalanılmaktadır [3]. *Saccharomyces*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Streptococcus* bu tedavilerde kullanılan probiyotik cinslerinden bazılarıdır [5].

2.8.2. Mide üzerindeki etkileri

Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda bazı laktik asit bakterilerinin, kronik gastrit, mide ve onikiparmak bağırsağı ülseri hatta mide kanserinin önemli etkenlerinden biri olan *Helicobacter pylori*'ye antogonistik etki yaptığı rapor edilmiştir. Özellikle *Lactobacillus* cinsi türlerinde üretilen laktik asit ve bakteriosin gibi metabolitlere bağlı olarak *H. pylori*'nin üreaz aktivitesinin önemli derecede azaldığı belirlenmiştir [5].

2.8.3. Laktoz intoleransı üzerindeki etkileri

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* bakterilerinin laktoz intoleransına sahip hastalarda laktozu fermente ederek sindirimi kolaylaştırdığı ve probiyotik olarak kullanılabileceği bildirilmiştir [36, 46].

2.8.4. Antikanserojenik etkileri

Probiyotiklerin kanser oluşumu riskini azalttığı birçok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur [47]. Probiyotikler mutajenleri bağlamak, karsinojenlerin aktivitesini engellemek ve bağışıklık sistemini güçlendirmek suretiyle özellikle bağırsak kanserini düzenleyici etki göstermektedirler [48].

2.8.5. Antimikrobiyal etkisi

Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkisi; bağırsak patojenlerine karşı oluşturulan antogonistik etkide rol oynayan laktik asit, H_2O_2 ve antibiyotik benzeri maddeler üretmelerinden kaynaklanmaktadır [5].

2.8.6. Bağışıklık sistemine etkisi

Probiyotik bakterilerin endojen savunma mekanizmasını arttırdığı ileri sürülmektedir. Probiyotiklerin bu etkinliklerini fagositik aktivite, sitokin

salınımı, doğal öldürücü hücre aktivitesi, immünoglobulin aktivitesi (IgA, IgG, IgM), T ve B hücre fonksiyonunu arttırarak gösterdiği ileri sürülmektedir [5, 47].

2.8.7. Vitamin metabolizmasını iyileştirme etkisi

Probiyotik bakterilerin bağırsak florasında yeterli sayıda bulunduklarında vitamin sentezledikleri belirtilmiştir. Bu bakterilerin ürettiği vitaminlerin en önemlileri, tiamin (B₁), riboflavin (B₂), pridoksin (B₆) ve naftokin (K)'dır [5].

2.8.8. Diğer olumlu etkiler

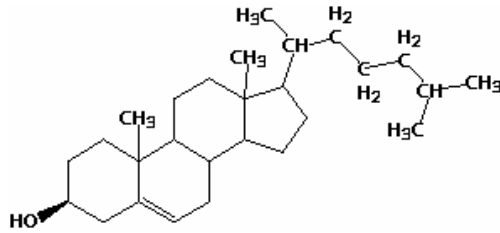
Bu olumlu etkilerin yanı sıra probiyotik özelliğe sahip bakterilerin iltihabi ve alerjik reaksiyonlar, ürogenital enfeksiyonlar, böbrek rahatsızlıkları, karaciğer rahatsızlıkları, idrar yolu enfeksiyonları, zehirlenme ve deri sağlığı üzerine de faydalı etkilerinin olduğu bildirilmiştir [37, 49].

2.8.9. Kolesterol düşürücü etkisi

Yüksek kolesterol ile bağlantılı olan kalp-damar hastalıkları, batılı ülkelerdeki en önemli ölüm nedenlerinden biridir. Bu sebeple, serum kolesterol seviyelerinin düşürülmesi, özellikle kalp-damar hastalıklarının önlenmesi bakımından büyük önem taşımaktadır [50]. Bugüne kadar gerçekleştirilen çeşitli çalışmalar, bağırsaktaki *L. acidophilus*, *B. bifidum* ve *L. bulgaricus* bakterilerinin kolesterol seviyelerini belirgin bir şekilde düşürdüğünü göstermiştir [51]. Laktik asit bakterileri tarafından serum kolesterol konsantrasyonlarının azaltılması üzerine yapılan bazı çalışmalarda elde edilen olumlu sonuçlar, probiyotiklerin kolesterol düşürücü özelliklerine karşı duyulan ilgiyi daha da artırmıştır [52]. Probiyotiklerin kolesterol konsantrasyonunu azaltabilmelerini sağlayan mekanizma tam olarak belirlenememekle birlikte, bu konuda çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür [53].

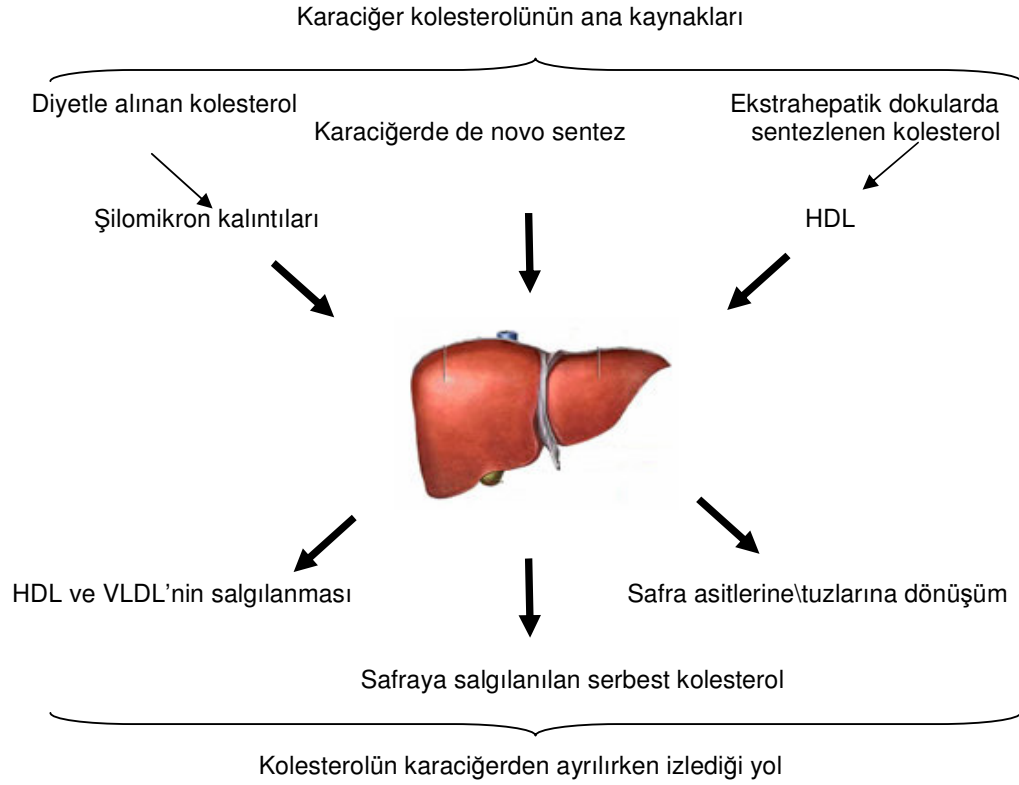
2.9. Kolesterol Metabolizması

Lipitlerin ayrı ve özelleşmiş bir tipi olan kolesterol, yaşam için mutlaka gerekli olan bir maddedir [54]. Kolesterol insanlardaki en yaygın steroldür ve vücutta belirli sayıda, bir grup işleve sahiptir. Örneğin, kolesterol bütün hücre zarlarının bir bileşenidir ve safra tuzları, steroid hormonlar ve D vitamininin öncül maddesidir. Vücudun belli başlı dokularına sürekli kolesterol sağlanması önemlidir. Bu gereksinimi karşılamak üzere bir seri kompleks taşıma, biyosentetik ve düzenleyici mekanizmalar gelişmiştir. Karaciğer, vücudun kolesterol dengesinin düzenlenmesinde merkezi bir role sahiptir [55]. Kolesterolün yapısı Şekil 2.1’de gösterilmiştir [56].



Şekil 2. 1. Kolesterolün yapısı

Kolesterol, genellikle beslenme yoluyla dışarıdan alınmasına rağmen, aslında vücut, ihtiyaç duyulan tüm kolesterolü üretebilme kabiliyetindedir. Kolesterol karaciğerdeki kolesterol havuzuna bazı kaynaklardan gelir: Bunlar; diyetle alınan kolesterol, ekstrahepatik dokularda sentezlenen kolesterol ve karaciğerde de novo sentez sonucu oluşan kolesteroldür. Kolesterol esasen, karaciğer ve bağırsaklarda, yağ, protein ve karbonhidrat parçalarından sentezlenir [51, 55, 57]. Karaciğer kolesterolünün kaynakları ve kolesterolün karaciğerden ayrılma yolları Şekil 2.2’de gösterilmiştir [55].



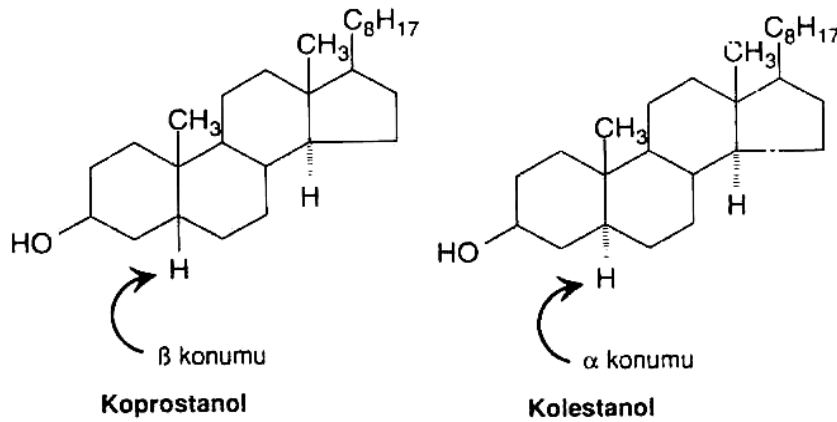
Şekil 2.2. Karaciğer kolesterolünün kaynakları ve kolesterolün karaciğerden ayrılma yolları

Vücuttaki kolesterolün yarısından çok az bir kısmı de novo biyosentez yoluyla elde edilir. Günlük kolesterol sentezinin yaklaşık olarak %10'u karaciğerde, %15'i ise bağırsaklarda gerçekleşir [58]. Kolesterol sentezi, hem sitozol hem de endoplazmik retikulumda bulunan enzimlerle birlikte sitozolde meydana gelir. Farklı insan popülasyonlarının diyetlerindeki kolesterolün miktarı çok değişkendir, hatta aynı kişide bile kolesterol alım miktarı günden güne anlamlı olarak değişebilir. Bu yüzden, vücuttaki kolesterol sentez hızını, kolesterol atılım hızına karşı dengelemek için düzenleyici mekanizmalar mevcut olmalıdır. Bu düzenlemede bir dengesizlik, dolaşımdaki kolesterol düzeyinin artmasına, bu da koroner arter hastalığı olasılığına yol açarken, kolesterolün safraya aşırı salgılanması ise kolesterolün safra kesesinde ve safra kanalında çökmesine neden olabilmektedir [55].

Yağlar, proteinler ve karbonhidratlardan farklı olarak kolesterol, enerji elde edilmesinde kullanılamaz. Diğer bir deyişle, kolesterolün halka yapısı insanlarda H_2O ve CO_2 'e metabolize edilemez. Az miktardaki kolesterol, hormonların ve D vitaminin yapımında kullanılır. Ancak, kolesterolden üretilen en önemli ürünler safra asitleridir [54, 55]. Kolesterol daha ziyade, bütün sterol halkası olarak vücuttan şu şekillerde atılır:

1. Feçesle atılan safra asitlerine dönüşür,
2. Safra içine salgılanır, böylece kolesterol atılmak üzere bağırsağa taşınır [55].

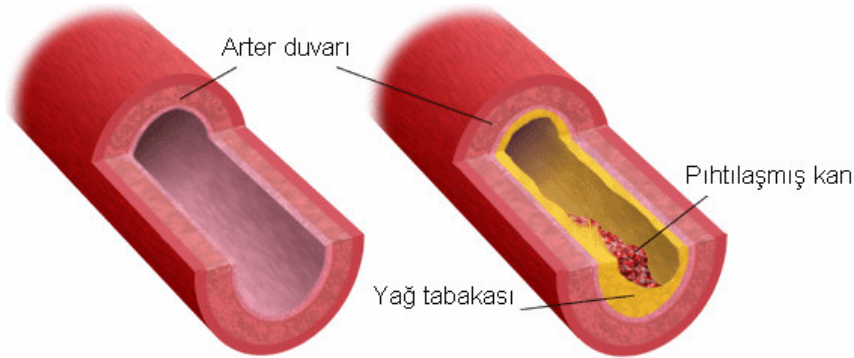
Bağırsaktaki kolesterolün bir kısmı atılmadan önce bağırsaktaki bakteriler tarafından değiştirilir. Bu şekilde oluşan başlıca bileşikler, kolesterolün indirgenmiş türevleri olan koprostanol ve kolestanoldür. Bu üç bileşik birlikte nötral dışkı sterollerini oluştururlar [55]. Koprostanol ve kolestanolün molekül formülleri Şekil 2.3'te verilmiştir [55].



Şekil 2.3. Koprostanol ve Kolestanol'ün yapısı

2.9.1. Kandaki kolesterol seviyesinin önemi

Kan dolaşımındaki kolesterol miktarı arttığında fazla kolesterol, kalbi besleyen damarların duvarlarında birikmeye başlar. Kolesterol, damar duvarında birikerek ateroskleroz ya da damar sertliği denilen damar yapısı serleşmesine neden olur. Kolesterol birikintileri koroner damarı giderek daraltır ve kalbin beslenmesi için gerekli olan kanın ve oksijenin kalbe ulaşmasına engel olur. İhtiyacından çok daha az oksijen alan kalp kası güçsüzleşir ve göğüs ağrısı oluşur. Kolesterol nedeni ile daralmış ve yapısı bozulmuş koroner damarda bu daralmanın üzerine pıhtı oluşumu da eklenirse kalp krizi hatta ölüm ortaya çıkabilir. Böbrek damarlarında kolesterol birikimi ise, yüksek tansiyon ve böbrek yetmezliğine neden olabilir. Kolesterolün damar duvarında birikimi yavaş gelişen bir olaydır. Eğer kan kolesterol düzeyi düşürülebilirse, kolesterol birikmesini yavaşlatılabilir, durdurulabilir, hatta oluşmuş olan birikintiler azaltılabilir ve dolayısı ile kalp hastalığı ve ölüm riski de azaltılmış olur [51]. Şekil 2.4.'te kolesterolün arter duvarında birikme aşamaları gösterilmiştir [59].



Şekil 2.4. Kolesterolün arter duvarında birikme aşamaları

Kolesterol kanda lipoprotein adı verilen paketlerin içinde taşındığı için lipoprotein türleri kalp hastalığı riskini etkileyebilir. Kandaki kolesterolün çoğunu düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL) taşır. LDL'de taşınan kolesterol ve yağ, damarları tıkayan tehlikeli birikintilerin ana kaynağıdır. Kan

dolaşımında ne kadar yüksek oranda LDL bulunuyorsa kalp hastalığına yakalanma riski de o kadar yüksektir. Yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL) kandaki kolesterolün bir miktarını taşır ancak bu kolesterol karaciğere taşınır ve vücuttan dolayısı ile damarlardan uzaklaştırılır. Eğer iyi kolesterol düzeyi düşük ise kalp hastalığına yakalanma riski yüksek olacaktır [54].

2.9.2. Kolesterol dengesinde safra asitlerinin rolü

Vücuttaki kolesterol yıkımının büyük kısmı karaciğerdeki safra asidi senteziyle olur. İnsanlarda her gün yaklaşık olarak 500 mg kolesterol safra asitlerine dönüştürülür ve safra içinde uzaklaştırılır. Fazla kolesterolün bu şekilde vücuttan atılması büyük olasılıkla tüm hayvanlar için, özellikle de aşırı miktarda kolesterol ile beslenildiği durumlarda önemlidir. Ayrıca, safra asitlerinin, kolesterol metabolizmasına katılarak, kolesterol biyosentezindeki hız belirleyici enzimin transkripsiyonunu değiştiren hormonlar gibi fonksiyon gösterdikleri de belirlenmiştir [60].

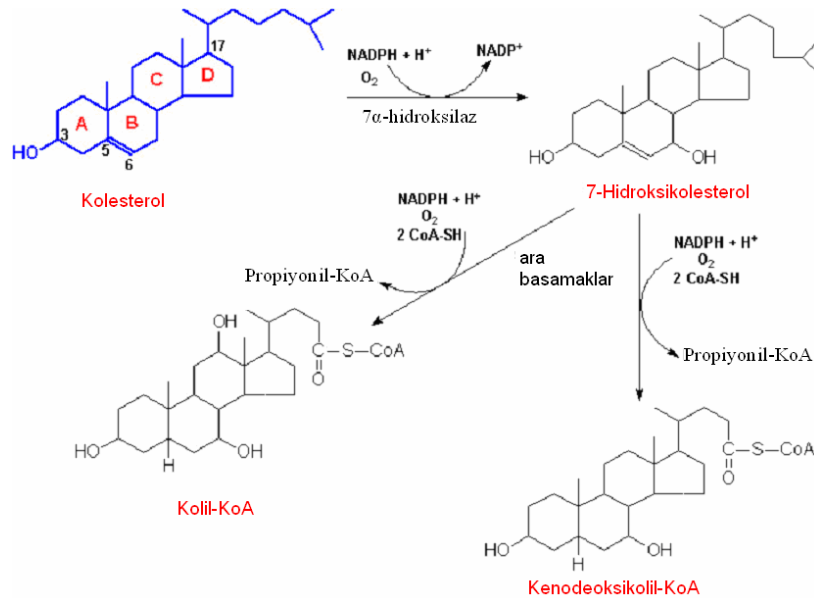
Kolesterolün, vücuttan atılması için izlenen en önemli yol safra içerisine salgılanmasıdır. Serbest kolesterol, sulu çözeltilerde neredeyse hiç çözünmez, fakat safrada, safra asitleri ve lesitin gibi lipitler vasıtasıyla çözünebilir hale gelir [61].

2.9.3. Safra asitleri ve safra tuzları

Safra organik (safra tuzları, kolesterol, fosfolipitler, bilirubin) ve inorganik (su, elektrolitler) bileşiklerin sulu bir karışımından oluşur [55, 59]. Fosfatidilkolin (lesitin), ve safra tuzları nicelik olarak safranın en önemli bileşenleridir. Safra, ya doğrudan safra kanalı yoluyla karaciğerden onikiparmak bağırsağına geçer ya da sindirim için hemen gereksinim yoksa safra kesesinde depolanabilir. En çok bulunan safra asitleri kolik asit ve kenodeoksikolik asittir [55].

Safra asitleri, amfipatiktirler. Bu yüzden, moleküller hem polar, hem de nonpolar bir yüze sahiptir ve bağırsakta yağları çözücü ajanlar olarak işlev görebilirler. Böylece diyetle alınan trasilgliserol ve diğer kompleks lipidlerin, pankreasın sindirim enzimleri tarafından yıkılması için yardımcı olurlar [55].

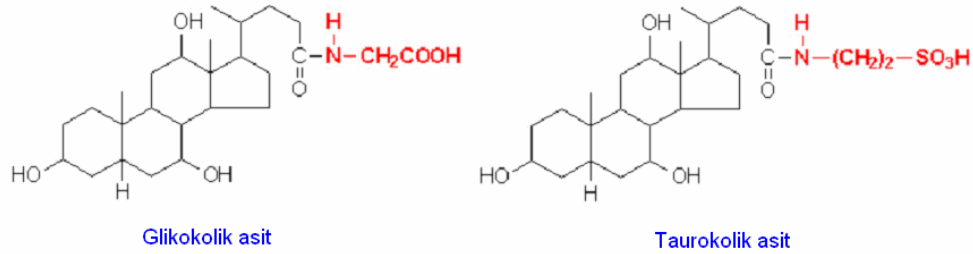
Safra asitleri karaciğerde çok basamaklı bir metabolik yol tarafından sentez edilirler. Oluşan bileşikler “primer” safra asitleri olarak adlandırılan kolik asit ve kenodeoksikolik asittir. Safra asitleri karaciğerden ayrılmadan önce bir molekül glisin ya da taurin amino asitleri ile konjuge edilir. Konjugasyon, safra asidinin karboksil grubu ile eklenen bileşiğin amino grubu arasında oluşan amid bağı tarafından sağlanır. Oluşan bu yeni bileşikler safra tuzları olarak adlandırılırlar. Bunlar, glikolik asit, glikokenodeoksikolik asit, taurokolik asit ve taurokenodeoksikolik asittir [55]. Primer safra asitleri olan kolik asit ve kenodeoksikolik asitlerin sentezi Şekil 2.5’te gösterilmiştir [58].



Şekil 2.5. Primer safra asitleri olan kolik asit ve kenodeoksikolik asitlerin sentezi

Safra tuzları artmış amfipatik özelliklerinden dolayı safra asitlerinden daha etkili deterjanlardır. Bu yüzden, sadece konjuge formları (yani safra tuzları)

safrada bulunur [55]. Şekil 2.6'da sırasıyla, glisin ve taurin amino asitleri ile konjuge olmuş safra asitleri (safra tuzları) gösterilmiştir [58].



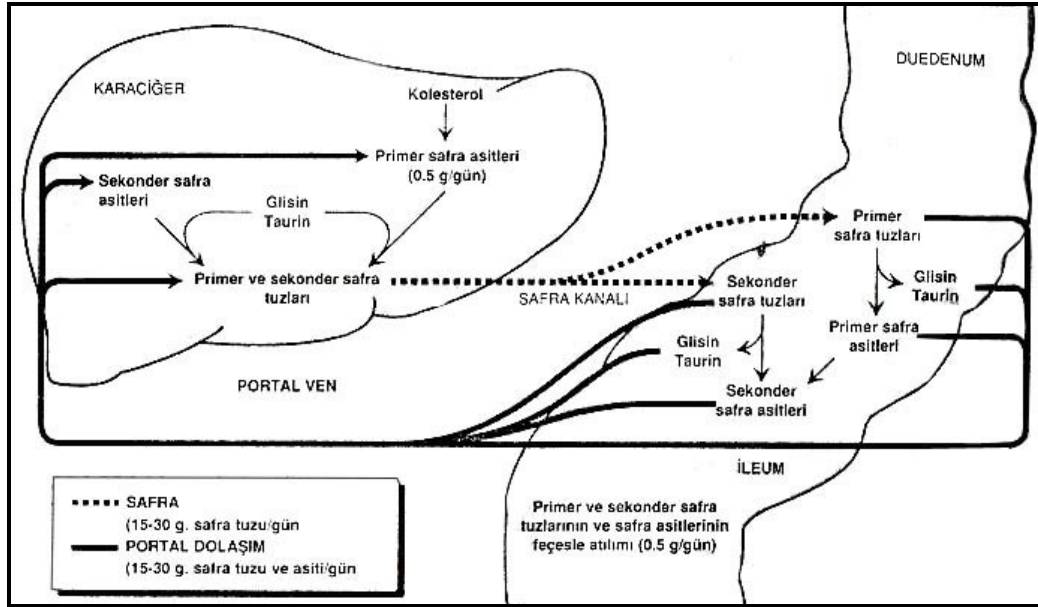
Şekil 2.6. Glisin ve taurin amino asitleri ile konjuge olmuş safra asitleri (Safra Tuzları)

Enterococcus, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides* ve *Lactobacillus* gibi bağırsak bakterileri safra tuzlarından glisin ve taurini ayırabilirler. Bu olaya “dekonjugasyon” adı verilir. Ayrıca, primer safra asitlerinin bir kısmını bir hidroksil grubu çıkararak sekonder safra asitlerine dönüştürebilirler. Böylece kolik asitten deoksikolik asit, kenodeoksikolik asitten de litokolik asit oluşur [55].

2.9.4. Enterohepatik dolaşım

Bağırsağa salgılanan safra tuzları etkin bir şekilde yeniden absorbe edilirler ve yeniden kullanılırlar. Primer ve sekonder safra tuzlarının ve safra asitlerinin karışımı aktif transport ile öncelikle ileumda absorbe edilir. Bağırsak mukoza hücrelerinden portal kana aktif olarak taşınırlar ve karaciğer parenkim hücreleri tarafından etkin bir şekilde alınırlar. Karaciğer hem primer hem de sekonder safra asitlerini glisin veya taurin ile konjuge ederek safra tuzlarına dönüştürür ve böylece safraya salgılanmak için hazır hale gelirler. Safra tuzlarının safraya devamlı salgılanma işlemi, duodenuma geçişleri (bazıları burada safra asitlerine dönüşür) ve karaciğere safra asitleri ve tuzlarının bir karışımı olarak daha sonraki geri dönüşümün hepsine birden

“enterohepatik dolaşım” denir [55]. Safra tuzları ve safra asitlerinin enterohepatik dolaşımı Şekil 2.7’de verilmiştir [55].



Şekil 2. 7. Safra tuzları ve safra asitlerinin enterohepatik dolaşımı

Her gün 15-30g kadar safra tuzu karaciğerden duodonoma salgılanır ve sadece günlük olarak 0,5g'ı feçesle kaybedilir. Karaciğer tarafından hergün yaklaşık olarak 0,5g safra asidi kaybolan miktarın yerine yapılır [55].

2.10. Probiyotiklerin Kolesterol Konsantrasyonunu Düşürmesini Sağlayan Olası Mekanizmalar

Kolesterol tüm vücut dokuları için temel bir yapıtaşı olduğu halde, kandaki kolesterol seviyesinin yüksek olması, koroner kalp hastalığının en önemli risk faktörlerinden biridir. Kan kolesterol seviyelerini düşürmek için uygulanan en son yöntemler arasında, perhiz uygulaması, düzenli egzersiz ve ilaç tedavisi yer almaktadır. Tedavide kullanılan çeşitli farmakolojik ajanlar ile yüksek kolesterol seviyelerini etkili bir şekilde düşürmek mümkündür, ancak bu ilaçlar pahalı olmalarının yanı sıra bir takım yan etkilere de sahiptirler [62].

Son yıllarda, kandaki yüksek kolesterol seviyelerinin düşürülmesi için perhiz uygulamalarında yeni yaklaşımlar söz konusudur. Bu uygulamalar arasında, probiyotik bakterilerin kullanımı da önemli bir yere sahiptir. Probiyotik bakteriler ile fermente edilmiş süt ürünlerinin kan lipitleri üzerine olan etkileri ile ilgili ilk kayıt, günümüzden yaklaşık olarak 30 yıl öncesine dayanmaktadır. Bu tarihten itibaren bugüne kadar bu konu üzerinde birçok in vitro ve in vivo çalışma yapılmış ve özellikle belirli *Lactobacillus* veya *Bifidobacterium* türlerini içeren probiyotik ürünlerin kandaki yüksek kolesterol seviyelerini azalttığı gösterilmiştir [9]. Dolayısıyla probiyotiklerin bu alanda kullanımına karşı olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır.

Laktik asit bakterilerinin kolesterol düşürücü fonksiyonunun mekanizmasını açıklayabilmek için çeşitli araştırmalar yapılmış ve iki temel mekanizma öne sürülmüştür:

1. Diyetle alınan kolesterolün bağırsaklardan emiliminin azaltılması
2. Safra tuzlarının dekonjugasyonu [8].

2.10.1. Diyetle alınan kolesterolün bağırsaklardan emiliminin azaltılması

Kolesterolün bağırsaklardan emiliminin, bakteriler tarafından azaltılması ve bu suretle, kolesterolün feçes yoluyla atılımının artmasının da çeşitli mekanizmalarla gerçekleşebileceği düşünülmektedir. Olası bu mekanizmalar aşağıda sıralanmıştır.

Kolesterolün asimilasyonu

Laktobasiller ve bifidobakteriler ile yapılan çeşitli deneyler, bu bakterilerin belirli suşlarının, safra tuzları varlığında, kolesterolü asimile edebilme yeteneğine sahip olduğunu kanıtlamıştır.

Gilliland ve arkadaşları, 1985 yılında yaptıkları bir in vitro çalışmada, belirli *L. acidophilus* suşlarının anaerobik koşullar altında ve safra varlığında, besiyerindeki kolesterol miktarını azaltabildiğini göstermişlerdir. Bu koşullar, bağırsaklarda mevcut koşullar ile aynı olduğu için, yazarlar, bu olayın, diyetle alınan kolesterolün en azından bir kısmının kana karışmasını engelleyebileceği sonucuna varmışlardır. Ancak, safra varlığında gelişme ve besiyerindeki kolesterolü uzaklaştırabilme kabiliyeti suşlara bağlı olarak farklılık göstermiştir [63].

Gilliland ve arkadaşları, bu çalışmayı, domuzlar üzerinde in vivo olarak da gerçekleştirmiştir. Hayvan modeli olarak domuzların seçilme sebebi, bu hayvanların sindirim sistemlerinin, kan damarların dağılımının ve damar sertliği karakterlerinin insanlara olan benzerliğidir. Çalışmanın sonuçları, yüksek oranda yağ içeren bir diyetle beslenen domuzların, safra varlığında kolesterolü asimile etme yeteneğine bağlı olarak seçilen *L. acidophilus* RP32 suşu ile beslenmesinin, serum kolesterol seviyelerinde belirgin bir düşüşe yol açtığını göstermiştir. Bu etkinin temelinde yatan mekanizma, *L. acidophilus* suşunun kolesterolü asimile etmesine bağlanmıştır [63].

Kolesterolün bakterinin hücre duvarına bağlanması veya hücre zarının yapısına katılması

L. acidophilus ATTC 43121 suşu tarafından kolesterol asimilasyonunu kanıtlamak için yapılan başka bir çalışma ise Noh ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu yazarlar bu suş tarafından asimile edilen kolesterolün metabolik olarak parçalanmadığını, besiyerinden alınan kolesterolün büyük kısmının, hücrelerden tekrar geri kazanılabildiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, kolesterol miselleri ve safra tuzlarının varlığında geliştirilen hücrelerin, bunlar olmaksızın geliştirilen hücrelere kıyasla sonikasyon ile parçalanmaya karşı daha dayanıklı olduğunu gözlemlemişlerdir. Hücrelerin sonikasyona karşı daha dirençli hale gelmesinin, hücre duvarı veya zarının besiyerindeki

kolesterol ile değişikliğe uğramasından kaynaklandığını öne sürmüşlerdir [64].

1999 yılında, Usman ve Hosono tarafından yapılan bir in vitro çalışmada, test edilen 28 *Lactobacillus gasseri* suşunun, safra içeren besiyerindeki kolesterolü bağlama yeteneği açısından belirgin farklılıklara sahip olduğu gözlenmiştir. Daha önceki çalışmalarda, *L. acidophilus*'un kolesterol üzerine olan etkisi, hücreler, belirli bir miktarda safra tuzu ve kolesterol içeren besiyerinde geliştirilerek incelendiyse de, Usman ve Hosono'nun çalışması, hücrelerin, kolesterolü bağlama yeteneği üzerine yoğunlaşmıştır. Araştırmacılar 28 suşun tamamının kolesterolü bağlama yeteneğine sahip olduğunu, ancak kolesterol bağlama kabiliyetinin suşlara bağlı olarak değişiklik gösterdiğini saptamışlardır. Bu farklılığın, bakteri hücre duvarındaki peptidoglikanların kimyasal ve yapısal farklılığı ile alakalı olabileceği öne sürülmüştür [65].

Nakajima H. ve arkadaşlarının 1992 yılında yaptıkları bir çalışmada, ekzopolisakkarit (EPS) üreten ve üretmeyen iki *L. lactis* subsp. *cremoris* suşunun kolesterolü bağlama yetenekleri test edilmiş ve sonuçta ekzopolisakkarit üreten suşun, üretmeyen diğer suşa kıyasla daha fazla kolesterolü bağlayabildiği gösterilmiştir. Bu araştırmacılar, hücreler tarafından üretilen EPS miktarının yüksek olması durumunda, bu polisakkaritlerin diyetle alınan lifli gıdalara benzer bir etki gösterebileceğini ve bu suretle kolesterolün, bakteriler tarafından üretilen EPS'ye bağlanarak feçesle atılan kolesterol miktarının artabileceğini, ve böylece bağırsaklardan emilerek kana karışan kolesterol miktarında azalma meydana gelebileceğini öne sürmüşlerdir [66].

Kolesterolün koprostanol'e dönüştürülmesi

Bifidobacterium spp., *L. acidophilus* ve *Eubacterium coprostanoligenes* gibi çeşitli bağırsak bakterileri kolesterol redüktaz olarak adlandırılan ve kolesterolün koprostanol molekülüne dönüşmesini sağlayan bir enzime

sahiplerdir. Koprostanol molekülü bağırsaklardan çok az emilir ve böylece koprostanol şekline dönüştürülen kolesterol, kana karışmak yerine, feçes yoluyla vücuttan uzaklaştırılmış olur. Dolayısıyla da kandaki kolesterol düzeyi azalır [67, 68].

2.10.2. Safra tuzlarının dekonjugasyonu

Bağırsak mikroorganizmaları tarafından safra tuzlarının dekonjugasyona uğraması, serum kolesterol seviyelerinin düşürülmesi bakımından çok önemlidir [69].

Kolesterol, karaciğerde sentezlenen primer safra asitlerinin öncül maddesidir. Safra asitleri, karaciğerde üretildikten sonra, glisin veya taurin amino asitleri ile birleştirilerek, safra kesesinde, konjuge safra tuzları şeklinde depo edilir ve sindirim kanalına salgılanmak üzere burada bekletilirler. Konjuge safra tuzları ince bağırsağa, besinlerle alınan yağların, kolesterolün, hidrofobik vitaminlerin ve yağda çözünen diğer bileşiklerin emiliminde yardımcı olmak üzere salgılanırlar. Konjuge safra tuzlarının %97'si ince bağırsakta geri emilerek enterohepatik döngü ile karaciğere geri döner. Safra tuzlarının çok az bir kısmı ise geri emilmeyerek, serbest safra asitleri şeklinde feçes vasıtasıyla vücuttan atılır [69].

Dekonjugasyon reaksiyonu, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides* ve *Lactobacillus* cinslerinin de dahil olduğu birtakım bağırsak bakterileri tarafından üretilen safra tuzu hidrolaz (BSH) enziminin faaliyeti ile, glisin veya taurin ile konjuge olmuş safra asitlerinden oluşan safra tuzlarının, amino asit kökü ve serbest safra asidine hidroliz olmasıdır [53, 70]. Serbest safra asitleri, konjuge safra tuzlarına kıyasla daha az çözünür özelliktedir ve bağırsak kanalından daha az emilirler [69].

Safra asitlerinin dekonjugasyonunun;

1. Kolesterolün bağırsak kanalından daha az emilmesine yol açmak,
2. Enterohepatik döngüyle karaciğere dönen safra asidi miktarını azaltarak, karaciğerdeki safra asidi üretimini artırmak,
3. Bağırsaklarda meydana gelen asidik ortamda kolesterolün serbest safra asitleriyle çökmesini sağlamak suretiyle serum kolesterol seviyelerinin azalmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir [69].

Serbest safra asitlerinin deterjan etkisi, konjuge safra tuzlarından daha az olduğundan, dekonjuge olmuş (serbest) safra asitleri, lipitlerin çözünmesinde ve kolesterolün emiliminde, konjuge safra tuzları kadar iyi fonksiyon gösteremezler. Bu sebeple safra tuzu dekonjugasyonunun, kolesterolün çözünürlüğünü, dolayısıyla bağırsaklardan emilimini azalttığı düşünülmektedir. Böylece besinlerle alınan ve safra yoluyla bağırsağa ulaşan kolesterolün emilerek kana karışma oranının azaldığı tahmin edilmektedir [65, 71, 72].

Dekonjuge olmuş (serbest) safra asitlerinin çözünürlüğü daha azdır ve bunlar bağırsak kanalından konjuge safra tuzlarına kıyasla daha az emilirler. Bu sebeple, ince bağırsakta, safra tuzlarının dekonjugasyonu, bağırsak kanalından daha fazla safra asidinin atılmasına yol açar. Özellikle serbest safra asitleri, konjuge safra tuzlarına göre bağırsaklardan çok daha fazla atılırlar. Serbest safra asitleri, bakteri hücrelerine ve besinlerle alınan liflere bağlanmak suretiyle de fekal yolla vücuttan daha çok atılırlar [71]. Piegon R. M. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışma, serbest safra asitlerinin bakteri hücrelerine bağlanmasında, laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritler (EPS)'in de etkili olduğunu; bu polimerlerin safra asitlerini veya kolesterolü bağlayarak, bunların bağırsaklardan emiliminde, bitki kaynaklı polisakkaritler veya lifli gıdaların mekanizmasına benzer bir yolla vücuttan uzaklaştırılmalarına yardımcı olduklarını göstermiştir [8].

Safra asitlerinin atılımında meydana gelen artış, dolaylı olarak serum kolesterol seviyelerinde bir azalmaya sebep olur. Bu ise şöyle gerçekleşir:

Dekonjuge olmuş yani serbest safra asitlerinin bağırsaklardan az emilmesi ve bunların atılımının daha fazla oluşu nedeniyle enterohepatik sirkülasyon vasıtasıyla karaciğere dönen safra asidi miktarında meydana gelen bu eksiği tamamlamak için, karaciğer, vücuttaki mevcut kolesterolü kullanarak daha çok safra asidi sentezler. Böylece, daha fazla safra asidinin üretilmesi için, safra asitlerinin öncül maddesi olan kolesterolün kullanımı artar ve dolayısıyla serum kolesterol seviyesinde bir azalma meydana gelir [9].

L. acidophilus ve *B. bifidum* tarafından kolesterol asimilasyonu mekanizması Klaver ve Van Der Meer (1993) adlı araştırmacılar tarafından da çalışılmıştır. Bu yazarlar, safra tuzu içeren besiyerindeki kolesterol miktarının azalışını, kolesterolün bakteri tarafından alınmasına değil, safra tuzlarının dekonjuge olmasıyla meydana gelen asidik ortamda, kolesterolün serbest safra asitleriyle çökmesine bağlamışlardır [73].

Tahri ve arkadaşları kolesterolün asimilasyon veya serbest safra asitleriyle çökmesi mekanizmasını *Bifidobacterium* türlerini kullanarak çalışmışlardır. Bu araştırmacılar, kolesterol ile hücre yüzeyi arasında belirgin bir bağlantının gerçekleştiğini gözlemlemişlerdir ki bu durum besiyerindeki kolesterolün hücrelerin içinde alındığı şekilde adlandırılmıştır. Bu asimilasyon olayı için safra tuzları varlığında hücre gelişiminin olmasının öncelikli olarak gerekli olduğu belirtilmiştir. Yazarlar, tespit edilen kolesterol azalışının, sadece kolesterolün dekonjuge olmuş safra asitleriyle çökmesine bağlanamayacağını belirtmişlerdir. Yani bu çalışma ile besiyerindeki kolesterol miktarının azalması, kolesterolün hücre yüzeyi ile kurduğu bağlantı ve kolesterolün serbest safra asitleriyle çökmesi olayının birlikte rol alabileceği öne sürülmüştür [74].

2.11. Tutuklama (İmmobilizasyon)

Tutuklama; suda çözünen ve çözeltide serbest hareket edebilen enzim moleküllerinin suda çözünmeyen reaktif polimerik destek materyaller kullanılarak hareketlerinin sınırlandırılmasına denir [75].

Tutuklanmış enzimlerde, enzimin hareketleri sınırlandırılmış ve belli bir desteğe veya polimerik matriks'de alıkonularak tekrar tekrar katalitik aktivite göstermesi amaçlanmıştır. Tutuklama sadece enzimlere değil ayrıca hücresel organellere, mikrobiyal hücrelere, bitki hücrelerine ve hayvan hücrelerine v.b. uygulanabilir [75, 76].

Son 20-30 yılda enzim tutuklamasının yanında mikroorganizma tutuklaması da önem kazanmıştır. Substrat, mikroorganizmanın içerdiği enzimlerden biri için spesifik ise saf bir enzimin tutuklanması yerine bunu içeren mikroorganizmanın tutuklanması ve saflaştırılmasına gerek kalmayacağından ekonomik açıdan büyük yarar sağlamaktadır. Özellikle son ürün elde edebilmek için birden fazla enzimden yararlanılıyor ve problem yaratmıyor ise enzim yerine mikroorganizmanın tutuklanması çok ekonomiktir [75].

Tutuklamada doğal veya sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Taşıyıcı materyal, suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir. Bu tip destek polimerlerine Carrageenan, Alginatlar ve Xanthan örnek olarak verilebilir [5].

Mikroorganizmalar aracılığıyla yapılan dönüşümlerden besin, kimya, tıp ve benzeri endüstri kollarında geniş ölçüde faydalanılmaktadır. Ancak serbest mikroorganizma sistemlerine göre, tutuklanmış mikroorganizmaların kullanılmasının büyük avantajlar sağladığı gözlenmiştir.

2.11.1. Probiyotik mikroorganizmaların tutuklanması

Pratikte ve endüstriyel uygulamalarda çeşitli üstünlükler göstermesi nedeniyle mikroorganizmaların ya belirli tutucularda tutularak ya da taşıyıcıların kafes yapıları içerisinde tutuklanarak veya çevreleri yarı geçirgen film tabakası ile çevrilerek kullanılmaları düşünülmüş ve bununla ilgili olarak son yıllarda yeni teknikler geliştirilmiştir [77].

İnsanoğlunun bilinçli kullanımı yeni bir olay olmamasına rağmen tutuklanmış hücreler doğada çok yaygındır. Mikroorganizmaların bir yüzeye tutunması, mikrobiyal ekolojide çok önemli rol oynamaktadır. Enzimlerle başlayan tutuklama çalışmaları hücrelere de uygulanmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Endüstriyel uygulamalar başlangıçta, tek enzim gerektiren proseslerde inaktive edilmiş hücrelerle yapılmış fakat daha sonra tutuklanmış hücre teknolojisinde bilgi birikiminin artmasıyla çok enzim gerektiren canlı hücrelerin kullanıldığı prosesler uygulanmaya başlanmıştır [77].

Son 20 yılda probiyotik mikroorganizmaların tutuklanması popüler hale gelmiştir. Bilindiği gibi probiyotikler insan sağlığına olumlu etkileri olan mikroorganizma grubundan oluşmaktadır ve birçok probiyotik gıda da sağlık amaçlı tüketime sunulmaktadır. Probiyotik mikroorganizmaların tutuklanma nedenlerine bakıldığında, probiyotiklerde meydana gelen yüksek oranda hücre kaybının en büyük etken olduğu görülmektedir [78].

Probiyotik mikroorganizmalar ulaşmaları gereken yer olan bağırsağa gelmeden önce ürün içerisinde ve daha sonra insan vücudunda mide asitliği, safra tuzları gibi olumsuz etkilerle karşılaşmaktadırlar. Bu süreçte birçok mikroorganizma ölmekte veya probiyotik özelliklerini yitirmektedir. Araştırmacılar bu olumsuz şartlardan hücrenin tutuklanarak korunabileceğini öne sürmüşler ve bu konuda çalışmalara hız vermişlerdir [78, 79, 80]. Starter ve probiyotik mikroorganizmaların tutuklanarak üstün kalitede probiyotik ürünlerin üretilmesi için çalışmalar hızla devam etmektedir.

2.11.2. Tutuklanmış mikroorganizmalar tarafından kolesterol giderimi

Hücrelerin tutuklanarak kullanılması biyolojik olarak aktif olan materyallerin çok ince yarı geçirgen polimer membranlar içerisine hapsedilmesidir. Polimer membran, içerisine hapsedilmiş olan materyali olumsuz dış etkilerden koruduğu gibi aynı zamanda çözünen maddelerin mikro kapsülün içine girmesine ve dışına çıkmasına da olanak sağlar. Bu özelliklerinden dolayı tutuklama işleminin biyomedikal ve tıbbi uygulamalarda verimli bir şekilde kullanılabileceği bildirilmiştir. 2004 yılında Jones ve arkadaşları tarafından genetik olarak modifiye edilmiş ve tutuklanmış *L. plantarum* hücrelerinin safra tuzu dekonjugasyonu yoluyla kolesterol düşürücü etkisini belirlemek üzere bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonucunda tutuklanmış hücrelerin safra tuzlarını etkili bir şekilde dekonjuge edebildiği sonucuna varılmıştır [62]. Ancak tutuklanmış hücreler tarafından diğer olası mekanizmalarla kolesterol gideriminin araştırıldığı bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Materyal örnekleri

Araştırma TBAG projesi (101T129) kapsamında EPS üretimleri tespit edilmiş düşük ve yüksek EPS üretime sahip 24 adet *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşu arasından seçilen 5 adet suş ile yürütülmüştür. Bu suşlardan düşük EPS üretime sahip A13 ve B2 kodlu suşlar ile yüksek EPS üretime sahip B3 ve G11 kodlu suşlar Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Bu suşların izolasyonları TBAG projesi (101T129) kapsamında Ankara çevresindeki köylerden toplanan yoğurt örneklerinden yapılmıştır. Suşların identifikasyonu yine TBAG projesi (101T129) kapsamında, API 50 CHL kiti kullanılarak, ayrıca 16S rRNA sekans analizlerine göre gerçekleştirilmiştir. Yüksek EPS üretime sahip ATCC 11842 kodlu suş referans suş olarak kullanılmıştır.

3.1.2. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları

Suşların geliştirilmesi ve aktifleştirilmesinde MRS Broth ve agarı kullanılmıştır. Ayrıca tüm deneysel çalışmalarda $41\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 20 saat geliştirilmiş ve iki kez aktifleştirilmiş kültürler kullanılmıştır [81, 82].

3.1.3. Araştırmada kullanılan besiortamları

Araştırmada kullanılan MRS (Man Rogosa and Sharpe) Sıvı Besiortamı içeriğinde yer alan maddeler Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3. 1. MRS (Man Rogosa and Sharpe) Sıvı Besiortamı

Maddeler	g/L
Peptone	10,0
Beef Extract	10,0
Yeast Extract	5,00
Glucose	20,0
Tween 80	1,10 mL
K ₂ HPO ₄	2,00
Sodium Acetate.3 H ₂ O	5,00
Tri Amonium Citrate	2,00
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,20
MnSO ₄ .4 H ₂ O	0,05

Maddeler 1000 mL distile suya ilave edilmiştir. Besiortamının pH'sı 0,01 N HCl ve 0,01 N NaOH ile 6,2±0,2'ye ayarlanmıştır. Katı besiortamı hazırlamak için besiortamına %1,5 oranında agar ilave edilmiştir. Besiortamı 121 °C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir [81].

3.2. Metot

3.2.1. Bakterilerin muhafazası

Suşların muhafazası için 1,5 mL'lik ağzı kapaklı tüplere yaklaşık 0,4 mL gliserol konularak, 121 °C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir. Bakteriler uygun sıvı besiortamında iki kez ardı ardına aktifleştirilmiştir. Aktifleştirilen kültürlerden 0,6 mL gliserol içeren steril ağzı kapaklı tüplere ilave edilerek, -20°C'de muhafaza edilmiştir. Muhafazaya alınan stoklar iki ayda bir yenilenmiştir [83].

3.2.2. Kolesterolün ve farklı safra konsantrasyonlarının gelişim üzerine etkisi

Kolesterolün ve farklı safra konsantrasyonlarının suşların gelişimi üzerine etkisi hem spektrofotometrik olarak hem de MRS agarlı petri üzerindeki canlı mikroorganizma sayısı saptanarak belirlenmiştir.

Kolesterolün ve farklı safra konsantrasyonlarının gelişim üzerine etkisinin spektrofotometrik olarak belirlenmesi

- 5 mL'lik MRS broth besiortamına son kolesterol konsantrasyonu 100 µg/mL olacak şekilde 0,45 µm'lik disposable filtreden geçirilerek steril edilmiş stok kolesterol (Merck) çözeltisinden (10mg/mL kolesterol/etanol) eklenmiştir.
- 100 µg/mL oranında kolesterol içeren 5 mL'lik MRS broth besiortamına son safra konsantrasyonu %0,0, %0,1, %0,2 ve %0,3 olacak şekilde 0,45 µm'lik disposable filtreden geçirilerek steril edilmiş Ox Gall Powder (Sigma) stok safra çözeltisinden eklenmiştir.
- Suşların aktif kültürlerinin optikal yoğunluk (OD) değerleri 600 nm dalga boyundaki spektrofotometrede (Digilab Hitachi U-1800) 6,00'a ayarlanmıştır (OD_{600nm} ≈ 6,00).
- Suşların OD_{600nm} ≈ 6,00 olan aktif kültürlerinden 100 µg/mL oranında kolesterol ile %0,0, %0,1, %0,2 ve %0,3 oranında safra içeren 5 mL'lik MRS broth besiortamına %2 oranında inoküle edilerek, 42°C'de 19 saat (logaritmik faz) ve 48 saat (durgun faz) inkübasyona bırakılmıştır. Ayrıca kontrol olarak kolesterol ve safra içermeyen MRS broth besiortamına bu kültürlerden aynı oranda ekim yapılmıştır.
- Inkübasyon sonunda 600 nm dalga boyundaki spektrofotometrede örneklerin optikal yoğunlukları ölçülmüştür.

Kolesterolün ve farklı safra konsantrasyonlarının gelişim üzerine etkisinin MRS agarlı petrilerde belirlenmesi

- Suşların OD_{600nm} ≈ 6,00 olan aktif kültürlerinden 5 mL'lik 100 µg/mL oranında kolesterol ile %0,0, %0,1, %0,2 ve %0,3 oranında safra içeren MRS broth besiortamına %2 oranında inoküle edilmiş ve 42°C'de 19 ve 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- Inkübasyon sonunda örneklerden dilüsyonlar (10^{-1} - 10^{-8}) yapılarak MRS agar yüzeyine ekilmiş ve 42°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

- İnkübasyon sonunda koloni sayımları yapılarak canlı mikroorganizma sayıları $\log_{10}$ cfu/mL olarak tespit edilmiştir.

3.2.3. Safranin kolesterol giderimi üzerine etkisinin belirlenmesi

Suşların safrasız ortamda ve farklı safra konsantrasyonlarında kolesterol giderimi miktarları Gilliland ve arkadaşları (1985) tarafından modifiye edilen Rudel ve Morris (1973)'in "o-fitalaldehit" metodu üzerinde bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir [63, 84].

Suşların safrasız ortamda ve farklı safra konsantrasyonlarında kolesterol giderimi miktarı aşağıda anlatılan şekilde tespit edilmiştir:

- Suşların $OD_{600nm} \approx 6,00$ olan aktif kültürlerinden 5 mL'lik 100 µg/mL oranında kolesterol ile %0,0, %0,1, %0,2 ve %0,3 oranında safra içeren MRS broth besiortamına %2 oranında inoküle edilerek, 42°C'de 19 ve 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- İnokülasyon yapılmamış 100 µg/mL oranında kolesterol içeren MRS broth besiortamı kontrol olarak kullanılmıştır.
- İnkübasyon sonunda örnekler 10 000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucunda elde edilen berrak kısma serbest hücre ekstraktı (SHE) adı verilmiştir.
- Hücre pelleti orijinal besiortamına eşit hacimde distile su ile süspanse edilmiştir.
- SHE ve distile su ile süspanse edilen hücre pelletindeki kolesterol miktarının belirlenmesi için örneklerden 0,5 mL alınarak temiz tüplere dağıtılmıştır.
- Her bir örnek üzerine 3 mL %95'lik etanol eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır.
- Örneklerin üzerine 2 mL %50'lik KOH eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır.
- Örnekler 60°C'lik su banyosunda (Mommert) ısıtılmış ve ardından soğutulmuştur.

- Örneklerin üzerine 5 mL hekzan (Merck) eklenerek 20 sn boyunca vorteks ile iyice karışması sağlanmıştır.
- Örneklerin üzerine 3 mL distile su eklenerek tekrar karıştırılmıştır.
- Fazların ayrımını sağlamak için örnekler oda sıcaklığında 15 dk bekletilmiştir.
- Fazların ayrılması sonucunda oluşan hekzan tabakasının 2,5 mL'si temiz test tüplerine alınmıştır.
- Her bir tüpteki hekzan 60°C'lik su banyosunda tamamen buharlaştırılmıştır.
- Her bir tüpün üzerine 4 mL o-fitalaldehit reagent eklenmiştir. o-Fitalaldehit reagent 1 mL glasiyel asetik asit (Merck) içerisinde 0,5 mg o-phthaldialdehyde (Sigma) içermektedir.
- Örnekler oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir.
- Örneklerin üzerine yavaşça 2 mL saf sülfürik asit eklenmiştir.
- Örnekler vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında tekrar 10 dk bekletilmiştir.
- 550 nm dalga boyundaki spektrofotometrede örneklerin optikal yoğunlukları ölçülmüştür.

Kolesterol giderimi miktarlarını belirlemek için 10–150 µg/mL arasında değişen oranlarda kolesterol kullanılarak standart bir eğri çıkarılmıştır. Bu standarda göre örneklerin kolesterol miktarları µg/mL olarak belirlenmiştir.

Suşların % kolesterol giderimi değerleri Eş. 3.2'de verilen şekilde hesaplanmıştır [65].

$$A = 100 - [(B / C) \times 100] \quad (3.2)$$

A: Kolesterolün giderimi (%).

B: İnokülasyon yapılan besiortamındaki kolesterol miktarı (µg).

C: İnokülasyon yapılmayan (kontrol) besiortamındaki kolesterol miktarı (µg).

3.2.4. Gelişmekte olan, dinlenme halindeki ve cansız hücreler tarafından kolesterol gideriminin belirlenmesi

Gelişmekte olan hücreler tarafından kolesterol giderimi Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı şekilde belirlenmiştir. Dinlenme halindeki ve cansız hücreler tarafından kolesterol giderimi ise Kimoto (2002)'nin metodunda bazı modifikasyonlar yapılarak tespit edilmiştir [6].

- 10 mL'lik MRS broth besiortamına aktif kültürden %2 oranında inoküle edilerek, 42°C'de 19 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonunda örneklerin OD değerleri optikal yoğunlukları 600 nm dalga boyundaki spektrofotometrede 6,00'a ayarlanmıştır ($OD_{600nm} \approx 6,00$).
- Örnekler 1800 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir.
- Örnekler steril distile su ile iki kez yıkanmıştır.
- Hücre pelleti 10 mL distile su ile süspanse edilmiştir.
- 10 mL'lik süspansiyonun yarısı ısı ile cansız hücreleri hazırlamak için 121°C'de 15 dk otoklavlanmış, diğer yarısı ise dinlenme halindeki hücreleri hazırlamak üzere 100 µg/mL oranında kolesterol ve %0,3 oranında safra içeren 0,05 M 5 mL PBS (pH 6,8) ile süspanse edilmiştir.
- Otoklavlanarak ısı uygulaması ile öldürülmüş hücreler ise 100 µg/mL oranında kolesterol ve %0,3 oranında safra içeren MRS besiortamı ile süspanse edilmiştir.
- Örnekler 42°C'de 19 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonunda örnekler 10 000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir.
- Hücre pelleti orijinal besiortamına eşit hacimde distile su ile süspanse edilmiştir.

SHE ve distile su ile süspanse edilen hücre pelletindeki kolesterol miktarı Bölüm 3.2.3'te detaylı olarak anlatıldığı şekilde belirlenmiş ve suşların % kolesterol giderimi değerleri Eş 3.2'de verilen şekilde hesaplanmıştır [65].

PBS (Phosphate Buffered Saline) tamponu

<i>Maddeler</i>	<i>g/L</i>
NaCl	8
K ₂ HPO ₄	1.21
KH ₂ PO ₄	0.34

Maddeler 1 litre distile suya ilave edilip, pH 6,8±0,2'ye 0,01N HCl ve 0,01N NaOH ile ayarlanmıştır, 121 °C'de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir.

3.2.5. Tutuklanmış ve serbest kültürler tarafından kolesterol giderimi miktarının tespiti

Tutuklanmış ve serbest kültürler tarafından kolesterol giderimi Sultana ve arkadaşları (2000) tarafından modifiye edilen Sheu ve Marshall (1993)'ın metodu üzerinde bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir [5, 79, 80].

Kültürlerin Ca-Alginat taneciklerine tutuklanması

- Aktif kültürden 500 mL'lik MRS Broth besi ortamında 42°C'de 19 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- Hücreler 5000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek toplanmış ve 3 kez PBS (pH 6,2) ile yıkanmıştır.
- Pellet 50 mL serum fizyolojik içinde karıştırılmış ve hücre yoğunluğu Mac Farland 6'ya (Bio Mérieux-France) göre ayarlanarak eşitlenmiştir.
- Bu süspansiyon ile 50 mL % 2'lik steril Na-Alginat (Fluka) homojen hale gelinceye kadar manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırmıştır.
- Oluşan bakteri hücresi-alginat karışımı peristaltik pompa yardımıyla 1 mL'lik cam pipet ucundan 0,4 M CaCl₂ çözeltisi içerisine damla damla damlatılmıştır.

Tutuklanmış hücre içeren Ca-Alginat kürelerinin tam olarak olgunlaşması (Ca^{+2} ve Na^{+} iyonlarının tam olarak yer değiştirmeleri için) 2 saat buzdolabında $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 0,4 M steril CaCl_2 çözeltisi içinde bekletilerek sağlanmıştır [80, 85, 86].

Tutuklanmış ve serbest hücrelerin kolesterol giderimi miktarının tespiti

- 40 tane sağlam küre ve 40 tane parçalanmış küre kolesterol içermeyen; 100 $\mu\text{g/mL}$ oranında kolesterol içeren ve 100 $\mu\text{g/mL}$ oranında kolesterol ile %0,3 oranında safra içeren 0,05 M 5 mL PBS (pH 6,8) ile karıştırılarak 42°C 'de 19 ve 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- Inkübasyon sonunda örnekler 10 000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir.

SHE'deki kolesterol miktarı Bölüm 3.2.3'te detaylı olarak anlatıldığı şekilde belirlenmiş ve suşların % kolesterol giderimi değerleri Eş 3.2'de verilen şekilde hesaplanmıştır [65].

Tutuklama sonrası kürelerin içindeki canlı hücre miktarının tespiti

- 40 tane sağlam küre ve 40 tane parçalanmış küre kolesterol içermeyen; 100 $\mu\text{g/mL}$ oranında kolesterol içeren ve 100 $\mu\text{g/mL}$ oranında kolesterol ile %0,3 oranında safra içeren 0,05 M 5 mL PBS (pH 6,8) ile karıştırılarak 42°C 'de 19 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- Inkübasyon sonunda parçalanmamış küreler parçalanarak her iki gruptan 100 μL alınmış ve seyreltmeleri (10^{-1} - 10^{-8}) yapılarak, MRS agar yüzeyine ekilmiştir.
- 42°C 'de 24 saatlik inkübasyon sonunda koloni sayımları yapılarak canlı mikroorganizma sayıları $\log_{10}$ cfu/mL olarak tespit edilmiştir.

3.2.6. Kolesterolün EPS üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi

Suşların kolesterolsüz ve kolesterolü besiyortamında EPS üretim miktarlarını belirlemek için Valerie ve ark. (1999) ile Dubois ve arkadaşları'nın (1956) metodu kullanılmıştır [87, 88].

- Suşların $OD_{600nm} \approx 6,00$ olan aktif kültürlerinden 5 mL'lik 100 µg/mL oranında kolesterol içeren ve içermeyen MRS broth besiyortamına %2 oranında inoküle edilerek, 42°C'de 19 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- Inkübasyon sonunda örneklerden 1 mL'lik miktarlar ependrof tüplerine alınmıştır.
- Örnekler 100°C'de 10–15 dk kaynatıldıktan sonra oda sıcaklığına gelinceye kadar soğutulmuştur.
- 1 mL örnek üzerine % 85 lik triklorasetik asit (Merck) (% 0,17= 1,7µL) ilave edilmiştir.
- Örnekler 13 000 rpm'de 25 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası oluşan berrak kısım başka bir ependrof tüpüne alınmış ve üzerine alabildiği kadar eşit hacimde (yaklaşık 1 mL) etanol eklenmiştir. Örnekler 13 000 rpm'de 25 dk santrifüj edilmiştir.
- Berrak kısım ayrıldıktan sonra geriye kalan pelletin üzerine ikinci kez etanol (1000 µL) eklenmiş ve pelletin etanol içinde çözülmesi sağlanmıştır.
- Örnekler 13 000 rpm'de 25 dk santrifüj edilmiştir.
- Bu örneklerin üzerine 0,5 mL fenol (Sigma) ilave edilmiştir.
- Örneklerin üzerine hızlı bir şekilde 5 mL saf sülfürik asit eklenmiştir.
- Örnekler 10 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra, iyice karıştırılmıştır.
- Örnekler tekrar 25–30°C'de 15–20 dk bekletilmiştir.
- 490 nm dalga boyundaki spektrofotometrede örneklerin optikal yoğunlukları okunmuştur.

EPS üretim miktarlarını belirlemek için 5-100 mg/L arasında değişen oranlarda glikoz kullanılarak standart bir eğri çıkarılmıştır. Bu standarda göre örneklerin EPS miktarları mg/L olarak belirlenmiştir.

3.2.7. Taurokolik asit (TCA) dekonjugasyon miktarının tespiti

Suşların taurokolik asit (TCA) dekonjugasyon miktarları Gilliland ve Walker (1993) tarafından modifiye edilen Irvin ve arkadaşları (1944)'nin metodunda bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir [72, 89].

- Suşların OD_{600nm} ≈6,00 olan aktif kültürlerinden 20 mL'lik %0,2 oranında sodyum tioglikolat (Sigma) ve %0,2 oranında sodyum taurokolat (Fluka) içeren MRS broth besiyortamına %2 oranında inoküle edilerek, 42°C'de 19 ve 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- İnokülasyon yapılmamış %0,2 oranında sodyum tioglikolat ve %0,2 oranında sodyum taurokolat içeren MRS broth besiyortamı kontrol olarak kullanılmıştır.
- İnkübyasyon sonunda örneklerin pH'sı 1 N NaOH kullanılarak pH 7,0'a ayarlanmıştır.
- Örneklerin hacmi distile su ile 25 mL'ye tamamlanmıştır.
- Örnekler 10 000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir.
- SHE'nin 15 mL'si temiz bir tüpe alınmış ve 10 N HCl kullanılarak pH 1,0'a ayarlanmıştır.
- Örneklerin hacmi distile su ile 24 mL'ye tamamlanmıştır.
- Örneklerin her birinden 3 mL alınarak, önceden 9 mL etil asetat (Merck) konmuş olan tüplere eklenmiştir.
- Örnekler 20 sn boyunca vorteks ile iyice karıştırılmıştır ve ardından fazların ayrılması için beklenmiştir.
- Fazlar ayrıldıktan sonra etil asetat tabakasının 3 mL'si temiz tüplere alınmıştır.

- Her bir tüpteki etil asetat 60°C'lik su banyosunda tamamen buharlaştırılmıştır.
- Tüplerdeki kalıntıyı çözmek için her bir tüpün üzerine 1 mL 0,01 N NaOH eklenmiştir.
- Örneklerin üzerine 6 mL 16 N H₂SO₄ eklenmiştir.
- Örneklerin üzerine 1 mL %1'lik furfuraldehit (Sigma) eklenmiştir.
- Örnekler vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra 65°C'lik su banyosunda 13 dk ısıtılmıştır.
- Tüpler oda sıcaklığına gelinceye kadar soğutulmuştur.
- Örneklerin üzerine 5 mL glasiyal asetik asit eklenmiştir ve vorteksle iyice karıştırılmıştır.
- 660 nm dalga boyundaki spektrofotometrede örneklerin optik yoğunlukları ölçülmüştür.

TCA dekonjugasyon miktarlarını belirlemek için 100–1000 mg/mL arasında değişen oranlarda kolik asit (Calbiochem) kullanılarak standart bir eğri çıkarılmıştır. Bu standarda göre örneklerdeki kolik asit konsantrasyonu mg/mL olarak belirlenmiştir.

3.2.8. İstatistiksel analizler

Çalışmada elde edilen sonuçların veri analizleri SPSS Inc. Software (13.0 versiyonu; SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. Suşların EPS Üretim Miktarlarına Göre Seçilmesi

Çalışmamızda kullanılmak üzere TBAG projesi (101T129) kapsamında EPS üretimleri belirlenmiş olan toplam 24 adet *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türüne ait suş arasından EPS üretim özellikleri göz önüne alınarak 5 adet suş seçilmiştir. Bu suşlardan 3 adedi (B3, G11 ve ATCC 11842) yüksek, diğer 2 adedi (B2 ve A13) ise düşük oranda EPS üretmektedir. Seçilen bu suşların MRS besiortamında ürettiği EPS miktarları Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4. 1. Seçilen suşların EPS üretim miktarları

Suş	EPS üretim miktarı (mg/L)
B3	211±1
ATCC 11842	200±1
G11	159±0
B2	28±2
A13	27±0

4.2. Kolesterolün ve Farklı Safra Konsantrasyonlarının Gelişim Üzerine Etkisi

Kolesterolün ve farklı safra konsantrasyonlarının gelişim üzerine etkisinin belirlenmesi Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı şekilde iki farklı yöntemle yapılmıştır. Spektrofotometrik metoda göre belirlenen sonuçlar (OD_{600}) ile agarlı petri üzerindeki canlı mikroorganizma sayısının saptanmasıyla elde edilen sonuçlar ($\log_{10}$ cfu/mL) Çizelge 4.2’de verilmiştir. Suşların farklı safra konsantrasyonlarındaki canlılık yüzdeleri ise Çizelge 4.3’te gösterilmiştir.

Çizelge 4. 2. Kolesterolün ve farklı safra konsantrasyonlarının suşların gelişimi üzerine etkisi^(*)

Suşlar	B3				G11				B2				A13				ATCC 11842			
İnk. süresi (saat)	19		48		19		48		19		48		19		48		19		48	
Safra kons. (%)	OD ₆₀₀	log ₁₀ cfu/mL	OD ₆₀₀	log ₁₀ cfu/mL	OD ₆₀₀	log ₁₀ cfu/mL	OD ₆₀₀	log ₁₀ cfu/mL	OD ₆₀₀	log ₁₀ cfu/mL	OD ₆₀₀	log ₁₀ cfu/mL	OD ₆₀₀	log ₁₀ cfu/mL	OD ₆₀₀	log ₁₀ cfu/mL	OD ₆₀₀	log ₁₀ cfu/mL	OD ₆₀₀	log ₁₀ cfu/mL
Kontrol ⁽¹⁾	6,35	8,30	7,23	8,18	8,08	9,80	8,39	9,75	6,35	8,50	6,45	8,40	9,20	9,80	9,25	9,76	6,42	9,90	6,48	9,87
0,0 ⁽²⁾	6,52	8,57	7,68	8,30	8,51	9,90	9,35	9,78	6,52	8,60	7,20	8,57	9,40	9,85	9,92	9,77	6,61	9,95	6,86	9,90
0,1 ⁽³⁾	4,25	5,60	4,69	5,30	1,52	2,10	1,64	2,00	3,09	4,30	3,39	4,28	5,54	5,99	5,56	5,60	3,27	5,45	3,30	5,40
0,2 ⁽³⁾	2,10	3,20	2,39	2,98	0,50	-	0,53	-	2,07	3,10	2,21	3,00	2,80	3,10	2,87	3,00	2,02	3,25	2,06	3,00
0,3 ⁽³⁾	1,70	2,40	1,80	2,00	0,30	-	0,32	-	1,55	2,30	1,64	2,00	2,10	2,20	2,17	2,11	1,45	2,25	1,48	2,00

⁽¹⁾Kontrol grubu kolesterol ve safra içermemektedir.

⁽²⁾Besiortamı sadece 100µg/mL oranında kolesterol içermektedir; safra içermemektedir.

⁽³⁾Besiortamları 100µg/mL oranında kolesterol ve farklı oranlarda (0,1; 0,2 ve 0,3) safra içermektedir.

^(*)Sonuçlar dört farklı paralelin ortalamasıdır.

(-) Üreme yoktur.

Çizelge 4. 3. Farklı safra konsantrasyonlarındaki canlılık oranları (%)

Suşlar	B3				G11				B2				A13				ATCC 11842			
İnk. süresi (saat)	19		48		19		48		19		48		19		48		19		48	
Safra kons. (%)	OD ₆₀₀	log ₁₀ cfu/mL	OD ₆₀₀	log ₁₀ cfu/mL	OD ₆₀₀	log ₁₀ cfu/mL	OD ₆₀₀	log ₁₀ cfu/mL	OD ₆₀₀	log ₁₀ cfu/mL	OD ₆₀₀	log ₁₀ cfu/mL	OD ₆₀₀	log ₁₀ cfu/mL	OD ₆₀₀	log ₁₀ cfu/mL	OD ₆₀₀	log ₁₀ cfu/mL	OD ₆₀₀	log ₁₀ cfu/mL
0,1 ^(*)	65,2	65,3	61,0	63,9	17,9	21,2	17,5	20,4	47,4	50,0	47,1	49,9	58,9	60,8	56,1	57,3	49,5	54,8	48,1	54,5
0,2 ^(*)	32,2	37,3	31,1	35,9	5,9	0,0	5,7	0,0	31,7	36,0	30,7	28,0	29,8	31,5	28,9	30,7	30,6	32,7	30,0	30,3
0,3 ^(*)	26,1	28,0	23,4	24,0	3,5	0,0	3,4	0,0	23,8	26,7	22,8	23,3	22,3	22,3	22,1	21,8	21,9	22,6	21,5	20,2

^(*)Besiortamları 100µg/mL oranında kolesterol ve belirtilen oranda safra içermektedir.

19 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda suşların tamamının kolesterol içermeyen kontrol besiortamına kıyasla kolesterol içeren besiortamında daha iyi bir gelişme gösterdiği belirlenmiştir. Diğer bir ifade ile kolesterolün bakterilerin gelişimini artırdığı saptanmıştır.

Test edilen 5 suş arasında farklı konsantrasyonlarda safra içeren besiortamında gelişme yeteneği bakımından varyasyonlar bulunduğu tespit edilmiş ve suşların tamamının belirli bir oranda safra toleransına sahip olduğu belirlenmiştir. Genel olarak, %0,0; %0,1; %0,2 ve %0,3 oranında safra içeren besiortamında 19 ve 48 saat inkübe edilen kültürlerin OD₆₀₀ ve log₁₀cfu/mL değerlerinde artan safra konsantrasyonlarına bağlı olarak düşüş gözlenmiştir.

%0,3 oranında safra içeren besiortamında en yüksek canlılık oranı 19 saatlik inkübasyon süresinin sonunda %28 ve 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda %24 değerleri ile B3 suşunda tespit edilmiştir.

4.3. Safranin Kolesterol Giderimi Üzerine Etkisi

Düşük ve yüksek EPS üretimine sahip 5 suşun safrasız ortamda ve farklı safra konsantrasyonlarında kolesterol giderimi kapasiteleri Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı şekilde belirlenmiş, elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 4. 4. Farklı safra konsantrasyonlarında kolesterol giderimi^(*)

Safra Konsantrasyonu		%0,0			%0,1			%0,2			%0,3		
Suş	İnk. Süresi (saat)	Kolesterol Miktarı ⁽¹⁾ (µg/ml)	Kolesterol Miktarı ⁽²⁾ (µg/ml)	Kolesterol giderimi (%)	Kolesterol Miktarı ⁽¹⁾ (µg/ml)	Kolesterol Miktarı ⁽²⁾ (µg/ml)	Kolesterol giderimi (%)	Kolesterol Miktarı ⁽¹⁾ (µg/ml)	Kolesterol Miktarı ⁽²⁾ (µg/ml)	Kolesterol giderimi (%)	Kolesterol Miktarı ⁽¹⁾ (µg/ml)	Kolesterol Miktarı ⁽²⁾ (µg/ml)	Kolesterol giderimi (%)
B3	19	76,9	12,5	17	61,2	27,0	34	68,2	20,4	26	71,2	16,8	23
	48	68,6	19,9	26	55,6	33,8	40	59,0	25,1	36	63,8	25,6	31
ATCC 11842	19	76,8	10,4	17	68,6	18,9	26	73,4	14,3	21	75,1	14,3	19
	48	74,2	12,5	20	64,2	22,5	30	72,1	15,0	22	72,9	16,4	21
G11	19	80,0	8,50	13	78,2	7,90	15	79,9	4,80	13	80,2	3,40	13
	48	78,6	11,2	15	77,3	8,20	16	78,2	5,10	15	79,0	4,30	14
B2	19	83,8	5,20	9	77,3	7,90	16	78,6	5,50	15	82,5	9,00	11
	48	81,6	8,60	12	76,8	8,20	16	78,4	5,90	15	79,0	10,8	14
A13	19	84,7	4,50	8	80,8	8,50	12	81,6	6,40	12	84,0	4,90	9
	48	81,2	5,00	12	78,2	11,2	15	80,3	7,00	13	79,9	7,70	13

^(*) İnokülasyon yapılmayan kontrol besiortamındaki kolesterol miktarı 19 ve 48 saatlik inkübasyonun sonunda 92,4 µg/mL olarak tespit edilmiş ve suşların % kolesterol giderimleri bu değer üzerinden hesaplanmıştır. Sonuçlar dört farklı paralelin ortalamasıdır.

⁽¹⁾ 19 ve 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda besiortamında kalan kolesterol miktarıdır.

⁽²⁾ 19 ve 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda hücre pelletlerinden geri kazanılan kolesterol miktarıdır.

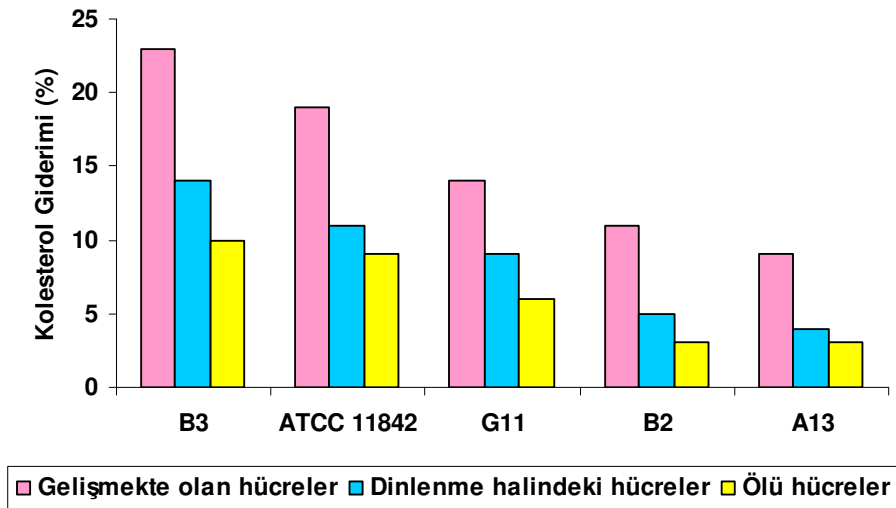
Test edilen suşların tamamı besiortamındaki kolesterolü belirli bir miktarda uzaklaştırmıştır ancak suşların kolesterol giderimi kabiliyetleri arasında farklılıklar gözlenmiştir. Genel olarak yüksek EPS üretimine sahip olan suşların (B3, ATCC 11842 ve G11), düşük EPS üretimine sahip suşlara (B2 ve A13) (Bkz. Çizelge 4.1) kıyasla besiortamından daha fazla kolesterolü uzaklaştırabildiği belirlenmiştir. 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda tüm suşlar için %0,0; %0,1; %0,2 ve %0,3'lük safra konsantrasyonlarındaki EPS üretimi-Kolesterol giderimi ilişkisinin “r” değerleri sırasıyla 0,87; 0,79; 0,73 ve 0,75 olarak belirlenmiş, diğer bir ifade ile EPS üretimi ile kolesterol giderimi kabiliyeti arasında belirgin bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir.

Tüm suşlar tarafından en yüksek kolesterol gideriminin 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda ve %0,1 oranında safra içeren ortamda gerçekleştiği saptanmıştır. %0,2 ve %0,3 oranında safra içeren besiortamında safra içermeyen besiortamına göre genelde daha yüksek kolesterol gideriminin gerçekleştiği tespit edilmiş ancak artan safra konsantrasyonuna bağlı olarak % kolesterol gideriminin düştüğü belirlenmiştir. Test edilen 5 adet suş arasında en yüksek EPS üretimine sahip (211 mg/L) B3 suşunun safra içermeyen, %0,1; %0,2 ve %0,3 oranında safra içeren besiortamlarının tamamında 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda en yüksek kolesterol giderimine sahip olduğu belirlenmiştir. B3 suşunun geliştirildiği %0,1 oranında safra ve 100 µg/mL oranında kolesterol içeren besiortamında 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda besiortamında 55,6 µg/mL oranında kolesterol kaldığı tespit edilirken, hücre pelletlerinden geri kazanılan kolesterol miktarı 33,8 µg/mL olarak bulunmuştur. 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda kontrol besiortamına (İnokülasyon yapılmayan kontrol besiortamındaki kolesterol miktarı 19 ve 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda 92,4 µg/mL olarak tespit edilmiştir) kıyasla yaklaşık olarak 4 µg/mL oranında kolesterol ise hücre pelletlerinden geri kazanılamamıştır. En yüksek kolesterol gideriminin %0,1 oranında safra içeren besiortamında ve 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda %40 değeri ile B3 suşu tarafından gerçekleştirildiği belirlenmiştir.

Tüm suşlar tarafından besi ortamından uzaklaştırılan kolesterolün büyük bir kısmı hücre pelletlerinden geri kazanılmıştır. Ancak tüm sonuçlarda besi ortamından uzaklaştırılan kolesterolün tamamı besi ortamından geri kazanılamamıştır.

4.4. Gelişmekte Olan, Dinlenme Halindeki ve Cansız Hücreler Tarafından Kolesterol Giderimi

Gelişmekte olan (% 0,3 oranında safra ve 100 µg/mL oranında kolesterol içeren MRS besi ortamında geliştirilen hücreler), dinlenme halindeki % 0,3 oranında safra ve 100 µg/mL oranında kolesterol içeren PBS (pH 6,8) ile süspanse edilmiş hücreler) hücreler ve cansız (ısı muamelesi ile öldürüldükten sonra % 0,3 oranında safra ve 100 µg/mL oranında kolesterol içeren MRS besi ortamı ile süspanse edilmiş hücreler) hücreler tarafından kolesterol giderimi Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı şekilde belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 1. Gelişmekte olan, dinlenme halindeki ve ısı ile öldürülmüş hücreler tarafından kolesterol giderimi

Yapılan çalışmanın sonucunda ısı muamelesi ile öldürülmüş hücrelerin dahi besiortamındaki kolesterol miktarını %3 ile %10 arasında değişen oranlarda azaltabildiği tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre dinlenme halindeki hücreler ile ısı muamelesi ile öldürülmüş hücrelerin kolesterol giderimi kapasiteleri arasında belirgin bir fark tespit edilmemekle birlikte ($r=0,98$), PBS (pH 6,8)'de süspanse edilen dinlenme halindeki hücrelerin ölü hücrelere nazaran ortamdaki kolesterolü daha çok uzaklaştırabildiği belirlenmiştir. Bunların yanı sıra, gelişmekte olan hücreler tarafından dinlenme halindeki hücreler ile ısı muamelesi ile öldürülmüş hücrelerden daha fazla miktarda kolesterolün uzaklaştırıldığı saptanmıştır. Bu çalışmada en yüksek yüzde kolesterol gideriminin üç farklı hücre tipinde de (canlı, dinlenme halindeki ve ölü) B3 suşu tarafından gerçekleştirildiği tespit edilmiş, genel bir ifade ile yüksek EPS üretimine sahip olan suşların (B3, ATCC 11842 ve G11) düşük EPS üretimine sahip suşlara (B2 ve A13) kıyasla besiortamından daha fazla kolesterolü uzaklaştırabildiği belirlenmiştir.

4.5. Tutuklanmış ve Serbest Kültürler Tarafından Kolesterol Giderimi

Tutuklama çalışmasında kullanılmak üzere farklı safra konsantrasyonlarında gelişme ve kolesterol giderimi kapasitesi bakımından test edilen ve farklı oranlarda EPS üretimine sahip 5 suş arasından yüksek oranda EPS üretimine sahip, safraya karşı dirençli ve kolesterol gideriminde etkili olan B3 suşu seçilmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda $OD_{600nm} \sim 6,00$ olan B3 suşu kültürünün cfu/mL değerinin $9,1 \times 10^8$ cfu/mL (Mac Farland 6'ya denk gelmektedir) olduğu ve bu değer de 40 adet küredeki hücre miktarına eşit olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlara dayanılarak tutuklama çalışmasında İnokülasyon miktarı olarak 40 adet küre kullanılmıştır.

19 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda tutuklanmış ve serbest kültürlerdeki canlı mikroorganizma sayıları Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı şekilde belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4. 5. Tutuklanmış ve serbest *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 kültüründeki canlı mikroorganizma sayısı (cfu/mL)^(*)

Canlı mikroorganizma sayısı (cfu/mL)						
	19. saat			48. saat		
Safra kons. (%)	Kontrol ⁽¹⁾	0,0 ⁽²⁾	0,3 ⁽²⁾	Kontrol ⁽¹⁾	0,0 ⁽²⁾	0,3 ⁽²⁾
Serbest hücre	1,9±0,1x10 ⁵	1,8±0,2x10 ⁵	4,4±0,2x10 ¹	1,7±0,0x10 ⁴	8,4±0,1x10 ³	1,6±0,2x10 ¹
Tutuklanmış hücre	2,1±0,2x10 ⁵	1,9±0,1x10 ⁵	6,5±0,2x10 ³	2,3±0,1x10 ⁴	1,8±0,2x10 ⁴	1,8±0,2x10 ³

⁽¹⁾Kontrol grubu safra ve kolesterol içermemektedir.

⁽²⁾Ortamda 100µg/mL oranında kolesterol bulunmaktadır.

^(*)Sonuçlar dört farklı paralelin ortalamasıdır.

Çizelge 4.5'te görüldüğü gibi 19 ve 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda tutuklanmış kültürlerdeki canlı mikroorganizma sayısının serbest hücrelerin bulunduğu kültürlerle göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Tutuklanmış ve serbest kültürlerin kolesterol giderimi miktarının tespiti Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 4. 6. Tutuklanmış ve serbest *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 suşu hücreleri tarafından kolesterol giderimi

Safra konsantrasyonu (%)		0,0		0,3	
	İnkübasyon süresi (saat)	Ortamda kalan kolesterol miktarı (µg/mL)	Kolesterol giderimi ^(*) (%)	Ortamda kalan kolesterol miktarı (µg/mL)	Kolesterol giderimi ^(*) (%)
Serbest hücre	19	83,2	10	79,5	14
	48	81,3	12	75,8	18
Tutuklanmış hücre	19	56,4	39	49,9	46
	48	52,7	43	46,2	50

^(*)İnokülasyon yapılmayan kontrol besiyortamındaki kolesterol miktarı 19 ve 48 saatlik inkübasyonun sonunda 92,4 µg/mL olarak tespit edilmiş ve suşların % kolesterol giderimleri bu değer üzerinden hesaplanmıştır. Sonuçlar dört farklı paralelin ortalamasıdır.

Çizelge 4.6'da görüldüğü gibi serbest ve tutuklanmış B3 suşu hücrelerinin kolesterol giderimi kapasitelerinin farklı olduğu tespit edilmiş, tutuklanmış hücrelerin serbest hücrelere kıyasla kolesterol gideriminde daha etkili olduğu belirlenmiştir. %50'lik değerle en yüksek kolesterol giderimi 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda %0,3 oranında safra içeren ortamda tutuklanmış B3 suşu hücreleri tarafından gerçekleştirilmiştir.

4.6. Kolesterolün EPS Üretimi Üzerine Etkisi

Kolesterolün EPS üretimi üzerine etkisi Bölüm 3.2.6'da anlatıldığı şekilde belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. Kolesterolün EPS üretimi üzerine etkisi

Kolesterol Kons.	EPS (mg/L)	
	0 µg/mL	100 µg/mL
Suş		
B3	220±0,2	230±0,1
ATCC 11842	178±0,1	199±0,2
G11	140±0,0	164±0,0
B2	48±0,2	65±0,2
A13	39±0,0	48±0,0

Çizelge 4.7'de görüldüğü gibi 100µg/mL oranında kolesterol içeren besiortamında 19 saat inkübe edilen tüm suşların kolesterol içermeyen kontrol besiortamında geliştirilen suşlardan daha çok miktarda EPS ürettiği tespit edilmiştir. Başka bir ifade ile kolesterolün EPS üretimini artırdığı saptanmıştır. Bu denemede 100µg/mL oranında kolesterol içeren besiortamında en yüksek EPS üretiminin (230 mg/mL) B3 suşu tarafından gerçekleştirildiği belirlenmiştir.

4.7. Safra Tuzu Dekonjugasyonu Miktarının Tespiti

Suşlar tarafından taurokolik asit (TCA) safra tuzunun dekonjugasyon miktarı Bölüm 3.2.7'de anlatıldığı şekilde belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4. 8. Taurokolik asit (TCA) safra tuzunun dekonjugasyon miktarı

Suş	Dekonjuge olan TCA miktarı (mg/mL) ⁽¹⁾	Dekonjugasyon (%) ⁽²⁾
B3	1,37±0,0	34,5
ATCC 11842	1,39±0,2	35,5
G11	1,27±0,1	29,5
B2	1,25±0,0	28,5
A13	0,98±0,1	15,0

⁽¹⁾İnkübasyonun başlangıcında besiortamındaki TCA miktarı 2mg/mL'dir.

⁽²⁾İnokülasyon yapılmayan kontrol besiortamında dekonjuge olan TCA miktarı 19 saatlik inkübasyonun sonunda 0,68 mg/mL olarak tespit edilmiş ve suşların % dekonjugasyon oranları bu kayıp dikkate alınarak hesaplanmıştır.

Safra tuzu dekonjugasyonu kabiliyetleri bakımından test edilen tüm suşların 19 saatlik inkübasyon süresinin sonunda TCA safra tuzunu farklı oranlarda dekonjuge edebildiği saptanmıştır. En yüksek dekonjugasyon aktivitesi %35,5 ve %34,5 değerleri ile sırasıyla ATCC 11842 ve B3 suşlarında en düşük dekonjugasyon aktivitesi ise %15,0 değeri ile A13 suşunda tespit edilmiştir. Dekonjugasyon oranı yüksek olan ATCC 11842 ve B3 suşları için kolesterol giderimi bakımından da önemli sonuçlar elde edilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Probiyotikler yeterli miktarlarda tüketildiklerinde konakçı canlının sağlığı üzerinde olumlu etkiler ortaya çıkaran ve canlı mikroorganizmalardan oluşan gıda katkılarıdır [31, 90]. Probiyotiklerin sağlığa yararlı etkileri ile ilgili birçok kaynak bulunmaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalar probiyotiklerin farklı nedenlerden kaynaklanan bağırsak rahatsızlıkları, *H. pylori* kaynaklı mide rahatsızlıkları, laktoz intoleransı, kolon kanseri, alerjik reaksiyonlar ve yüksek kolesterol seviyeleri gibi çeşitli rahatsızlıklar üzerinde iyileştirici etkilere sahip olduklarını ortaya koymuştur [91]. Son yıllarda laktik asit bakterilerinin probiyotik özellikleri ilgi çekmekte, özellikle *Lactobacillus* cinsi bakteriler yaygın olarak kullanılan probiyotik kültürlerin başında gelmektedir [6, 18].

Kolesterol insan vücudundaki birçok fonksiyonun gerçekleşebilmesi için gereklidir. Belirli hormonların ve vitaminlerin öncül maddesi olan kolesterol hücre membranlarının ve sinir hücrelerinin de önemli bir bileşenidir. Ancak kandaki yüksek kolesterol seviyesi koroner kalp hastalığı için bir risk faktörü teşkil etmektedir [32]. Yüksek kolesterol ile bağlantılı olan kalp-damar hastalıkları, batılı ülkelerdeki en önemli ölüm nedenlerinden biridir. Bu sebeple, serum kolesterol seviyelerinin düşürülmesi, özellikle kalp-damar hastalıklarının önlenmesi bakımından büyük önem taşımaktadır [50]. Kolesterol emilimi insan vücudunda temel olarak ince bağırsaklarda gerçekleştiğinden dolayı bu bölgede kolesterol giderimi yeteneğine sahip belirli laktik asit bakterilerinin, örneğin *Lactobacillus* cinsi bakterilerin gelişiminin serum kolesterol seviyelerinin kontrol edilmesinde etkili olabileceği bildirilmiştir [8, 64]. Dolayısıyla probiyotiklerin bu alanda kullanılmasına ilişkin ilgi gün geçtikçe artmaktadır.

Probiyotik olarak kullanılan bakterilerin kolesterol konsantrasyonunu azaltabilmelerini sağlayan mekanizma tam olarak belirlenememekle birlikte, bu konuda çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür. Bu mekanizmalar arasında, bakteriler tarafından kolesterolün asimilasyonu, kolesterolün bakterinin hücre

duvarına bağlanması veya hücre zarının yapısına katılması, kolesterolün bağırsaklardan emilemeyen bir molekül olan koprostanol molekülüne dönüştürülmesi ve safra tuzlarının enzimatik dekonjugasyonu bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar, kolesterolün ve dekonjugasyon neticesinde açığa çıkan serbest safra asitlerinin bakteriyel hücre duvarına bağlanmasında, bakteri hücresi tarafından üretilen ekzopolisakkaritlerin (EPS) de önemli bir role sahip olabileceğini ileri sürmektedirler [66]. Bu mekanizmalardan hangisinin ya da hangilerinin etkili olduğunu açıklamak için yapılmış çalışma sayısı sınırlıdır. Ayrıca, probiyotik çalışmalarının birçoğunda, probiyotik olarak önerilen ve potansiyel anti-kolesterol özelliğine sahip suşlar genellikle insan ya da hayvan orijinlidir. Literatürde yoğurt kökenli laktik asit bakterilerinin kolesterol giderimi özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu alanda bugüne kadar yapılmış diğer çalışmalardan farklı olarak bu çalışmada, probiyotik olarak kullanılabilecek yoğurt kökenli *Lactobacillus* cinsi bakteriler tarafından kolesterol giderimi ile yine bakteriler tarafından üretilen EPS arasındaki ilişkinin belirlenmesi ve kolesterol gideriminde safra tuzu dekonjugasyonunun etkisinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda kullanılmak üzere EPS üretimleri daha önceki çalışmalarla belirlenmiş 24 adet *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşu arasından EPS üretimi yüksek olan 3 adet (B3=211 mg/mL, ATCC 11842=200 mg/mL ve G11=159 mg/mL) ve EPS üretimi düşük olan 2 adet (B2=28 mg/mL ve A13=27 mg/mL) olmak üzere toplam 5 adet suş seçilmiştir.

Çalışmamızda ilk olarak kolesterolün suşların gelişimi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Çalışmamızda kullandığımız suşların tamamının 100 µg/mL oranında kolesterol içeren besiortamında kolesterol içermeyen kontrol besiortamına göre daha fazla gelişme gösterdiği belirlenmiştir. Kolesterolü besiortamında 19 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda en iyi gelişme gösteren suşların sırasıyla ATCC 11842, A13 ve G11 suşlarının olduğu ve bu suşların gelişim oranları arasında çok belirgin bir fark bulunmadığı tespit

edilmiştir. Aynı şekilde B2 ve B3 suşlarının da kolesterolü besiyortamında kontrol besiyortamına göre daha iyi gelişme gösterdiği ve bu suşların gelişim miktarlarının da birbirine yakın değerlerde olduğu saptanmıştır. Genel bir ifade ile kolesterolün tüm suşların gelişimini artırdığı belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.2).

2002 yılında Kimoto ve arkadaşları tarafından yapılan benzer bir çalışmada kolesterol giderimi kabiliyeti bakımından test edilen N7 suşunun kolesterol varlığında kolesterol içermeyen ortama kıyasla daha yüksek bir hücre yoğunluğuna ulaştığı belirlenmiştir. Çalışmada aynı zamanda kolesterol olmaksızın ve kolesterol varlığında geliştirilen hücrelerin yağ asidi kompozisyonları incelenmiş ve bu iki gruptaki hücrelerin hücre zarlarındaki yağ asidi kompozisyonlarında farklı bir dağılım olduğu tespit edilmiştir [6]. Bu çalışmada ve bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlar ışığında besiyortamında bulunan kolesterolün hücrelerin yapısında gelişimi olumlu yönde etkileyen bir takım değişiklikler meydana getirmiş olabileceğini düşünmekteyiz.

Safra toleransı probiyotiklerin seçiminde kullanılan önemli kriterlerden biridir. Yağları parçalayarak bunların bağırsaklardan emilimlerine yardımcı olmak üzere karaciğerden ince bağırsağa salgılanan safra, bakterilerin büyük oranda lipit ve yağ asidi içeren hücre membranlarına zarar vermek suretiyle inhibitör etkisi yapar. Bu sebeple probiyotik olarak kullanılacak bakterilerin bağırsaklarda fonksiyon gösterebilmeleri için safraya karşı dirençli olmaları gerekmektedir [92, 93]. İnsandaki safra konsantrasyonuna yakın bir değer olmasından dolayı safraya dirençli olan suşları belirlemek için özellikle %0,3'lük safra konsantrasyonunun kritik bir değer olduğu bildirilmiştir [94].

Çalışmamızda test edilen suşların farklı safra konsantrasyonlarında farklı oranlarda gelişim gösterdikleri tespit edilmiştir. Genel bir ifade ile %0,0'dan %0,3'e doğru artan safra konsantrasyonlarına bağlı olarak suşların tamamının canlılık oranlarının azaldığı saptanmıştır. Bununla birlikte G11

suşu hariç tüm suşların probiyotiklerin seçimi için kritik değer olan %0,3'lük safra konsantrasyonunda canlılıklarını sürdürebildikleri belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.2). Çalışmamızda test ettiğimiz suşlar arasında %0,3 oranında safra içeren besiortamında 19 ve 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda elde edilen sonuçlara göre sırasıyla %28 ve %24 değerleri ile safraya karşı en dirençli olan suşun aynı zamanda yüksek EPS üretimine sahip olan B3 suşu olduğu tespit edilmiştir. G11 suşu hariç diğer tüm suşların da %0,3'lük safra konsantrasyonunda %20,2 ile %26,2 değerleri arasında canlılıklarını koruyabildikleri saptanmıştır. Bununla birlikte G11 suşunun yüksek oranda EPS üretimine sahip olmasına rağmen safraya karşı en dirençsiz suş olduğu belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.3).

Lactobacillus cinsine ait çeşitli suşların safra toleranslarının araştırıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır [63, 72, 95, 96]. Yapılan tüm bu çalışmalarda genel olarak suşların safra toleransları arasında varyasyonlar olduğu tespit edilmiştir. Örneğin, bir çalışmada test edilen suşların safra toleransları arasında varyasyonlar görülmekle birlikte tüm suşların %0,3 oranında safra içeren besiortamında safra içermeyen kontrol besiortamından daha iyi gelişme gösterdikleri tespit edilmiştir [97]. 2005 yılında çeşitli *L. acidophilus* ve *L. casei* suşlarının safra toleranslarını belirlemek için yapılan başka bir çalışmada ise test edilen suşlardan %54'ünün safra içermeyen kontrol besiortamında %0,3 oranında safra içeren besiortamına göre daha iyi gelişim gösterdiği tespit edilmiştir [95].

Gilliland ve Speck (1977), Gilliland ve Walker (1990) ve Jacobson ve arkadaşları (1999) tarafından yapılan araştırmalarda da laktobasillerin safra duyarlılıkları arasında varyasyonların bulunduğu ve bu özelliğin türe olduğu kadar suşa özgü olduğu öne sürülmüştür [90, 97, 98, 99].

Elde ettiğimiz sonuçlar çalışmamızda kullandığımız tüm suşların farklı oranlarda safra toleransına sahip olduğunu ortaya koymuştur. Yüksek oranda EPS üretimine sahip olan B3 ve ATCC 11842 suşlarının yanı sıra, düşük

oranda EPS üretimine sahip B2 ve A13 suşlarının da belirli bir oranda safra toleransına sahip olduğu tespit edilmiştir. Genel olarak G11 suşu haricindeki tüm suşların 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda %0,3'lük safra konsantrasyonunda canlılıklarını %20,2 ile %24,0 oranları arasında sürdürebildiği belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.3). Tüm bu sonuçlar ışığında safra toleransının suşa özgü bir özellik olduğu öne sürülebilir. Bunun yanı sıra bazı araştırmacılar tarafından suşlar tarafından üretilen EPS'nin bakteri hücrelerini faj atakları, osmotik stres, antibiyotik ve toksik maddelere karşı koruduğu ileri sürülmüştür [22]. Bizim çalışmamızda kullandığımız suşlar da farklı oranlarda EPS üretimi kabiliyetine sahiptir. Ancak yapmış olduğumuz çalışmanın sonucunda EPS üretimi ile safra direnci arasında doğrudan bir ilişki tespit edilememiştir.

Çeşitli kaynaklarda safra toleransının probiyotiklerin etkili olabilmesi için gerekli bir özellik olduğu bildirilmiştir [31, 96]. Bir kaynakta suşların farklı safra konsantrasyonlarında farklı gelişim oranlarına sahip olmasının, probiyotik olarak kullanılabilecek kültürlerin kolesterol giderimi gibi yararlı fonksiyonları arasındaki çeşitliliği de açıklayabileceği öne sürülmüştür. Bu fenomenin temelindeki mekanizmalar göz önüne alındığında probiyotiklerin bağırsak koşullarında canlılıklarını korumalarının öncelikli bir şart olduğu öne sürülmüştür [96]. Elde ettiğimiz verilere dayanarak çalışmamızda kullandığımız suşların bağırsak koşullarında canlılıklarını sürdürebilecekleri, dolayısı ile probiyotik özelliklerini sergileyebileceklerini düşünmekteyiz.

Dünya literatüründe EPS üretimi ile kolesterol giderimi arasındaki ilişkinin araştırıldığı çok az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Bizim çalışmamızda kolesterol giderimi ile bakteriler tarafından üretilen EPS arasında herhangi bir ilişki olup olmadığını belirlemek için düşük ve yüksek EPS üretimine sahip suşların safrasız ortamda ve farklı safra konsantrasyonlarında 19 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri için kolesterol giderimi kapasiteleri araştırılmıştır.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar doğrultusunda suşların tamamının safra içermeyen ve %0,1; %0,2 ve %0,3 oranında safra içeren besiortamındaki kolesterolü belirli miktarlarda uzaklaştırabildiği belirlenmiştir. Tüm suşlar tarafından en az kolesterol giderimi safra içermeyen besiortamında, en fazla kolesterol giderimi ise %0,1 oranında safra içeren besiortamında gerçekleşmiştir. İnsan bağırsağındaki safra konsantrasyonuna en yakın değer olan %0,3 oranında safra içeren besiortamında 19 saatlik inkübasyon süresinin sonundaki kolesterol giderimi %9 ile %23 değerleri arasında; 48 saatlik inkübasyon süresinin sonundaki kolesterol giderimi ise %13 ile %31 değerleri arasında tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.4). En yüksek kolesterol gideriminin hem 19 saatlik (%34) hem de 48 saatlik (%40) inkübasyon süresinin sonunda % 0,1 oranında safra içeren besiortamında B3 suşu tarafından gerçekleştirildiği belirlenmiştir.

Gilliland ve arkadaşlarının (1985) *L. acidophilus* tarafından kolesterol asimilasyonunu belirlemek üzere yaptıkları benzer bir çalışmada safra konsantrasyonunun bakteriler tarafından kolesterol giderimi üzerinde etkili olduğu ve bakterilerin sadece safra varlığında kolesterol giderimi gerçekleştirebildikleri bildirilmiştir. Çalışmada besiortamındaki safra konsantrasyonu %0,0'dan %0,5'e doğru yükseldikçe asimile olan kolesterol miktarının da arttığı ortaya konulmuştur. İn vitro olarak gerçekleştirilen bu çalışmada elde edilen sonuçlara bağlı olarak test edilen suşların safra varlığında ve anaerobik koşullarda kolesterol giderimi yeteneğine sahip oluşunun aynı olayın belirli bir safra konsantrasyonuna sahip ve anaerobik olan bağırsak koşullarında da meydana gelebileceği öne sürülmüştür [63].

Lim H. ve arkadaşları (2004) tarafından gerçekleştirilen bir araştırmada ise %0,0 ve %0,3 oranında safra içeren besiortamlarında geliştirilen farklı laktik asit bakterilerinin kolesterol giderimi kapasiteleri araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda test edilen suşların safra varlığına bağlı olmaksızın besiortamındaki kolesterolü %0-%65,9 arasında değişen oranlarda uzaklaştırabildikleri belirlenmiştir. Diğer bir ifade ile bu çalışmada test edilen

suşların safra içermeyen besiortamındaki kolesterolü de uzaklaştırabildikleri saptanmıştır [50]. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da test ettiğimiz tüm suşların safra içermeyen besiortamında dahi kolesterol giderimini gerçekleştirebildikleri belirlenmiştir. Ancak %0,1 oranında safra içeren ortamdaki kolesterol giderimi daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Bu durumun safranin yağların üzerindeki çözücü etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte %0,2'lik ve %0,3'lük safra konsantrasyonlarında ise safra içermeyen besiortamına kıyasla daha yüksek, ancak %0,1 oranında safra içeren ortama göre daha düşük bir kolesterol gideriminin gerçekleştiği saptanmıştır. Bu sonuçlar kolesterol gideriminde safranin yağlar üzerindeki çözücü etkisinin yanı sıra mikroorganizmalar üzerindeki inhibitör etkisinin de önemli olduğunu ortaya koymuştur. Diğer bir ifade ile ortamda safranin bulunması kolesterol giderimi üzerine olumlu bir etki yaparken, safranin inhibitör etkisine bağlı olarak hücrelerin canlılığında meydana gelen azalmanın kolesterol giderimini olumsuz bir yönde etkilediği öne sürülebilir.

Ayres J. W. ve arkadaşları (1988) tarafından yapılan bir çalışmada safra gelişmeyi inhibe eden bir madde olduğundan artan safra konsantrasyonlarında bakterilerin kolesterol giderimi kabiliyetinin de azalacağı bildirilmiştir. Bu çalışmada besiortamında yüksek sayılarda canlı hücre bulunmasının, kolesterolün daha etkili bir şekilde uzaklaştırılmasına yol açtığı belirlenmiştir [92]. Bizim çalışmamızda da tespit edildiği gibi kolesterol konsantrasyonu %0,1'den %0,3'e doğru yükseldikçe suşların kolesterol giderimi kapasitelerinde meydana gelen azalmanın ortamdaki canlı hücre yoğunluğunun da azalmasından kaynaklandığı öne sürülebilir. Bununla birlikte suşların kolesterol giderimi kapasitelerinin tüm safra konsantrasyonlarında safra içermeyen besiortamından daha yüksek oluşunun safranin yağlar üzerindeki çözücü etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda suşların kolesterol giderimi kabiliyetleri arasında farklılıklar olduğu tespit edilmiş, genel olarak yüksek EPS üretimine sahip olan B3, G11 ve ATCC 11842 suşlarının, düşük EPS üretimine sahip olan B2 ve A13 suşlarından daha fazla kolesterolü uzaklaştırdığı görülmüştür. Aynı zamanda suşlar tarafından besiortamından uzaklaştırılan kolesterolün büyük bir kısmı hücrelerden geri kazanılabilmektedir (Bkz. Çizelge 4.4). 19 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda hücre pelletlerinden geri kazanılamayan az miktardaki kolesterolün hücreler tarafından metabolize edildiği ya da tamamen hücre membranlarının yapısına dahil olduğundan tespit edilemediği düşünülmektedir.

% 0,1 oranında safra içeren besiortamında 19 saatlik (%34) ve 48 saatlik (%40) inkübasyon sürelerinin sonunda en yüksek kolesterol giderimini gerçekleştiren B3 suşunun EPS üretiminin de yüksek olması (211 mg/L) dikkat çekicidir. İkinci derecede yüksek EPS üretimine sahip (200 mg/L) ATCC 11842 suşu da B3 suşundan sonra en yüksek kolesterol giderimine sahip ikinci suş olarak tespit edilmiştir. Suşların EPS üretim kapasiteleri ile kolesterol giderimi arasındaki ilişki istatistiksel olarak da belirlenmiştir (48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda tüm suşlar için %0,0; %0,1; %0,2 ve %0,3'lük safra konsantrasyonlarındaki EPS üretimi-Kolesterol giderimi ilişkisinin "r" değerleri sırasıyla 0,87; 0,79; 0,73 ve 0,75 olarak tespit edilmiştir). Elde edilen bu sonuçlar ışığında bakteriler tarafından üretilen EPS ile kolesterolün bir etkileşime girerek, EPS'nin lifli gıdalara benzer bir etki göstermek suretiyle besiortamındaki kolesterolü bakteri hücrelerine bağlamış olabileceğini düşünmekteyiz.

Nakajima H. ve arkadaşları (1992) tarafından EPS üreten laktik asit bakterileri ile fermente edilmiş sütün kolesterol düşürücü etkisini belirlemek üzere bir çalışma yapılmıştır. Bu şekilde fermente edilmiş süt tüketiminin, kobaylardaki serum kolesterol seviyelerini belirgin bir şekilde düşürdüğü tespit edilmiştir. Oysa EPS üretmeyen suş ile fermente edilmiş sütün tüketiminin ise kobayların kolesterol seviyelerini düşürmediği belirlenmiştir.

Araştırmacılar tarafından bakteriyel ekzopolisakkaritlerin kolesterolü bağlayabilme özelliğine sahip lifli gıdalara benzer bir etki göstererek kolesterolün bağırsaklardan emilimine engel olduğu ve böylece serum kolesterol seviyelerinin düşmesini sağladığı öne sürülmüştür [66].

Yapılan başka bir çalışmada da kolesterolün ince bağırsakta gelişmekte olan laktobasillerin hücrelerinin yapısına katılması ya da hücrelere bağlanması durumunda kolesterolün bağırsaklardan emilmesinin mümkün olmayacağı ve bu suretle kana karışmasının engellenmiş olacağı bildirilmiştir [61].

Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da yüksek EPS üretimine sahip olan suşların, düşük EPS üretimine sahip olan suşlardan daha fazla kolesterolü uzaklaştırdığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda besiortamından eksilen kolesterolün büyük bir kısmının herhangi bir değişikliğe uğramaksızın hücre pelletlerinden geri kazanılabildiği de saptanmıştır. Elde edilen tüm bu veriler doğrultusunda besiortamından kolesterol gideriminin bakteriler tarafından üretilen ve hücre duvarına bağlı olarak bulunan ekzopolisakkaritler ile besiortamındaki kolesterol arasında gerçekleşen bir etkileşimden kaynaklanmış olabileceği öne sürülebilir.

Çalışmamızda kolesterol giderimi kapasiteleri bakımından test edilen B3, G11, ATCC 11842 ve A13 suşları tarafından maksimum kolesterol gideriminin ilk 19 saatlik inkübasyon süresi içerisinde gerçekleştiği bununla birlikte 19. saatten sonra da bir miktar kolesterol gideriminin meydana geldiği belirlenmiştir. B2 suşu için ise durumun biraz daha farklı olduğu görülmüştür. B2 suşu tarafından da besiortamında bulunan kolesterolün büyük bir kısmı ilk 19 saatlik inkübasyon süresi içerisinde besiortamından uzaklaştırılmıştır. Bununla birlikte 19. saatten sonra %0,0 ve %0,3'lük safra konsantrasyonlarında bir miktar kolesterol giderimi gerçekleşmiş ancak %0,1 ve %0,2'lik safra içeren besiortamındaki kolesterol miktarında 19. saatten sonra belirgin bir değişiklik olmamıştır (Bkz. Çizelge 4.4). Kolesterol gideriminin büyük oranda ilk 19 saatlik süre içerisinde gerçekleşmesinin

bakterilerin logaritmik fazda olmasından kaynaklandığı; bunu takip eden süre içerisinde bakteriler durgun faza geçiş yaptıklarından yavaşlayan metabolik faaliyetlere bağlı olarak kolesterol giderimi kapasitelerinin de azalmış olabileceği düşünülmektedir.

Brashears ve arkadaşları (1998) tarafından yapılan benzer bir çalışmada test edilen tüm *L. casei* kültürleri tarafından maksimum kolesterol gideriminin 20 saatlik inkübasyon süresinin sonunda gerçekleştiği belirlenmiştir [61].

Gilliland ve Walker (1989) adlı araştırmacıların yaptığı bir çalışmada ise kolesterol asimilasyonu yetenekleri bakımından test edilen tüm *L. acidophilus* suşları tarafından maksimum kolesterol asimilasyonunun 16 saatlik inkübasyonun erken saatlerinde gerçekleşmiş olabileceği ileri sürülmüştür [97].

Yapmış olduğumuz çalışmadan elde edilen sonuçlar ışığında bakterilerin kolesterol giderimi kabiliyetlerinin büyük oranda gelişimlerine bağlı olduğu ve kolesterol gideriminin temel olarak metabolik faaliyetlerin en hızlı olduğu logaritmik fazda gerçekleştiği ileri sürülebilir. Ancak çalışmamızda test ettiğimiz suşlar tarafından maksimum kolesterol gideriminin 48 saatlik (durgun faz) inkübasyon süresinin sonunda meydana geldiği saptanmıştır.

Gelişmekte olan, dinlenme halindeki ve cansız hücreler tarafından kolesterol giderimini belirlemek üzere yapılan çalışmamızın sonucunda tüm suşlar için gelişme sırasında uzaklaştırılan kolesterol miktarının dinlenme halindeki ve cansız hücreler tarafından besiyortamından uzaklaştırılan miktardan daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra cansız hücrelerin dahi besiyortamındaki kolesterolü belirli bir oranda azaltabildiği saptanmıştır (Bkz. Şekil 4.1). %0,3 oranında safra ve 100 µg/mL oranında kolesterol içeren ortamda 19 saat inkübasyonun sonunda en yüksek kolesterol giderimi geliştirmekte olan (%23), dinleme halindeki (%14) ve cansız (%10) B3 suşu hücreleri tarafından; en düşük kolesterol giderimi ise geliştirmekte olan (%9),

dinleme halindeki (%4) ve cansız (%3) A13 suşu hücreleri tarafından gerçekleştirilmiştir.

Liong ve Shah adlı araştırmalar tarafından 2005 yılında gelişmekte olan, cansız ve dinlenme halindeki *Lactobacillus* suşlarının kolesterol giderimi yeteneklerini belirlemek için yapılan benzer bir çalışmanın sonucunda ölü hücreler ile dinlenme halindeki hücrelerin kolesterol giderimi kapasiteleri arasında belirgin bir fark görülmemekle birlikte ($P < 0,05$), genel olarak fosfat tamponunda (pH 6,8) dinlenmekte olan hücrelerin ölü hücrelere kıyasla daha fazla kolesterolü uzaklaştırabildiği tespit edilmiştir. Araştırmacılar tarafından ölü ve dinlenme halindeki hücrelerin bulunduğu ortamdaki kolesterolün bakteri hücrelerine bağlanmak suretiyle besiortamından uzaklaştırılmış olabileceği ileri sürülmüştür. Gelişmekte olan hücreler tarafından çok daha fazla miktarda kolesterolün uzaklaştırılmış olması ise hücrelerin gelişimi ile kolesterolü bağlama yetenekleri arasında kuvvetli bir ilişkinin olması ile açıklanmıştır [95].

Çalışmamızda elde edilen sonuçlara dayanılarak kolesterol gideriminin temel olarak gelişmekte olan hücreler tarafından gerçekleştirildiği belirlenmiştir. Bu durum bakterilerin kolesterol giderimi kapasitesinin hücrelerin gelişimi ile alakalı olmasıyla açıklanabilir. Ancak çalışmamızda elde edilen sonuçlar ölü hücrelerin dahi bir miktar kolesterolü besiortamından uzaklaştırabildiğini ortaya koymuştur. Yapılan benzer bir çalışmada ölü hücreler tarafından gerçekleştirilen kolesterol gideriminin besiortamındaki kolesterolün hücrelere bağlanmış olmasından kaynaklanıyor olabileceği ileri sürülmüştür [6]. Ayrıca ölü hücrelerin de kolesterol giderimi kabiliyetine sahip olmasından dolayı canlılığını kaybetmiş hücrelerin dahi sindirim kanalındaki kolesterol konsantrasyonunu azaltma potansiyelinin bulunduğu öne sürülebilir.

Probiyotiklerin insan sağlığı üzerine olumlu etkileri hemen hemen tüm araştırmacılar tarafından kabul edilmektedir. Fakat bu bakterilerin olumlu etkileri, etkin oldukları alan olan bağırsağa, canlı ve belirli bir sayının

üzerinde ulaşmaları ile mümkün olmaktadır. Uluslararası Sütçülük Federasyonu bakterinin olumlu etkilerinin gözlenebilmesi için alınan probiyotik bakterinin canlı olması ve en az 10^7 cfu/g miktarında olması gerektiğini bildirmişlerdir. Bununla beraber yapılan çalışmalar probiyotik ürünlerin istenilen miktarda ve canlı mikroorganizma içermediğini göstermiştir. Araştırmacılar sonuçta bakterilerin olumsuz çevre şartları altında canlılığının korunması için farklı metotlar kullanmaya başlamışlardır. Tutuklama metotları da bu bağlamda kullanılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir [80, 100].

Tutuklama çalışmasında kullanılmak üzere farklı safra konsantrasyonlarında gelişme ve kolesterol giderimi kapasitesi bakımından test edilen ve farklı oranlarda EPS üretimine sahip 5 suş arasından yüksek oranda EPS üretimine sahip, safraya karşı dirençli ve kolesterol gideriminde etkili olan B3 suşu seçilmiştir. Tutuklama işleminde polimer olarak alginat kullanılmıştır. Ucuzluğu, kullanım kolaylığı, doğal elde edilişi, asidik ortamlara dirençliliği ve canlı için toksik olmaması nedeniyle bu madde birçok araştırmacı tarafından tercih edilmiştir [78, 80].

Çalışmamızda tutuklanmış ve serbest B3 suşu hücreleri tarafından kolesterol giderimi oranlarının farklı olduğu tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.5). Elde edilen sonuçlara göre tutuklanmış hücrelerin serbest hücrelere kıyasla kolesterol gideriminde daha etkili olduğu belirlenmiştir. Serbest hücrelere kıyasla tutuklanmış hücreler tarafından daha fazla kolesterolün alınmış olması tutuklama materyali olarak kullandığımız kalsiyum alginat ile kolesterol arasında meydana gelen bir etkileşimle ilişkilendirilebilir. Diğer bir ifade ile besiyortamındaki kolesterolün tutuklama materyali olarak kullanılan kalsiyum alginata bağlanmış olabileceği öne sürülebilir.

Jones ve arkadaşları (2004) tarafından genetik olarak modifiye edilmiş ve tutuklanmış *L. plantarum* 80 (pCBH1) suşunun safra tuzu dekonjugasyonu aktivitesi ile kolesterol giderimi kabiliyetini belirlemek üzere bir çalışma

yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda tutuklanmış hücrelerin safra tuzlarını etkili bir şekilde dekonjuge edebildiği tespit edilmiş ve bu özelliğine dayanılarak *L. plantarum* 80 (pCBH1) suşunun safra tuzlarının dekonjugasyonu mekanizması ile kolesterol düşürme potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir [62].

Literatürde besiyortamında mevcut olan kolesterolün tutuklanmış hücreler tarafından doğrudan gideriminin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Yapmış olduğumuz çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar probiyotik özelliğe sahip ve kolesterol giderimi bakımından etkili suşların tutuklanarak kullanılmasının suşların kolesterol giderimi yeteneklerini olumlu yönde etkilediğini ortaya koymuştur. Bu sebeple yapmış olduğumuz bu çalışmanın bu alanda orijinal olduğunu düşünmekteyiz.

B3 suşunun tutuklanmış hücrelerinin %0,3'lük safra konsantrasyonuna serbest hücrelere göre daha dirençli olduğu gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.6). Bu konu ile ilgili yapılan bir çalışmada safra tuzlarına karşı tutuklanmış hücrelerin daha dirençli olduğu saptanmıştır. Hatta tutuklanmamış hücrelerde canlılık kaybının, tutuklanmış hücrelerdeki kayıptan 2 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir [100].

Tutuklama çalışmamızın sonucunda tutuklama işleminin kolesterol giderimi potansiyeline sahip olan suşların kolesterol giderimi kapasitelerini olumlu yönde etkilediği ve tutuklanmış kültürlerdeki canlı mikroorganizma sayısının serbest hücrelere kıyasla daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu sebeple probiyotik mikroorganizmaların canlılıklarını korumaları ve probiyotik fonksiyonlarını etkili bir şekilde gerçekleştirebilmeleri için tutuklama işleminin güvenli bir yöntem olduğu ileri sürülebilir.

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritler fermente ürünün daha kıvamlı ve yumuşak olmasını sağlar. Probiyotik özellik olarak EPS'nin; bakteriyi sıvı kaybına, makrofajlara, fagositoza, bakteriyofajlara, antibiyotik ve

toksik bileşiklere karşı koruduğu, ayrıca metal iyonlarının hücreye alımında görevli olduğu bilinmektedir. EPS'nin diğer bir önemli özelliği ise bakterinin yüzey tutunmasında yapıştırıcı (slime) işleve sahip olması ile bulunduğu ortama tutunma ve biyofilm oluşturmada etkili olmasıdır. Bütün bu özellikler, EPS üreten bakteriye bulunduğu ortamda stabil olarak kalabilme ve dominant olarak kolonize olma özelliği sağlamaktadır. Ayrıca EPS'lerin immün sistemi teşvik ettiği antitümoral ve kolesterol düşürücü etkiye sahip olduğu da saptanmıştır [101].

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar kolesterol içeren besiortamında geliştirilen suşlar ile kolesterol içermeyen kontrol besiortamında geliştirilen suşlar tarafından üretilen EPS miktarları arasında belirgin bir fark ($r=0,99$) tespit edilmemiştir (Bkz. Çizelge 4.7). Ancak kolesterolü besiortamında inkübe edilen suşların kolesterol içermeyen besiortamında geliştirilen suşlardan daha çok miktarda EPS ürettiği belirlenmiştir. Başka bir ifade ile kolesterolün EPS üretimini stimüle ettiği saptanmıştır.

Literatürde kolesterolün EPS üretimi üzerine etkisinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu sebeple yapmış olduğumuz bu çalışmanın bu alanda orijinal olduğunu düşünmekteyiz.

Karaciğerde kolesterolden sentezlenen safra asitleri, glisin ya da taurin amino asitlerine bağlanarak (amino asitler ile konjuge olarak) safra tuzlarını meydana getirirler. Karaciğerden ince bağırsağa konjuge formda salgılanan safra tuzları ise diyetle alınan yağların, kolesterolün, suda çözünen vitaminler ile yağda çözünen diğer maddelerin bağırsaklardan emilimine yardım eder ve bu görevlerini tamamladıktan sonra bağırsaklardan geri emilerek enterohepatik dolaşım ile karaciğere geri dönerler [69]. Safra tuzu hidrolaz enzimi (BSH), gastrointestinal kanalda yaşayan *Lactobacillus* spp., *B. longum*, *Clostridium perfringens* ve *Bacteriodes fragilis* subsp. *fragilis* gibi çeşitli bakteri türlerinde bulunan ve safra tuzlarının (glisin ya da taurin amino

asitleri ile konjuge olmuş safra asitlerinin) amino asit kökü ile safra asidine hidroliz olmasını (dekonjugasyonunu) katalizleyen bir enzimdir [69, 70]. Bu enzim memelilerdeki normal safra tuzu metabolizmasının bir parçası olarak görev yapar ve serum kolesterol seviyelerinin kontrolü bakımından önem taşır [70, 102].

BSH enziminin aktivitesi ile dekonjuge olmuş safra tuzları ince bağırsaklardan kolesterolün ve diğer lipidlerin emiliminde konjuge safra tuzları kadar iyi fonksiyon gösteremezler. Böylece bağırsaklardan emilemeyen kolesterol ve diğer yağlar kana karışmak yerine feçes ile atılır. Bunun yanı sıra dekonjugasyon neticesinde açığa çıkan serbest safra asitleri de geri emilemez ve feçes ile vücuttan uzaklaştırılırlar. Vücuttan atılan safra asitlerinin yerine kolesterolden yeni safra asitlerinin sentezlenmesi gerekir. Böylece vücuttan ne kadar fazla safra asidi atılırsa, eksilen safra asitlerinin yerine yenilerini sentezlemek için vücuttaki kolesterol havuzundan o kadar fazla kolesterol eksilir ve dolaylı olarak serum kolesterol seviyeleri düşer [61, 69].

Son yıllarda yüksek kolesterol değerlerine sahip kişilerin serum kolesterol seviyelerinin düşürülmesi ya da serum kolesterol değerleri normal olan kişilerde yüksek kolesterolün önlenmesi için laktik asit bakterilerinde bulunan safra tuzu dekonjugasyonu yeteneğinin kullanılması üzerine yapılan araştırmaların sayısında artış meydana gelmiştir [70].

Çalışmamızda kullandığımız suşların taurokolik asit (TCA) isimli safra tuzu üzerindeki dekonjugasyon etkileri araştırılmıştır. Çalışmada test edilen tüm suşların belirli bir oranda safra tuzu dekonjugasyonu aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.8).

Tanaka ve arkadaşları (1999) tarafından farklı kaynaklardan izole edilen laktik asit bakterilerinin BSH aktivitelerini belirlemek üzere yapılan bir çalışmanın sonucunda feçes ya da bağırsak kökenli bakterilerin %59'unun,

diğer kaynaklardan izole edilen bakterilerin ise %27'sinin BSH aktivitesi sergiledikleri tespit edilmiştir. Bu sonuçlara dayanılarak laktik asit bakterilerinin sahip oldukları BSH aktivitesinin bakterinin doğal habitatı ile doğrudan ilişkili olduğu öne sürülmüştür [70].

Çalışmamızda kullanılan suşlar yoğurt kökenli olmalarına rağmen tamamının %15,0 ile %35,5 arasında değişen oranlarda BSH aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Chikai ve arkadaşları (1987) tarafından yapılan bir çalışmada çeşitli bakteri türlerinin safra tuzu dekonjugasyon kabiliyetleri araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda safra tuzu dekonjugasyonunda meydana gelen artışın safra asidi atılımını da artırdığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda dekonjugasyondan açığa çıkan serbest safra asitlerinin lifli gıdalara yapıştığı gibi bakterilere yapışmasının yüksek miktarlarda safra asidi atılımına yol açacağı ileri sürülmüştür [103].

Çalışmamızda safra dekonjugasyonu yetenekleri bakımından test edilen suşların tamamı belirli miktarlarda EPS üretme kapasitesine sahip olan suşlardır. En yüksek dekonjugasyon aktivitesi %35,5 ve %34,5 değerleri ile sırasıyla ATCC 11842 ve B3 suşlarında saptanmıştır. Bu suşların aynı zamanda hem yüksek EPS üretimine sahip hem de kolesterol gideriminde etkili olduğu da belirlenmiştir. Suşlarımızın sahip olduğu dekonjugasyon aktivitesi sonucunda açığa çıkan serbest safra asitleri yine bu suşlar tarafından üretilen EPS'ye bağlanarak feçes ile vücuttan atılabilir. Böylece dolaylı olarak vücuttaki kolesterol havuzundaki kolesterol miktarında bir azalmanın meydana geleceği düşünülmektedir.

Çalışmamızın sonucunda safra toleransı ile kolesterol giderimi; safra toleransı ile safra tuzu dekonjugasyonu ve son olarak kolesterol giderimi ile safra tuzu dekonjugasyonu arasında belirgin bir ilişki tespit edilmemiştir. Örneğin, nispeten yüksek EPS üretimine fakat oldukça düşük bir safra

toleransına sahip olan G11 suşunun kolesterol giderimi kapasitesinin, G11 suşundan daha düşük EPS üretimine ve daha yüksek safra toleransına sahip olan B2 suşundan daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu iki suşun safra dekonjugasyonu aktivitelerinin ise birbirine yakın değerlerde olduğu saptanmıştır. Bununla beraber yüksek oranda EPS üretimine sahip olan ve yüksek safra toleransı gösteren B3 suşunun hem kolesterol giderimi ve safra tuzu dekonjugasyonu kapasitelerinin her ikisinin de yüksek olduğu belirlenmiştir.

L. acidophilus suşlarının safra toleransı, safra tuzu dekonjugasyonu ve kolesterol asimilasyonu özellikleri arasındaki ilişkiyi belirlemek üzere yapılan bir çalışmada genel olarak kolesterolü asimile edebilen suşların aynı zamanda dekonjugasyon aktivitesi gösterdikleri ve safraya karşı toleranslı oldukları belirlenmiştir. Ancak safra toleransı ile kolesterol asimilasyonu, safra toleransı ile safra tuzu dekonjugasyonu, ve kolesterol asimilasyonu ile safra tuzu dekonjugasyonu arasında belirgin bir korelasyon tespit edilmediği bildirilmiştir [72]. Bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlar ışığında da test edilen her bir özelliğin suşa özgü ve birbirinden bağımsız nitelikler olduğu öne sürülebilir.

Yoğurt kökenli laktik asit bakterilerinin kolesterol giderimi ve safra dekonjugasyonu etkilerinin araştırıldığı bir kaynağa dünya literatüründe rastlanmamıştır. Kolesterolün bakterilerin hücre duvarına bağlanarak giderimi ya da safra tuzu dekonjugasyonu mekanizmalarından her ikisi de insanlardaki serum kolesterol konsantrasyonlarının kontrol altında tutulmasında potansiyel olarak önem arz etmektedir.

Sonuç olarak, yapmış olduğumuz çalışmada kolesterol giderimi ve safra tuzu dekonjugasyonu özellikleri bakımından test edilen ve probiyotik olarak kullanılabilecek yoğurt kökenli 5 adet *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşunun hepsinin belirli oranlarda kolesterol giderimi ve safra tuzu dekonjugasyonu yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte bu 5

suş arasında B3 suşunun yüksek oranda EPS üretimi, safra toleransı, kolesterol giderimi kapasitesi ve BSH aktivitesi bakımından üstün özellikler sergilediği tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra bu suşun tutuklama sonrası kolesterol giderimi özelliğini koruduğu ayrıca tutuklamadan dolayı safraya karşı direncinin de arttığı gözlenmiştir. Bütün bu avantajlara ve elde ettiğimiz sonuçlarımıza göre, probiyotik veya starter olarak kullanılacak kültürlerin tutuklanmış olarak kullanılmasını önerebiliriz. Ayrıca tüm bu özelliklerinden dolayı B3 suşunun tek başına ya da kolesterol giderimi yeteneğine sahip olan ve safra tuzlarını dekonjuge edebilen probiyotik bir kültür ile yüksek oranlarda EPS üretebilen suşların kombine edilerek zengin kolesterol düşürücü aktiviteye sahip kaliteli, sağlığa faydalı ve stabil bir fermente süt ürününün üretiminde kullanılabileceğini önermekteyiz.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bu sonuçların daha sonraki probiyotik çalışmalarına ışık tutacağını, aynı zamanda, bu özelliğe sahip probiyotik kültürlerin tıp alanındaki klinik uygulamalarda da kullanıma sunulabileceğini düşünmekteyiz

KAYNAKLAR

1. Yılsay, T.Ö. ve Kurdal, E., "Probiyotik süt ürünlerinin beslenme ve sağlık üzerindeki etkisi", **VI. Süt ve Süt rnleri Sempozyumu (Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri)**, Tekirdağ, 279-294 (2000).
2. Beasley, S., "Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota", **University of Helsinki**, Helsinki, 6-9, (2004).
3. Fooks L. J., Fuller R. and Gibson G. R., "Prebiotics, Probiotics and human gut microbiology", **International Dairy Journal**, 9:53-61 (1999).
4. akır, İ. ve akmakı, M.L., "Probiyotikler: Tanımı, Etki Mekanizması, Seçim ve Güvenilirlik Kriterleri", **Gıda**, 29 (6): 427-434 (2004).
5. Bke, H., "*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türüne ait suşların bazı probiyotik özelliklerinin belirlenmesi ve tutuklamanın bu özellikler üzerine etkisi", Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 4-52 (2005).
6. Kimoto, H., Ohmomo, S. and Okamoto, T., "Cholesterol Removal from Media by Lactococci", **J. Dairy Sci.**, 85:3182-3188 (2002).
7. Mann, G. V. and A. Spoerry, "Studies of a surfactant cholesteremia in the Massai", **Am. J. Clin. Nutr.**, 27: 464-469 (1974).
8. Pigeon , R.M., Cuesta , E.P. and Gilliland, S.E., "Binding of Free Bile Acids by Cells of Yogurt Starter Culture Bacteria", **J. Dairy Sci.**, 85: 2705-2710 (2002).
9. Pereira, D.I.A., and Gibson, G.R., "Effects of Consumption of Probiotics and Prebiotics on Serum Lipid Levels in Humans", **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, 37 (4): 259-281 (2002).
10. Sanders, M.E., "Considerations for Use of Probiotic Bacteria to Modulate Human Health", **J. Nutr.**, 130:384S-380S (2000).
11. Luckey, T. D., "Bicentennial overview of intestinal microecology", **Am. J. Clin. Nutr.**, 30: 1753 (1977).
12. Savage, D. C., "Microbial ecology of the gastrointestinal tract", **Annu. Rev. Microbiol.**, 31: 107 (1977).
13. Salminen, S., Isolauri, E. and Onnela, T., "Gut microflora in health and disease", **Chemotherapy**, 41: 5-15 (1995).

14. Yetişmeyen, A., "Süt Teknolojisi, 1214", **A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları**, Ankara, 229 (1995).
15. Arda, M., "Genel Bakteriyoloji", **A.Ü. Vet. Fak. Yay.**, No: 402, Ankara, 250-256 (1985).
16. Tekinşen, O.C., Atasever, M., "Süt ürünleri üretiminde starter kültür, 150", **Selçuk Ü. Vet. Fak. Yayınları**, Konya, 18-80 (1994).
17. Tunail, N., Köşker, Ö., "Süt Mikrobiyolojisi, 1116", **A. Ü. Ziraat Fak. Yayınları**, Ankara, 113 (1989).
18. Naidu, A. S., Bidlack, W. R. and Clemens, R. A., "Probiotic Spectra of Lactic Acid Bacteria", **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 38 (1): 13-126 (1999).
19. Yaygın, H., "Yoğurt yapımında saf kültür kullanımı ve önemi", **III. Milli Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu**, İstanbul, 83-87 (1995).
20. İnternet: Utah State University "Microscopy"
<http://bioweb.usu.edu/microscopy/lactobacillus%20bulgaricus.jpg> (2005).
21. Soomro, A. H., Masud, T. and Anwaar K., "Role of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Food Preservation and Human Health", **Pakistan Journal of Nucrition**, 1 (1): 20-24 (2002).
22. Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J. and Zoon, P., "An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria", **International Dairy Journal**, 12: 163-171 (2002).
23. Bouzar, Cerning, J. and Desmazeaud, M., "Exopolysaccharide production in milk by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CNRZ 1187 and by two colonial variants", **J. Dairy Sci.**, 79: 205-211 (1996).
24. Hosono, A., Lee, J., Amentoni, A., Natsume, M., Hirayama, M., Adachi, T. and Kaminogawa, S., "Characterization of a water-soluble polysaccharides fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis* M 101-4.", **Biosci. Biochem.**, 61: 312-316 (1997).
25. Leigh, J. A. and Walker, G.C., "Exopolysaccharides of Rhizobium: synthesis, regulation and symbiotic function", **Trends in Genetics**, 10: 63-67 (1994).
26. Whitfield, C., Amor, P.A. and Koplin, R., "Modulation of the surface architecture of gram-negative bacteria by the action of surface polymer:

- lipid A-core ligase and by determinants of polymer chain length", **Mol. Microbiol.**, 23: 629-638 (1997).
27. Sutherland, I.W., "Polysaccharases for microbial exopolysaccharides", **Carbohydrate Polymers**, 38: 319-328 (1999).
 28. Welman, A. D. and Maddox, S., "Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges", **Trends in Biotechnology**, 21 (6): 269-274 (2003).
 29. Duboc, P. and Mollet, B., "Applications of exopolysaccharides in the dairy industry", **Int. Dairy J.**, 11: 759-768 (2001).
 30. Garsse, J., Herreillers, M., Loveren, H.van., Vos, J., and Opperhuizen, A., "Immunomodulation by probiotics: a literature survey" **RIVM report 340320001, Bilthoven**, 6-33, 2003.
 31. Kimoto, H., Nomura, M., Kobayashi, M., Okamoto, T. and Ohmomo S., "Identification and Probiotic Characteristics of *Lactococcus* strains from Plant Materials", **JARQ**, 38 (2): 111-117 (2004).
 32. Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S. and Kim, H. Y., "Probiotics and their fermented food products are beneficial for health", **Journal of Applied Mic.**, 100: 1171-1185 (2006).
 33. Sanders, M.E., "Probiotics", **Food Technology**, 53 (11): 67-77 (1999).
 34. Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J. and Mattila-Sandholm, T., "Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties", **Journal of Biotechnology**, 84: 197-215 (2000).
 35. Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L. and Collins, J. K. "Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods", **Int. J. Dairy Techn.**, 51 (4): 123-135 (1998).
 36. Salminen, S., Ouwehand, A. C. and Isolauri E., "Probiotics: an overview of beneficial effects", **Antonie van Leeuwenhoek**, 82: 279-289 (2002).
 37. Mercenier, A., Pavan, S. and Pot, B., "Probiotics as Biotherapeutic Agents: Present Knowledge and Future Prospects", **Current Pharmaceutical Design**, 8: 99-110 (2002).
 38. Sillanpää, J., "Tissue-Adherence in Lactic Acid Bacteria: Identification and Characterization of the Collagen Binding S-Layer Protein of *Lactobacillus crispatus*", **University of Helsinki**, Helsinki, 7-11, (2001).

39. Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y. and Lee, K., Y., "Probiotics: How should they be defined? ", ***Trends in Food Sci. & Technol.***, 10: 107-110 (1999).
40. Helander, I.M., Von Wright, A. and Mattila-Sandholm, T.M., "Potential of lactic acid bacteria and noval antimicrobials against gram-negative bacteria", ***Trends Food Sci. Tech.***, 8: 146-150 (1997).
41. Tuomola, E.M., Ouwehand, A.C. and Salminen, S.J., "The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus", ***FEMS Immunol. Med. Mic.***, 26: 137-142 (1999).
42. Çakır, İ., "Laktobasillus ve Bifidobakterlerde bazı probiyotik özelliklerin belirlenmesi", Doktora Tezi, ***Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Ankara, 4-7 (2003).
43. Marteau, P. and Jian, R., "Probiotics and health: new facts and ideas", ***Curr. Opin. Biotech.***, 13: 486-489 (2002).
44. Lourens-Hatting, A. and Viljoen, B., "Yogurt as probiotic carrier food", ***Int. Dairy J.***, 11: 1-17 (2001).
45. Fuller, R., "Probiotics in man and animal", ***J. Appl. Bacteriol.***, 66: 365-378 (1989).
46. Sullivan, Å. and Nord, C. E., "The place of probiotics in human intestinal infections", ***Int. J. Antimicrob. Ag.***, 20: 313-319 (2002).
47. Yücesan, S., "Probiyotikler ve sağlık üzerine etkileri", ***Türk Diyetisyenler Derneği Bülteni***, 2: 1-13 (2002).
48. Önal, D., "Bazı laktik asit bakterilerinin probiyotik özelliklerinin araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, ***Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Ankara, 7-9 (2005).
49. Hofvendahl, K., Hahn-Hägerdal, B., "Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources", ***Enzyme Microbiol. Technol.***, 26: 87-107 (2000).
50. Lim, H., Kim, S. and Lee, W., "Isolation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use", ***J. Vet. Sci.***, 5 (4): 391-395 (2004).
51. Ma, H., "Concept and Protocol to Isolate Cholesterol-reducing bacteria from Carnivores", ***Nature end Science***, 2 (4): 11-17 (2004).

52. Roos , N. M. and Katan, M.B. "Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism , and carcinogenesis:a review of papers published between 1988 and 1998", **Am. J . Clin . Nutr.**, 71: 405-11 (2000).
53. Jackson , K. G. and Lovergrove, J. A., "Functional foods, blood lipids and coronary heart disease", **Food Science and Technology Bulletin:Functional Foods**,1 (1): 1-11 (2002).
54. İnternet: Iowa State University "Publications"
<http://www.extension.iastate.edu/Publications/NCR332.pdf> (1996).
55. Champe, P. C. and Harvey, R. A., "Biyokimya", Tokullugil, A., Dirican, M. and Ulukaya, E., **Nobel Tıp Kitabevi**, İstanbul, (1997).
56. İnternet: Iowa State University "Cholesterol"
<http://www.public.iastate.edu/~cford/101cholesterol.gif>
57. Lee, D., "Essential Fatty Acids", **Woodland Publishing, Inc.**, Pleasant Grove, UT, 8-9 (1997).
58. İnternet: Indiana State University "Cholesterol and Bile Metabolism"
<http://web.indstate.edu/thcme/mwking/cholesterol.html> (2006).
59. İnternet: The University of Chicago Medical Center "Images"
http://www.uchospitals.edu/images/gs/es_1807.gif (2007).
60. İnternet: Colorado State University "Hypertexts for Biomedical Sciences"
<http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/liver/bile.html> (2001).
61. Brashears, M. M., Gilliland, S. E. and Buck, L. M., "Bile Salt Deconjugation and Cholesterol Removal from Media by *Lactobacillus casei*", **Journal of Dairy Science**, 81 (8): 2103-2110 (1998).
62. Jones, M. L., Chen, H., Ouyang, W., Metz, T. and Prakash, S., "Microencapsulated Genetically Engineered *Lactobacillus plantarum* 80 (pCBH1) for Bile Acid Deconjugation and Its Implication in Lowering Cholesterol", **Journal of Biomedicine and Biotechnology**,2004 (1): 61-69 (2004).
63. Gilliland, S. E., Nelson, C. R. and Maxwell, C., "Assimilation of Cholesterol by *Lacobacillus acidophilus*", **Applied and Environmental Microbiology**, 49 (2): 377-381 (1985).
64. Noh, D. O., Kim, S. H. and Gilliland, S. E., "Incorporation of Cholesterol into the Cellular Membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121", **Journal of Dairy Science**, 80: 3107-3113 (1997).

65. Usman, and Hosono, A., "Bile Tolerance , Taurocholate Deconjugation, and Binding of Cholesterol by *Lactobacillus gasseri* Strains", **J. Dairy Sci.**, 82: 243-248 (1999).
66. Nakajima, H., Suzuki, Y. and Hirota, T., "Cholesterol Lowering Activity of Ropy Fermented Milk", **Journal of Food Science**, 57 (6): 1327-1329 (1992).
67. Somkuti, G. A. and Johnson, T. L., "Cholesterol Uptake by *Propionibacterium freudenreichii*", **Current Microbiology**, 20: 5463 (1999).
68. Internet: Michigan State University "Cholesterol and Human Health" <http://www.msu.edu/user/hongbao/research/cholest.htm> (2002).
69. Corzo, G. and Gilliland, S. E. "Bile Salt Hydrolase Activity of Three Strains of *Lactobacillus acidophilus*", **J. Dairy Sci.**, 82: 472-480 (1999).
70. Tanaka, H., Doesburg, K., Wasaki, T. and Mierau, I., "Screening of Lactic Acid Bacteria for Bile Salt Hydrolase Activity", **J. Dairy Sci.**, 82: 2530-2535 (1999).
71. Ahn, Y. T., Kim, G. B., Lim, K. S., Baek, Y. J. and Kim, H. U., "Deconjugation of bile salts by *Lactobacillus acidophilus* isolates", **Int. Dairy J.**, 13: 303-311 (2003).
72. Walker, D. K. and Gilliland, S. E. "Relationships Among Bile Tolerance, Bile Salt Deconjugation, and Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*", **J. Dairy Sci.**, 76: 956-961 (1993).
73. Klaver, F. A. M. and van der Meer, R., "The Assumed Assimilation of Cholesterol by Lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* Is Due to Their Bile Salt-Deconjugating Activity", **Applied and Environmental Microbiology**, 59 (4): 1120-1124 (1993).
74. Tahri, K., Crociani, J., Ballongue, J. and Schneider, F., "Effects of three strains of bifidobacteria on cholesterol", **Lett. Appl. Microbiol.**, 21: 149-151 (1995).
75. Demirel, G., "Tutuklanmış *Aspergillus niger* kullanılarak sitrik asit üretimi ve sitrik asit üretimi üzerine çeşitli etkilerin incelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 19-29 (2003).
76. Telefoncu, A., "Enzim immobilizasyonu, Enzimoloji", Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, **Ege Üniversitesi Basımevi**, İzmir, 193-248 (1999).

77. Dingil, N., "Serbest ve immobilize *Aspergillus niger*'in ürettiği sitrik asit veriminin oksijen taşıyıcılar kullanılarak artırılması", Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 9-15 (2002).
78. Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H., " Evaluatin of encapsulation techniques of probiyotics for yoghurt", **Int. Dairy J.**, 33: 3-13 (2003).
79. Sheu, T.Y., Marshall, R.T., Microencapsulation of Lactobacilli in calcium alginate gels. **J. Dairy Sci**, 54: 557-561 (1993).
80. Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P. and Kailasapathy, K., " Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-strach and evaluation of survival in simulated gasrtointestinal conditions and in yoghurt" **Int. J. Food Microbiol.**, 62: 47-55 (2000).
81. Man, J.C., Ragosa, M., Sharpe, M. E., "A medium for the cultivation of *Lactobacill*", **J. Appl. Bact.**, 23: 130-138 (1960).
82. Ronald, M., Lawrence, A. and Park, C., "Handbook of Microbiology, 2th Edition", **CRC Press**, New York, 966-1573 (1997).
83. Çetin, E. T., "Endüstriyel Mikrobiyoloji", **İ. Tıp. Fak. Vakfı Yayınları**, İstanbul, 418 (1983).
84. Rudel, L. L. and Morris, M. D., "Determination of cholesterol using α -phthalaldehyde", **J. Lipid Res.**, 14: 364-366 (1973).
85. Göksungur, Y., Güvenç, U., " Production of lactic acid from beet molasses by calcium alginate immobilized *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202", **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 74:131-136 (1999).
86. Champagne, P.C., "Effect of pencillin on free or immobilized Lactococci: Milk acidification and residual antibiotic level", **J. Food Safety**, 12: 327-339 (1992).
87. Valerie, M. M., Rawson, H. L., "Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt", **Int. J. Food Sci. Tec.**, 34: 137-143 (1999).
88. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F., "Colorimetric method for determination of sugars and related substances", **Anal. Chem.**, 28 (3): 350-352 (1956).
89. Irvin, J. L., Jhonson, G. C. and Kopalo, J., "A photometric method of the determination of cholates in bile and blood", **J. Biol. Chem.**, 153: 439-457 (1944).

90. Mishra, V. and Prasad, D. N., "Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics", ***International Journal of Food Microbiology***, 103: 109-115 (2005).
91. Begley, M., Hill, C. and Gahan, C. G. M., "Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics", ***Applied and Environmental Microbiology***, 72 (3): 1729-1738 (2006).
92. Lin, S. Y., Ayres, J. W., Winkler, W. and Sandine, W. E., "*Lactobacillus* Effects on Cholesterol: In Vitro and In Vivo Results", ***J. Dairy Sci.***, 72: 2885-2899 (1988).
93. Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Sorrentino, E., Grazzia, L., Pacifico, S. and Coppola, R., "Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese", ***FEMS Microbiology Letters***, 244: 129-137 (2005).
94. Erkkilä, S. and Petäjä, E., "Screening of comerial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use", ***Meat Science***, 55: 297-300 (2000).
95. Lionng, M. T. and Shah, N. P., "Acid and Bile Tolerance and Cholesterol Removal ability of Lactobacilli Strains", ***J. Dairy Sci.***, 88: 55-66 (2005).
96. Pereira, D. I. A. and Gibson, G. R., "Cholesterol Assimilation by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Isolated from the Human Gut", ***Applied and Environmental Microbiology***, 68 (9): 4689-4693 (2002).
97. Gilliland, S. E. and Walker, D. K., "Factors to Consider When Selecting a Culture of *Lactobacillus acidophilus* as a Dietary Adjunct to Produce a Hypocholesterolemic Effect in Humans", ***J. Dairy Sci.***, 73: 905-911 (1989).
98. Gilliland, S. E. and Speck, S. E., "Enumeration and identification of Lactobacilli in dietary products", ***J. Food Prot.***, 40: 760-762 (1977).
99. Jacobsen, C. N., Rosenfeldt, N. V., Hayford, A. E., Moller, P. I., Michaeken, K. F., Paerragaard, A., Sandstrom, B., Tvede, M. and Jakobsen, M., "Screening of probiotic activities of forty seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and eveluation of colonization ağabeylity of five selected strains in human", ***Applied and Environmental Microbiology***, 65: 4949-4956 (1999).
100. Chandramouli, V., Kailasapaty, K. Peiris, P. and Jones, M., "An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect

Lactobacillus spp. in simulated gastric conditions". **J. Microbiological Methods**, 56: 27-35 (2004).

101. Looijesteijn, P.J., Trapet, L., de Vries, E., Abee, T. and Hugenholtz, J. "Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*", **Int. J. Of Food Mic.**, 64: 71-80 (2001).
102. Gilliland, S. E. and Speck, M. L., "Deconjugation of Bile Acids by Intestinal Lactobacilli", **Applied and Environmental Microbiology**, 33 (1): 15-18 (1977).
103. Chikai, T., Nakao, H. and Uchida, K., "Deconjugation of bile acids by human intestinal bacteria implanted in germ-free rats", **Lipids**, 22: 669-671 (1987).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : TOK, Esra
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 03.02.1981 İstanbul
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 0 (312) 318 57 69
 e-mail : esratok@gmail.com.

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Tezsiz Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü/ Biyoloji Öğretmenliği	2005
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Biyoloji Bölümü	2004

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2006–2007	TÜBİTAK Başkanlık	Uzman Yrd.

Yabancı Dil

İngilizce