

**PROPIYONİK ASİT BAKTERİLERİNİN ÜRETTİĞİ
METABOLİTLERLE BİFİDOBAKTERİLERİN GELİŞİMİNİ
DÜZENLEYİCİ (BGD) ETKİSİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Betül AYDIN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2011

ANKARA

Betül AYDIN tarafından hazırlanan “PROPİYONİK ASİT BAKTERİLERİNİN ÜRETTİĞİ BAZI METABOLİTLERLE BİFİDOBAKTERİLERİN GELİŞİMİNİ DÜZENLEYİCİ (BGD) ETKİSİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Belma ASLIM

.....

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

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

Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ

.....

Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Belma ASLIM

.....

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ

.....

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Tarih: 01 / 07 / 2011

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Bilal TOKLU

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

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

Betül AYDIN

**PROPIYONİK ASİT BAKTERİLERİNİN ÜRETTİĞİ BAZI
METABOLİTLERLE BİFİDOBAKTERİLERİN GELİŞİMİNİ
DÜZENLEYİCİ (BGD) ETKİSİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI
(Yüksek Lisans Tezi)**

Betül AYDIN

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Temmuz 2011**

ÖZET

Bu çalışmada, peynirden izole edilmiş propiyonik asit bakterilerine ait 31 suşun toplam asit, organik asit, ekzopolisakkarit (EPS) üretimleri, antimikrobiyal aktiviteleri, otoagregasyon ve koagregasyon yetenekleri ile bifidobakterilerin gelişimini düzenleyici (BGD) etkileri araştırılmıştır. Suşların ürettiği yüzde asit miktarının belirlenebilmesi için farklı besiyerleri kullanılmış ve en yüksek asit üretiminin skimmilk besiyerinde olduğu görülmüştür. Yüzde asit üretimi yüksek olan suşların aynı besiyerlerinde ürettikleri propiyonik, asetik ve laktik asit miktarlarına HPLC ile bakılmış ve tüm suşların her iki besiyerinde de asetik ve laktik asitten daha yüksek oranda propiyonik asit ürettikleri görülmüştür. En yüksek propiyonik asit üretimi SM besiyerinde geliştirilen *Propionibacterium thoenii* 72 suşunda gözlenmiştir ($15,50 \pm 0,15$ mg/ml). Çalışmada propiyonik asit bakterilerinin farklı besiyerlerinde ürettikleri EPS miktarlarına bakılmış ve E-YEL-G besiyerinde EPS üretiminin daha yüksek olduğu görülmüştür. Propiyonik asit bakterilerinin patojen mikroorganizmalar olan *Escherichia coli* ATCC 35218 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşlarına karşı gösterdikleri antimikrobiyal aktivite suşlar SM ve YEL-G besiyerlerinde geliştirilerek tespit edilmiştir. Buna göre suşların *E. coli* ATCC 35218 suşuna karşı gösterdikleri antimikrobiyal aktivite her iki besiyerinde de daha yüksek çıkmıştır. EPS üretimi yüksek olan suşların otoagregasyon ve *E.*

coli ATCC 35218 ile *S. aureus* ATCC 25923 suşlarıyla koagregasyon yetenekleri belirlenmiş ve *P. acidipropionici* 75 suşunun agregasyon (49 ± 4), *E. coli* ATCC 35218 ile koagregasyon (19 ± 1); *P. freudenreichii* spp. *freudenreichii* 21 ve *P. freudenreichii* spp. *freudenreichii* 31-4 suşlarının ise *S. aureus* ATCC 25923 ile koagregasyon (16 ± 5) yeteneklerinin yüksek olduğu görülmüştür. Propiyonik asit bakterilerinin asit üretimi ile antimikrobiyal aktivitesi arasında ($p < 0,01$) pozitif bir ilişki bulunmuştur. Propiyonik asit bakterilerinin probiyotik bakterilerden olan bifidobakterilerin gelişimini düzenleyici (BGD) etkisi en yüksek *P. thoenii* 72 suşunda *Bifidobacterium breve* A28 suşuna karşı tespit edilmiş ve bu aktiviteye sonikasyon, enzimler, pH ve sıcaklığın etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan suşların asit, EPS üretimi, antimikrobiyal aktivitesi, otoagregasyon, koagregasyon yetenekleri ile BGD aktiviteleri arasında anlamlı bir ilişkiye rastlanmamıştır.

Bilim Kodu : 203.1.023
Anahtar Kelimeler : Probiyonik asit bakterisi, Organik asit, Ekzopolisakkarit, Bifidobakterilerin gelişimini düzenleyici etki (BGD)
Sayfa Adedi : 89
Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Belma ASLİM

**DETERMINATION OF RELATIONSHIP BETWEEN PRODUCTION OF
SOME METABOLITES AND BIFIDOGENIC GROWTH STIMULATOR
(BGS) ACTIVITY BY PROPIONIC ACID BACTERIA
(M.Sc. Thesis)**

Betül AYDIN

**GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
July 2011**

ABSTRACT

In this study, we investigated total acid, organic acid, exopolysaccharide (EPS) production, antimicrobial activity, autoaggregation and coaggregation ability, bifidogenic growth stimulator (BGS) activities of 31 strains of propionic acid bacteria isolated from cheese. Different types of media were used for determination of per centage acid production of the strains and maximum acid production was seen in skimmilk. Propionic, acetic and lactic acid amounts of the strains which produce higher total acid were analysed by HPLC in these media and determined that propionic acid production was higher than both acetic and lactic acid. The highest propionic acid producer strain was *Propionibacterium thoenii* 72 (15.50 ± 0.15 mg/ml) in modified skimmilk. We studied EPS production of propionic acid bacteria in different media and determined EPS production in E-YEL-G was higher than other media. Antimicrobial activities of the strains against *Escherichia coli* ATCC 35218 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 which is pathogen microorganisms were determined cultivating in SM and YEL-G. According to this antimicrobial activity against *Escherichia coli* ATCC 35218 was higher than *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 in both media. Autoaggregation and coaggregation abilities with *Escherichia coli* ATCC 35218 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 of the strains which produced higher amounts of EPS were determined. When *P.*

acidipropionici 75 has high autoaggregation ability (49 ± 4) and coaggregation ability with *Escherichia coli* ATCC 35218 (19 ± 1); *P. freudenreichii* spp. *freudenreichii* 21 and *P. freudenreichii* spp. *freudenreichii* 31-4 have high coaggregation ability with *S. aureus* ATCC 25923 (16 ± 5). Positive correlation has been obtained between production of acid and antimicrobial activity ($p < 0,01$). We determined the highest bifidogenic growth stimulator (BGS) activity of propionic acid bacteria by *P. thoenii* 72 strain against *Bifidobacterium breve* A28 and no effect has been obtained from sonication, enzymes, pH or heat to BGS activity. There is not any correlations between acid, EPS production, antimicrobial activity, autoaggregation, coaggregation ability and BGS activity of strains which used for this study.

Science Code	: 203.1.023
Key Words	: Propionic acid bacteria, organic acid, Exopolysaccharide, Bifidogenic growth stimulator activity (BGS)
Page Number	: 89
Adviser	: Prof. Dr. Belma ASLIM

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli katkılarıyla ve bilgileriyle beni yönlendiren sayın hocam Prof. Dr. Belma ASLİM' a, deneysel çalışmalarım esnasında deneyimlerinden ve yardımlarından faydalandığım Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ' a, tüm Biyoteknoloji Laboratuvarı çalışanlarına ve manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan eşime ve değerli aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiv
RESİMLERİN LİSTESİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. Propiyonik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri.....	5
2.2. Klasik Propiyonik Asit Bakterilerinin Doğal Yaşam Alanları.....	8
2.3. Propiyonik Asit Bakterilerinin Metabolizmaları	10
2.3.1. Suksinat-propiyonat yolu	10
2.3.2. Karbonhidrat metabolizması	11
2.3.3. Aminoasit katabolizması.....	11
2.3.4. Fosfat metabolizması	11
2.3.5. B ₁₂ vitamini sentezi	12
2.4. Propiyonik Asit Bakterilerinin Propiyonik Asit Üretimi	12
2.5. Propiyonik Asit Bakterilerinin Ekzopolisakkarit Üretimi.....	13
2.6. Propiyonik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Aktivitesi.....	14
2.7. Propiyonik Asit Bakterilerinin Otoagregasyon ve Koagregasyon Yeteneği..	16
2.8. Bifidobakterilerin Genel Özellikleri.....	17
2.8.1. Bifidobakterilerin sağlığa yararlı etkileri	22

Sayfa

2.8.2. Bifidobakterilerin klinik yararları ve fizyolojik etkileri.....	23
2.8.3. Propiyonik asit bakterilerinin bifidobakterilerin gelişimini düzenleyici (BGD) etkisi.....	25
3. MATERYAL VE METOT	30
3.1. Materyal.....	30
3.1.1. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve çözeltiler	30
3.1.2. Çalışmada kullanılan bakteriler.....	33
3.2. Metot	34
3.2.1. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları.....	34
3.2.2. Kültürlerin farklı besiyerlerindeki pH ve yüzde asit üretimlerinin belirlenmesi.....	34
3.2.3. Kültürlerin ürettiği organik asitlerin tayini	35
3.2.4. Kültürlerin ekzopolisakkarit (EPS) üretimlerinin belirlenmesi	35
3.2.5. Kültürlerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi	36
3.2.6. Kültürlerin otoagregasyon ve koagregasyon yeteneklerinin belirlenmesi.....	37
3.2.7. Kültürlerin bifidobakterilerin gelişimini düzenleyici (BGD) etkisinin belirlenmesi.....	38
3.2.8. Sonikasyon, sıcaklık, asitlik ve bazı enzimlerin BGD aktivitesi üzerine etkisi.....	39
3.2.9. İstatistiksel analizler	40
4. DENEYSEL BULGULAR	41
4.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler	41
4.2. Kültürlerin Farklı Besiyerlerindeki pH ve Yüzde Asit Üretimleri.....	43
4.3. Kültürlerin Ürettiği Organik Asit Miktarları	46
4.4. Kültürlerin Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimleri	47

Sayfa

4.5. Kùltùrlerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	50
4.6. Kùltùrlerin Otoagregasyon ve Koagregasyon Yeteneklerinin Belirlenmesi ..	55
4.7. Kùltùrlerin Bifidobakterilerin Gelişimini Dũzenleyici (BGD) Etkisinin Belirlenmesi	57
4.8. Sonikasyon, sıcaklık, asitlik ve bazı enzimlerin BGD aktivitesi ȗzerine etkisi	60
5. TARTIşMA VE SONUÇ	66
KAYNAKLAR	79
ȖZGEÇMİř	89

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. <i>Propionibacterium</i> sp. cinsine ait gruplar.....	6
Çizelge 2.2. Klasik propiyonik asit bakterilerine ait karakteristik özellikler.....	8
Çizelge 2.3. Klasik propiyonik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler....	15
Çizelge 2.4. Süt ürünlerinde bulunan kültürler tarafından üretilen organik asitlerin pKa değerleri ve inhibe ettiği mikroorganizmalar.....	15
Çizelge 2.5. <i>Bifidobacterium</i> sp. cinsine ait türlerin yaşam alanları.....	20
Çizelge 3.1. Modifiye yeast ekstrakt sodyum laktat besiyeri (YEL-G) içeriği.....	30
Çizelge 3.2. Modifiye skimmilk besiyeri (SM) içeriği.....	30
Çizelge 3.3. Modifiye yeast ekstrakt sodyum laktat besiyerleri (E-YEL ve E-YEL-G).....	31
Çizelge 3.4. Nutrient sıvı besiyeri.....	31
Çizelge 3.5. TPY sıvı besiyeri içeriği.....	32
Çizelge 3.6. PBS (Phosphate Buffer Saline) tamponu.....	32
Çizelge 3.7. Çalışmada kullanılan propiyonik asit bakterileri.....	33
Çizelge 3.8. BGD aktivitesi çalışmasında kullanılan propiyonik asit bakterileri ve bifidobakteriler.....	38
Çizelge 4.1. Propiyonik asit bakterisi kültürlerinin SM ve YEL-G besiyerlerindeki pH ve yüzde asitlik değerleri.....	45
Çizelge 4.2. Propiyonik asit kültürlerinin üretmiş olduğu organik asit miktarları....	47
Çizelge 4.3. Propiyonik asit bakterisi kültürlerinin farklı besiyerlerinde ürettiği EPS miktarları.....	49
Çizelge 4.4. Propiyonik asit bakterilerinin <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 suşuna gösterdiği antimikrobiyal aktivite.....	52
Çizelge 4.5. Propiyonik asit bakterilerinin <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 suşuna gösterdiği antimikrobiyal aktivite.....	55

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.6. Propiyonik asit bakterisi kültürlerinin yüzde otoagregasyon değerleri...	56
Çizelge 4.7. Propiyonik asit bakterisi kültürlerinin yüzde koagregasyon değerleri...	56
Çizelge 4.8. Sonikasyonun <i>B. breve</i> A28 üzerine olan BGD aktivitesine etkisi.....	61
Çizelge 4.9. Sonikasyonun <i>B. breve</i> BASO1 üzerine olan BGD aktivitesine etkisi.....	61
Çizelge 4.10. <i>P. thoenii</i> 72 suşunun <i>B. breve</i> A28 ve <i>B. breve</i> BASO 1 suşları üzerine BGD aktivitesine sıcaklık, pH ve farklı enzimlerin etkisi.....	63
Çizelge 4.11. <i>P. freudenreichii</i> spp. <i>shermanii</i> 40 suşunun <i>B. breve</i> A28 ve <i>B. breve</i> BASO 1 suşları üzerine BGD aktivitesine sıcaklık, pH ve farklı enzimlerin etkisi.....	64
Çizelge 4.12. <i>P. freudenreichii</i> spp. <i>shermanii</i> 43-4 suşunun <i>B. breve</i> A28 ve <i>B. breve</i> BASO 1 suşları üzerine BGD aktivitesine sıcaklık, pH ve farklı enzimlerin etkisi.....	65

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. HSP60 DNA dizisini baz alan bifidobakter filogenetik ağacı.....	21
Şekil 4.1. Propiyonik asit bakterisi kültürlerinin <i>B. breve</i> A28 suşunu geliştirici Etkisi.....	58
Şekil 4.2. Propiyonik asit bakterisi kültürlerinin <i>Bifidobacterium breve</i> BASO1 suşunu geliştirici etkisi.....	59

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. <i>P. freudenreichii</i> türüne ait bir suşun taramalı elektron mikroskobu görüntüsü.....	6
Resim 2.2. <i>Bifidobacterium</i> sp. suşunun taramalı elektron mikroskobu görüntüsü...	17
Resim 2.3. Bifidobakterilerin metabolik yolu (bifidum yolu) ve BGD'nin rolü için önerilen mekanizma.....	29
Resim 4.1. Propiyonik asit bakterilerinin ışık mikroskobundaki görüntüleri.....	42
Resim 4.2. Propiyonik asit bakterilerinin YEL-G besiyerindeki koloni morfolojileri.....	43

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklama
nm	Nanometre
pH	Asitlik bazlık birimi
Kısaltmalar	Açıklama
API	Analitik Profil İndeks
ATCC	Amerikan Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection)
BGD	Bifidobakterilerin Gelişimini Düzenleyici Etki
Cfu	Koloni Oluşturan Birim (Colony forming unit)
EPS	Ekzopolisakkarit
GALT	Barsak İlişkili Lenfoid Doku (Gut Associated Lymphoid Tissue)
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (High Performance Liquid Chromatography)
IgA	İmmünoglobulin A
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
rpm	Devir sayısı
SM	Skim milk
TPY	Trptone Phytone Yeast Extract
YEL	Yeast Extract Sodium Lactate

1. GİRİŞ

Farklı habitatlardan “klasik propiyonik asit bakterileri” ve “cildi propiyonik asit bakterileri” olmak üzere iki önemli gruba ayrılan propiyonik asit bakterilerinden klasik propiyonik asit bakterileri grubu gıdalarda kullanılabilir olmaları ve yararlı etkilerinden dolayı oldukça dikkat çekmektedir. Klasik propiyonik asit bakterileri genellikle süt ve süt ürünlerinde kullanılmasına rağmen B₁₂ vitamini ve propiyonik asit üretimleriyle biyoteknolojik endüstride önemli bir bakteri grubu olarak yer almaktadır. Ayrıca bu bakteriler ekmek endüstrisinde, insan ve hayvan gıdalarında kullanılan bazı sebzelerin mayalanmasında, gıdaların küflenmesini engellemede, gıda ürünlerinin besinsel değerlerinin ve raf ömürlerinin artırılmasında da kullanılmaktadır [Deborde, 2003]. Günümüze kadar propiyonik asit bakterilerinin insan sağlığını olumlu yönde etkileyebilecek bazı özellikleri araştırılmış ve bu bakteriler probiyotik mikroorganizmalar olarak önerilmiştir. Ancak propiyonik asit bakterilerinin probiyotik özellikleri bugüne kadar ticari olarak laktik asit bakterileri ve bifidobakteriler kadar yaygın bir şekilde kullanılmamıştır. Bu bakterilerin probiyotik faaliyetleri propiyonik asit, bakteriosin, nitrik oksit, folasin, B₁₂ vitamini, CO₂ üretimi ve diğer yararlı bakterilerin gelişimini düzenlemelerinden kaynaklanmaktadır. Propiyonik asit bakterilerinin bazı suşları midenin yüksek asitli şartlarına ve bağırsaklardaki safra tuzlarına dirençli oldukları için sindirim kanalında yüksek yoğunlukta bir populasyon oluşturmaktadır. Bu şekilde gastrointestinal alanda kolonize olan propiyonik asit bakterileri probiyotik özelliklerini gösterebilmektedirler. Aynı zamanda propiyonik asit bakterileri serbest linoleik asiti sağlığa yararlı etkileri olduğu bilinen konjuge linoleik asite dönüştürebilme yeteneğiyle de probiyotik özelliğini göstermektedir [Wang ve ark., 2007].

Propiyonibakteriler laktat ve karbonhidratları propiyonik asit, asetik asit ve karbondioksit çevirmesi yeteneğiyle endüstriyel üretimde önemli bir rol oynamaktadır [Playne, 1985]. Selüloz lif, herbisit, parfüm ve bazı ilaçların sentezinde önemli bir kimyasal aracı olan propiyonik asit ve bunun tuzları gıda koruyucusu olarak da sıklıkla kullanılmakta ve bu sayede gıda endüstrisinde sıklıkla yer almaktadır. Endüstriyel üretimde bugüne kadar propiyonik asitin petrokimyasal

yöntemlerle sentezlenmesi sıklıkla kullanılan bir yöntem olmuş ancak son zamanlarda fermentasyon teknikleriyle propiyonik asit üretimi önem kazanmıştır. Fermentasyon sonucunda propiyonik asit üreten propiyonik asit bakterileri bu yüzden ilgi odağı haline gelmiştir. Propiyonik asit bakterilerinin çeşitli karbon kaynakları içeren besiyerlerinde ve farklı fermentasyon yöntemleriyle propiyonik asit üretimine bakılmış ve bu üretimde en verimli karbon kaynağı ve fermentasyon tekniği bulunmaya çalışılmıştır. Propiyonik asitin gıda koruyucusu olarak kullanılmasının sebebi bazı mikroorganizmaların, mayaların ve küflerin gelişimini engelleyici özelliğinin olmasıdır. Fermentasyon teknikleriyle üretilen propiyonik asit herhangi bir yan etkisinin de olmaması sebebiyle gıdalarda güvenilir bir şekilde kullanılabilir.

Gıda endüstrisinde kıvam artırıcı ve jelleştirici ajan olarak kullanılan mikrobiyal ekzopolisakkaritler (EPS)'in aynı zamanda sağlığa yararlı bazı özelliklerinin de olduğu gösterilmiştir [Sutherland, 1998; Duboc ve Mollet, 2001]. Bunlardan bazıları kolesterol düşürücü aktivitesinin yanında immün düzenleyici özelliklerinin olmasıdır [Chabot ve ark., 2001; Makino ve ark., 2006; Nakajima ve ark., 1992]. Probiyotik bakterilerin gastrointestinal alanda yaşarken EPS üretmesi hem bu bakterileri olumsuz şartlara karşı korumakta hem de dolaylı olarak sağlığa yararlı özelliklerini göstererek bulunduğu konağa faydalı olmaktadır. Klasik propiyonik asit bakterilerinin ekzopolisakkarit üretim kapasitelerinin belirlenmesi ve yüksek oranda EPS üreten suşların probiyotik olarak önerilmesi bu bakterilere olan ilgiyi daha da artıracaktır.

Gastrointestinal alan, aerobik ve anaerobik mikroorganizmaların oluşturduğu kompleks bir mikrobiyal ekosistemden oluşmaktadır [Kaneko ve ark., 1994]. Buradaki mikrobiyal ekosistemi oluşturan bakterilerin insan sağlığına yararlı ve zararlı etkileri bulunmaktadır. Bifidobakteriler ve laktik asit bakterileri gibi yararlı bakterilerin artışı ve intestinal mikrofloradaki zararlı bakterilerin baskılanması bu açıdan çok önemlidir [Kouya ve ark., 2007]. Propiyonik asit bakterileri ürettikleri propiyonik asit, asetik asit, diasetil, hidrojen peroksit ve bakteriyosinler gibi bileşiklerle gastrointestinal alanda yaşayan zararlı mikroorganizmalara karşı

antimikrobiyal aktivite göstermektedirler [Hettinga ve Reinbold, 1972]. Antimikrobiyal aktivitesi yüksek olan suşların seçimi probiyotik olarak kullanılabilen propiyonik asit bakterilerinin belirlenmesi için bir kriter olacaktır. Bu sayede bu mikroorganizmaların hem sağlık hem de gıda endüstrisinde kullanılması önerilebilecektir.

Probiyotik bakteriler yararlı etkilerini gösterebilmek için agregasyon ile yeterli bir kütleye ulaşabilmeli ve intestinal mukus ve enterositlere tutunarak intestinal bölgesinde kolonize olmalıdırlar [Collado ve ark., 2008]. Probiyotik mikroorganizmalar bağışıklık sistemini düzenleme ve enteropatojenlere karşı antagonistik aktivite gösterebilme gibi sağlığa yararlı etkilerini gösterebilmek için bu şekilde mukozal yüzeye tutunabilmelidirler. Yapılan çalışmalarda probiyotik bakterilerin agregasyon yeteneği ile bunların tutunma yeteneği arasında ve ayrıca koagregasyon yetenekleri ile patojen bakterilere karşı etkileşime girebilme yetenekleri arasında bir korelasyon olduğu görülmüştür [Vlková ve ark., 2008]. Klasik propiyonik asit bakterilerinin otoagregasyon ve koagregasyon yetenekleri ile ilgili daha önce bir çalışma yapılmadığından bu özelliklerin belirlenmesi bu bakterilerin probiyotik olarak etkinliğini kanıtlayan çalışmalar olacaktır.

Propiyonik asit bakterilerinin son yapılan çalışmalarda ilgi çeken özelliklerinden biri gastrointestinal alandaki bifidobakterilerin gelişimini düzenleyici etkisi olmuştur [Mori ve ark., 1997]. Bifidobakteriler gastrointestinal alanda yaşayan sağlığa yararlı bakterilerdendir. Bu bakteriler bağırsakta kolonize oldukları bölgede fermentasyon sonucunda ürettikleri bazı organik asitlerle buradaki epitel hücreleri için enerji kaynağı oluşturmakta; epitel hücrelerinin gelişimine ve farklılaşmasına katkıda bulunmaktadır. Aynı zamanda bifidobakteriler ürettikleri bazı inhibitör maddeler sayesinde gastrointestinal alanda bulunan patojen mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmekte; ayrıca bağışıklık sistemini düzenlemektedirler. Bazı gastrointestinal hastalıkların tedavisinde de kullanılan bifidobakteriler kolon kanserini önleyici bazı özellikleri ile oldukça dikkat çekmektedirler. Bilim insanları bütün bu olumlu özellikleri sebebiyle bifidobakterilerin gastrointestinal alandaki sayısını, canlılığını ve etkinliğini artıracak çalışmalara yönelmişlerdir. Kolon bakterilerinden birinin

veya az bir kısmının çoğalmasını veya aktivitesini etkileyerek yararlı bir etki oluşturan sindirilemeyen katkı maddeleri olarak tanımlanan prebiyotikler içerisinde bifidobakteriler için sıklıkla kullanılan inülin prebiyotığıdır. Bu prebiyotikler genellikle bazı bitkilerden elde edilirler ve etki gösterecekleri yer olan gastrointestinal alana ulaşabilmeleri için mutlaka gıdalarla insan vücuduna alınmaları gerekmektedir. Propiyonik asit bakterilerinin gastrointestinal alanda yaşarken bifidobakterilerin gelişimini düzenleyici özelliğini göstermesi bu bakterilerin prebiyotik olarak kullanılmasını teşvik edecek özellikler olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bu çalışmada çeşitli tiplerde peynirlerden izole edilmiş klasik propiyonik asit bakterilerinin farklı besi ortamlarındaki total asit üretimi, üretilen organik asitlerin tayini, ekzopolisakkarit üretim yetenekleri araştırılmıştır. Ayrıca bu bakterilerin patojen mikroorganizmalara karşı gösterdikleri antimikrobiyal aktivite, otoagregasyon ve koagregasyon kabiliyetleri ile birlikte bifidobakterilerin gelişimini düzenleyici (BGD) etkisi ve bu etkiye bazı faktörlerin etkisi değerlendirilmiştir. Propiyonik asit bakterilerinin ürettiği metabolitlerle BGD aktivitesi arasındaki ilişkinin ve bu bakterilerin probiyotik açıdan önemli olabilecek özelliklerin belirlenmesi, ayrıca BGD etkisi ile birlikte propiyonibakterilerin prebiyotik olarak da kullanılabilirliğinin açığa çıkarılması hedeflenmiştir. Bütün bu bilgiler değerlendirildiğinde propiyonik asit bakterilerinin hem probiyotik hem de prebiyotik olarak aktivite gösterip bu şekilde sinerjistik bir etkisinin olabileceği bu çalışmanın ana çıkış kaynağını oluşturmaktadır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

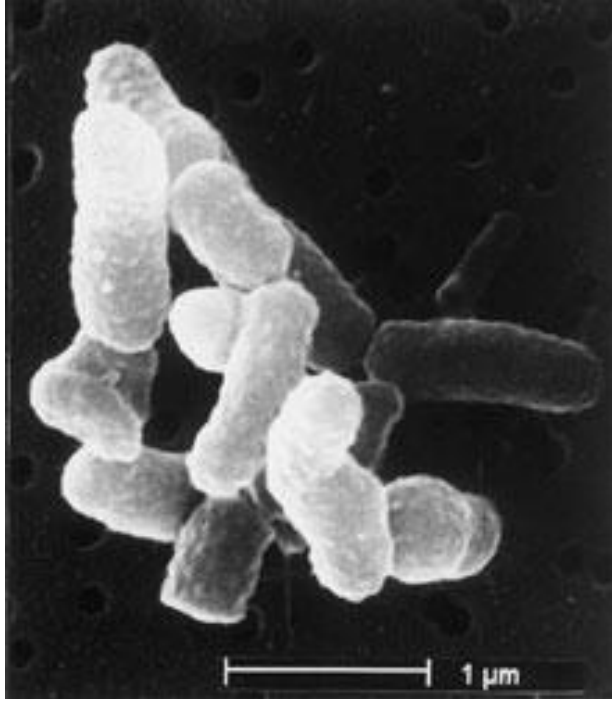
2.1. Propiyonik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri

Propiyonik asit bakterileri ilk kez 19. yüzyılın sonlarında emmental peynirindeki propiyonik asit fermentasyonu üzerinde çalışan Eduard von Freudenreich ve S. Orla-Jensen tarafından tanımlanmışlardır [Gautier, 2004]. Propiyonibakteriler anaerobik veya mikroaerofilik mikroorganizmaların heterojen bir grubudur [Cummins ve Johnson, 1992]. *Propionibacterium* sp. cinsi, 16S rRNA/DNA homoloji çalışmalarına dayanarak sınıflandırılan geniş ve heterojen bir grup olan korineform bakterilerden *Actinobacteria* sınıfı içerisinde yer alan yüksek %G+C içeriğine sahip bakterilerdir [Stackebrandt ve ark., 1997]. Propiyonik asit bakterilerinin %G+C içeriği türlere göre %65 – 67 arasında değişmektedir. Genom büyüklüğü ise $1,6 - 3,2 \times 10^6$ baz çifti arasında değişmektedir [Deborde, 2003].

Propiyonibakteriler gram pozitif, hareketsiz, spor oluşturmayan, anaerobik veya aerotolerant, pleomorfik ve mezofilik bakterilerdir [Deborde, 2003]. Propiyonik asit bakterileri pleomorfik basillerdir fakat hücreler yuvarlak, bifid veya dallanmış yapıda da olabilirler. Hücreler tekli, V veya Y formunda ikili gruplar, kısa zincirler veya Çin harflerine benzer gruplar halinde bulunurlar (Bkz Resim 2.1). Hücrelerin morfolojileri ve düzeni suşa, kültürün inkübasyon süresine ve kültürdeki besi ortamına göre değişmektedir [Gautier, 2004].

Propionibacterium sp. cinsi farklı habitatlardan “klasik propiyonik asit bakterileri” ve “cildi propiyonik asit bakterileri” olmak üzere iki ayrı grubu içermektedir. Bu gruplara dahil olan türler Çizelge 2.1.’de verilmiştir [Ouwehand, 2004]. Cildi propiyonik asit bakterileri grubundaki suşlar genellikle insan cildi üzerinde bulunurken klasik propiyonibakteriler süttten veya mandıra ürünlerinden izole edilmektedir. Son yapılan çalışmalarda yeni bir yaşam ortamından izole edilen üç propiyonik asit bakterisi tanımlanmıştır. Bunlar portakal suyundan izole edilen *Propionibacterium cyclohexanicum* [Kusano ve ark., 1997], zeytin öğütüldükten sonra çıkan artık sudan izole edilen *Propionibacterium microaerophilum*

[Koussemon ve ark., 2001] ve sığır lezyonlarından izole edilen ve *Propionibacterium australiense* [Bernard ve ark., 2002]' dir.



Resim 2.1. *P. freudenreichii* türüne ait bir suşun taramalı elektron mikroskobu görüntüsü [Gautier, 2004].

Çizelge 2.1. *Propionibacterium* sp. cinsine ait gruplar [Ouwehand, 2004]

Klasik Propiyonik Asit Bakterileri	Cildi Propiyonik Asit Bakterileri
<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Propionibacterium australiense</i>	<i>Propionibacterium avidum</i>
<i>Propionibacterium cyclohexanicum</i>	<i>Propionibacterium granulosum</i>
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	<i>Propionibacterium lymphophilum</i>
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	<i>Propionibacterium propionicus</i>
<i>Propionibacterium jensenii</i>	
<i>Propionibacterium thoenii</i>	
<i>Propionibacterium microaerophilum</i>	

Propiyonik asit bakterileri pleomorfik basil formundayken 0,5 – 0,8 µm çapında ve 1 – 5 µm uzunluğundadır. Propiyonibakteriyel hücre duvarının yapısı petidoglikan tabaka (murein), polisakkaritlerden oluşan bir matriks, teikoik asit (gliserol teikoik asit) ve proteinlerden oluşmaktadır. Hücre duvarının kuru ağırlığının %30'unu peptidoglikan tabaka, %50'sini polisakkaritler ve %20'sini protein ve teikoik asit oluşturmaktadır. Yalnız iki suşta hücre duvarına ek olarak bir kristal yüzey tabakası (S-tabakası) bulunmaktadır. Hücre lipidlerinin büyük bir kısmı 12-metiltetradekanoik asit ve 13-metiltetradekanoikasitten meydana gelmektedir. Bunların dışında daha az miktarda 14-metilhekzadekanoik asit, pentadekanoik asit, hekzadekanoik asit, 8-metildekanoik asit ve 9-metildekanoik asit de bulunmaktadır. Hücre duvarının içeriği klasik propiyonik asit bakterilerinde yer alan türlere göre farklılık göstermektedir. Bu ayrımda hücre duvarının yapısında bulunan amino asitler, diaminopimelik asit (DPA) izomerleri ve karbonhidratlara bakılmaktadır. Klasik propiyonik asit bakterileri içerisindeki türlerin oluşturdukları kolonilerin rengi beyaz, krem, kahverengi ya da turuncu olabilmektedir. Koloni rengi türler içerisinde farklılık gösterebilmektedir. Bütün bu özellikler ile birlikte %G+C oranına da bakılarak klasik propiyonik asit bakterilerine ait türlerin farklı karakterleri Çizelge 2.2.'de gösterilmiştir [Deborde, 2003].

Propiyonik asit bakterileri mesofilik bakterilerdir ve optimum gelişme sıcaklığı 25 – 30 °C'dir. Düşük sıcaklıklarda gelişebilme kapasitesi tür ve suşa göre değişmektedir. Diğer türlerinden farklı olarak *P. freudenreichii* sitoplazmik membranındaki yağ asitlerini değiştirerek 7 °C' de bile yaşayabilmektedir [Gautier, 2004; Deborde, 2003].

Propiyonik asit bakterileri pH 5,0'dan 8,0'e kadar gelişebilirler ancak optimum pH değeri 6,0 – 7,5 arasındadır. Bazı suşlar pH 4,5'te de gelişim gösterirler ancak bu koşullar altında propiyonik ve asetik asit üretimi durmaktadır [Deborde, 2003].

Tuz direnci propiyonik asit bakterilerinin suşlarına göre çeşitlilik göstermektedir. Birçok tür % 2,5 (0,4 M)'tan % 4 (0,68 M)'a kadar NaCl içeren zenginleştirilmiş

besiyerinde (yeast ekstrakt – laktat broth, YEL) gelişebilir. *P. acidipropionici* türü yüksek NaCl kaonsantrasyonuna en dirençli türdür [Deborde, 2003].

2.2. Klasik Propiyonik Asit Bakterilerinin Doğal Yaşam Alanları

Propiyonik asit bakterilerinin toprak kaynaklı olduğu ve inek rumenine yenilen otlarla taşındığı düşünülmektedir. Buradan sonra bu bakterilerin toprağa geri dönüşü feces ile olmaktadır. Yapılan çalışmalarda propiyonik asit bakterilerinin çiğ süt ve peynirde de olduğu gösterilmiştir. Sütün kontaminasyonu çiftliklerdeki süt makinelerinden kaynaklanmaktadır. Propiyonik asit bakterilerinin sütte gelişebilmelerinin sebebi karbon kaynağı olarak laktatı kullanmalarındır.

Çiğ sütte bulunan propiyonik asit bakterileri daha sonra bu sütlerden yapılan peynirlere geçmekte ve bu bakteriler peynirlerin olgunlaşmasını sağlamaktadır. Uzun bir olgunlaşma süresi (24°C’de birkaç hafta), düşük tuz konsantrasyonu ve yüksek asitliği (pH 5,2) olan İsviçre tipi peynirlerde klasik propiyonik asit bakterileri baskın olarak bulunmaktadır [Gautier, 2004; Deborde, 2003]. *Propionibacterium freudenreichii* İsviçre tipi peynirlerde olgunlaştırıcı starter kültür olarak kullanılan ana türdür. Yaklaşık bir asır önce Emmental peynirinden izole edilen bu tür laktik asidi propiyonik ve asetik asit ile CO₂’e çevirmesiyle bu tip peynirlerin tadının ve boşluklarının oluşumunda anahtar rol oynar [Thierry ve ark., 2005]. Bu türün termotoleransı İsviçre peynirinin üretim aşamalarındaki pişirme işleminden zarar görmesini engeller. *Propionibacterium* sp.’in diğer klasik türleri genellikle diğer tip peynirlerden ve süttten izole edilmektedir. Örneğin, *P. jensenii* Leerdammer peynir örneklerinden en sık izole edilen *Propionibacterium* sp. türüdür [Britz ve Riedel, 1994].

Çizelge 2.2. Klasik propiyonik asit bakterilerine ait karakteristik özellikler [Deborde, 2003]

Türler	Eski tür isimleri veya türlerin asıl isimleri	İzole edildiği kaynaklar	Koloni rengi veya pigment rengi	Hücre duvarının veya peptidoglikanın içeriği		DNA'nın G+C içeriği (%)
				Amino asit veya diaminopimelik asit (DPA) izomerleri	Karbonhidratlar	
<i>P. freudenreichii</i>	<i>P. freudenreichii</i> <i>P. shermanii</i> <i>P. globosum</i> <i>P. orientum</i> <i>P. coloratum</i>	Çiğ süt, İsviçre tipi peynirler, Diğer süt ürünleri	Beyaz – gri krem	Alanin Glutamat Meso-DAP	Mannoz Galaktoz Rannoz Glukozamin Galaktozamin	65.00 ± 0.97 64 – 67
<i>P. jensenii</i>	<i>P. jensenii</i> <i>P. raffinosum</i> (<i>saceum</i>) <i>P. technicum</i> <i>P. peterssonii</i> <i>P. zeae</i>	Süt ürünleri, Hayvan yemi	Açık krem – koyu kahve	Alanin Glutamat Glisin L-DAP	Galaktoz Glukoz Mannoz Glukozamin Galaktozamin 2,3- diaminoheksuronik asit	67 ± 1.07 65 – 68
<i>P. thoenii</i>	<i>P. thoenii</i> <i>P. rubrum</i>	Emmental peyniri, Diğer süt ürünleri	Turuncu – kırmızı kahve	L-DAP	Galaktoz Glukoz	66.00 ± 0.50 66 – 67
<i>P. acidipropionici</i>	<i>P. pentosaceum</i> <i>P. arabinosum</i>	Süt ürünleri	Krem – turuncu sarı	L-DAP	Glukoz Galaktoz ve/veya mannoz	67.00 ± 0.84 66 – 68

2.3. Propiyonik Asit Bakterilerinin Metabolizmaları

Propiyonik asit bakterilerinin ana fermentasyon ürünleri; propiyonik asit, asetik asit, CO₂ ve suksinik asittir. Bu ürünlerin yanında az miktarda formik asit, isovalerik asit, pirüvik asit, laktik asit, asetoin, diasetil, dimetilsülfid, asetaldehit, propionaldehit, etanol, propanol ve trehaloz da üretmektedirler [Deborde, 2003].

Bu yollardan substrat olarak genellikle laktat tercih edilmektedir. Propiyonik asit bakterileri glukoz veya laktatı propiyonata suksinat-propiyonat yolunu kullanarak dönüştürürler [Kim ve Gadd, 2008].

2.3.1. Suksinat-propiyonat yolu

Propionibacterium sp. cinsi içerisindeki türler laktatı suksinat aracılığıyla propiyonata fermente etmektedirler. Flavine laktat dehidrogenaz enzimi laktik asiti pirüvata yükseltirken iki molekül pirüvat elektron alıcısı olan propiyonik asite indirgenir. Bu sırada bir pirüvat asetil-CoA'nın sentezlediği 1 ATP aracılığıyla asetik asite yükseltgenir. Bu yoldaki bazı enzimler ilgi çekicidir. Bunlar biotine ihtiyacı olan transkarboksilaz, ATP sentezini birleştiren fumarat reduktaz ve B₁₂ vitaminin koenzimi olarak kullanılan metilmalonil-CoA'dır. Bu fermentasyonda 3 molekül laktik asitin fermente edilmesiyle 3 ATP, asetat kinaz aracılığıyla 1 ATP, fumarat kinaz aracılığıyla da 2 ATP sentezlenmektedir.

Metilmalonil-CoA: pirüvat transkarboksilaz bir karboksil grubunu metilmalonil-CoA'dan pirüvata transfer ederken propionil-CoA ve aksaloasetat oluşur. Biotin bu reaksiyonda kofaktör olarak görev alır.

Fumarat reduktaz NADH'ı elektron vericisi olarak kullanarak fumaratın indirgenmesini gerçekleştirir.

Metilmalonil-CoA mutaz suksinil-CoA'yı metilmalonil-CoA'ya dönüştürmek için karbon-yeniden düzenleme reaksiyonunu katalizler. Bu reaksiyon koenzim B₁₂'yi

gerektirir. Koenzim B₁₂ 5'-deoksiadenosilkobalamin yapısındadır. Bu koenzim karbon yeniden düzenlenmesini içeren birçok enzim reaksiyonu için gereklidir. B₁₂ vitamini *Propionibacterium shermanii* kullanılarak ticari olarak bu yolla üretilmektedir [Kim ve Gadd, 2008].

2.3.2. Karbonhidrat metabolizması

Propiyonik asit bakterileri karbonhidratları Embden-Meyerhof yolu veya pentoz-fosfat yolunu kullanarak metabolize etmektedirler. Propiyonik asit bakterileri karbonhidratları glikojen ve trehaloz olarak depo etmektedirler. Trehaloz bu bakterilerde yüksek oranlarda bulunmakta ve mikroorganizmanın geliştiği besiyerine salgılanmaktadır. Uygun olmayan koşullarda bu disakkarit yüksek oranlarda glukoneogenez ile sentezlenmektedir. Trehaloz mikroorganizmaları donmaya ve liyofilizasyon yöntemine karşı korumasıyla bilinmektedir [Deborde, 2003].

2.3.3. Aminoasit katabolizması

Propiyonik asit bakterileri tarafından metabolize edilen başlıca aminoasitler aspartik asit, glisin, serin ve alanindir. Propiyonik asit bakterilerinin aminoasitleri katabolize etmesi suşa ve çevre şartlarına bağlıdır. *P. jensenii*'nin saf ekstraktları aspartat, izolösin, lösin, norlösin, valin, α -aminobütirat ve γ -aminobütirat ile α -ketoglutaratı amino grup alıcısı olarak L-izomerlerine transamine edebilmektedir [Deborde, 2003].

2.3.4. Fosfat metabolizması

Propiyonik asit bakterilerinin diğer bir özelliği yüksek enerjili bağların kaynağı olan ve birçok biyokimyasal reaksiyonda yer alan polifosfatların yüksek oranda bulunmasıdır. Polifosfatlar (PP_i) ATP'deki yüksek enerjili fosfat bağlarına eş değer fosfoanhidrit bağları içeren ortofosfat polimerleridir. Normal şartlarda yüksek moleküler ağırlıklı polifosfatlar *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* hücrelerinin kuru ağırlığının %3-5'ini oluşturmaktadır ve genellikle volutin granülleri içerisinde bulunmaktadır [Deborde, 2003].

2.3.5. B₁₂ vitamini sentezi

1920'lerin başına kadar B₁₂ vitamini *Pseudomonas denitrificans* ve *Propionibacterium* türleri kullanılarak mikrobiyal fermentasyon yoluyla endüstriyel boyutta üretilmekteydi. Doğal B₁₂ vitamini daha sonra kimyasal yöntemlerle siyanokobalamin formuna dönüştürülmektedir. Hayvanlar ve insanlar siyanokobalamini çeşitli metabolik değişimlerde bir koenzim olarak işlev gören metilkobalamine çevirmektedir. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*'nin fermentasyonu yoluyla B₁₂ vitamininin endüstriyel üretimi iki aşamadan oluşan bir yöntemle dayanmaktadır. 1 kg propiyonibakteriyal hücre kitlesinden 300 g'a kadar B₁₂ vitamini üretilebilmektedir [Deborde, 2003].

2.4. Propiyonik Asit Bakterilerinin Propiyonik Asit Üretimi

Propiyonibakteriler laktik asit ve karbonhidratları propiyonik asit, asetik asit ve karbondioksit'e çevirmesi yeteneğiyle endüstriyel üretimde önemli bir rol oynamaktadır [Playne, 1985]. Propiyonik asit; selüloz lif, herbisit, parfüm ve ilaçların sentezinde önemli bir kimyasal araçtır. Propiyonik asit ve bunun tuzları gıda koruyucusu olarak sıklıkla kullanılmaktadır [Zhang ve Yang, 2009]. Eskiden propiyonik asit üretiminin büyük bir kısmı petrokimyasal yollarla yapılmaktaydı. Ancak 1923 yılından itibaren bu üretimde fermentasyon yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır. Biyolojik propiyonik asit üretimi için endüstrinin ilgisini geliştiren fermentasyon yöntemleri çekmektedir. Bu fermentasyon için karbon kaynağı olarak glukoz [Emde ve Schink 1990; Lewis ve Yang 1992a], ksiloz [Hendricks ve ark., 1986; Carrondo ve ark., 1988], maltoz [Babuchowski ve ark., 1993], sükroz [Quesada-Chanto ve ark., 1994], laktik asit [Babuchowski ve ark., 1993; Eaton ve Gabelman, 1995], ve peynir altı suyu laktozu [Lewis ve Yang 1992b; Colomban ve ark., 1993] kullanılmıştır. Gıdaların korunmasında laktik asit ve asetik asitin yanında propiyonik asitin de kullanılabileceği anlaşılmıştır. Amerika gıda ve ilaç idaresi (FDA), bu asitle beraber propiyonik asitin Na⁺⁺, Ca⁺⁺ ve K⁺ tuzlarının gıdalarda güvenilir bir şekilde kullanılabileceğini belirlemiştir [Gautier, 2004]. Propiyonik asit

gıda [Lueck, 1980] ve hayvan yemlerinde [Huitson, 1968; Draughon ve ark., 1982] antifungal ajan olarak da kullanılmaktadır.

2.5. Propiyonik Asit Bakterilerinin Ekzopolisakkarit Üretimi

Ekzopolisakkaritler (EPS) şeker ve şeker türevlerinin tekrarlayan birimlerinden oluşan uzun zincirli polisakkaritlerdir. Bu şeker birimleri genellikle farklı oranlarda glukoz, galaktoz ve ramnozdan oluşmaktadır [De Vuyst ve Degeest, 1999]. EPS bakteriyel gelişme boyunca çevreye salgılanır ve hücrelerin dış yüzeyine sürekli olarak bağlı halde bulunmazlar [Laws ve ark., 2001]. Gıda endüstrisinde mikrobiyal ekzopolisakkaritler (EPS) kıvam artırıcı, jelleştirici ajan olarak kullanılmaktadır [Sutherland, 1998; Duboc ve Mollet, 2001]. Fizyolojik olarak EPS bakterileri dehidrasyon, bakteriyofaj, protozoon, antibiyotik ve lizozimler gibi olumsuz çevre şartlarından korumaktadır [Ruas-Madiedo ve Reyes-Gavilan, 2005]. Bakterilerde EPS üretimi suşa göre değişkendir ve fermentasyon koşulları ve besiyeri içeriğinden etkilenmektedir [Reddy ve ark., 1973; Skogen ve ark., 1974; Crow, 1988; Racine ve ark., 1991]. Ekzopolisakkaritler tek bir tip monosakkaritten oluşan homopolisakkaritler ve çeşitli monosakkaritlerin tekrarlayan birimlerinden (3 ila 8) oluşan heteropolisakkaritler olmak üzere iki tiptir. Konumlarına göre; salgılanan ekzopolisakkaritler (dış ortama salgılanırlar) ve kapsüler ekzopolisakkaritler (hücre duvarına sıkıca bağlanırlar) olarak ayrılırlar [Laws ve ark., 2001; Monsan ve ark., 2001; Welman ve Maddox, 2003]. EPS'nin büyük bir kısmı laktik asit bakterilerinde (LAB) çalışılmıştır ve içerik, moleküler ağırlık, glikozidik bağların tipi ve yapısına göre bu polimerlerin özelliklerinin oldukça çeşitlilik gösterdiği anlaşılmıştır [de Vuyst ve ark., 2001]. EPS'nin endüstride kullanılması bu molekülün özelliklerine bağlıdır; kapsüler veya salgılanır olması, bileşimi, büyüklüğü, şeker içeriği [Dabour ve ark., 2005; Faber ve ark., 1998]. EPS ayrıca sağlık için yararlı özellikleri ile dikkat çekmektedir. Bunlardan bazıları kolesterol düşürücü aktivitesinin yanında immün düzenleyici özelliklerinin olmasıdır [Chabot ve ark., 2001; Makino ve ark., 2006; Nakajima ve ark., 1992]. Propiyonik asit bakterilerinin üretmiş olduğu EPS hakkında laktik asit bakterileri ve bifidobakteriler kadar çok araştırma olmamasına rağmen EPS üretimi üzerine fermentasyon koşullarının etkisi, üretilen EPS'nin

kompozisyonu üzerine bilgiler mevcuttur [Gorret ve ark., 2001a; Gorret ve ark., 2001b; Nordmark ve ark., 2005].

2.6. Propiyonik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Aktivitesi

Klasik propiyonik asit bakterileri propionat ve asetat gibi inhibitör maddeler üretmektedir [Holo ve ark., 2002]. Ayrıca diğer bakterilere karşı üretmiş oldukları bakteriyosinler, bakterisidal peptidler ve proteinler üzerine çeşitli araştırmalar yapılmıştır [Klaenhammer, 1993]. Klasik propiyonik asit bakterileri genellikle maya, küf ve Gram (-) bakteriler üzerine etkili bileşikler üretmektedir. Gıdalarda da kullanılabilen klasik propiyonik asit bakterileri ve bunların üretmiş oldukları bakteriyosinlerin gıda koruyucusu olarak kullanılabilmesi dikkat çekmektedir. Bu bakteriyosinlerin bir kısmının özellikleri bulunmuştur. Birçoğu yaklaşık 100 aminoasitten oluşan ısıya dayanıklı peptidler içermektedir. Bu bakteriyosinler laktik asit bakterilerinin ürettiği bakteriyosinlere göre geniş pH aralıklarına karşı daha dayanıklıdır [Holo ve ark., 2002]. Klasik propiyonik asit bakterilerinin ürettiği bakteriyosinlerden bazıları; propionisin PLG-1, jenseninin G, propionisin T1 ve propionisin SM1'dir [Deborde, 2003]. Bu bakteriyosinlerin çeşitli özellikleri Çizelge 2.3'te gösterilmiştir.

Klasik propiyonik asit bakterileri tarafından üretilen propiyonik asitin asetik ve laktik asitten daha geniş bir inhibisyon yeteneğinin olduğu ispatlanmıştır. Propiyonik asit, bunun sodyum ve kalsiyum tuzları oldukça etkili bir antimikotik ajandır ve küfleri inhibe etmek için birçok gıdaya eklenmektedir. Propiyonik asit ayrıca birçok Gram (+) ve Gram (-) bakteri üzerine de etkilidir [Barefoot ve Nettles, 1993]. Süt ürünlerinde bulunan kültürler tarafından üretilen bazı organik asitlerin inhibe ettiği mikroorganizmalar Çizelge 2.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Klasik propiyonik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler [Deborde, 2003]

Bakteriosin	Kaynak(lar)	Hedef Organizmalar	Protein Büyüklüğü (Da)	Gen ve Genin Yerleşimi	Patent
Jenseniin G	<i>P. jensenii</i> ATCC 4872	<i>P. jensenii</i> , <i>P. acidipropionici</i> , Çeşitli laktik asit bakterileri	-	-	US Pat. No. 5 639 659
	<i>P. shermanii</i> ATCC 9619 ATCC 9617	Gram – negatif bakteriler, mayalar ve küfler	300 – 1200	-	US Pat. No. 5 635 484 5 096 718
Propionisin PLG-1	<i>P. thoenii</i> P127	<i>P. thoenii</i> , <i>P. acidipropionici</i> , <i>P. jensenii</i> , çeşitli laktik asit bakterileri, mayalar ve küfler ve <i>Pseudomonas</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Escherichia coli</i>	9328	-	-
Propionisin SM1	<i>P. jensenii</i> DF1	<i>P. jensenii</i> , çeşitli küfler ve mayalar	22865	Gen: ppnA Plasmid	-
Propionisin T1	<i>P. thoenii</i>	<i>Lactobacillus sake</i> , <i>P. freudenreichii</i> haricindeki propiyonik asit bakterileri	-	Gen: pctA Kromozom	-

Çizelge 2.4. Süt ürünlerinde bulunan kültürler tarafından üretilen organik asitlerin pKa değerleri ve inhibe ettiği mikroorganizmalar [Barefoot ve Nettles, 1993]

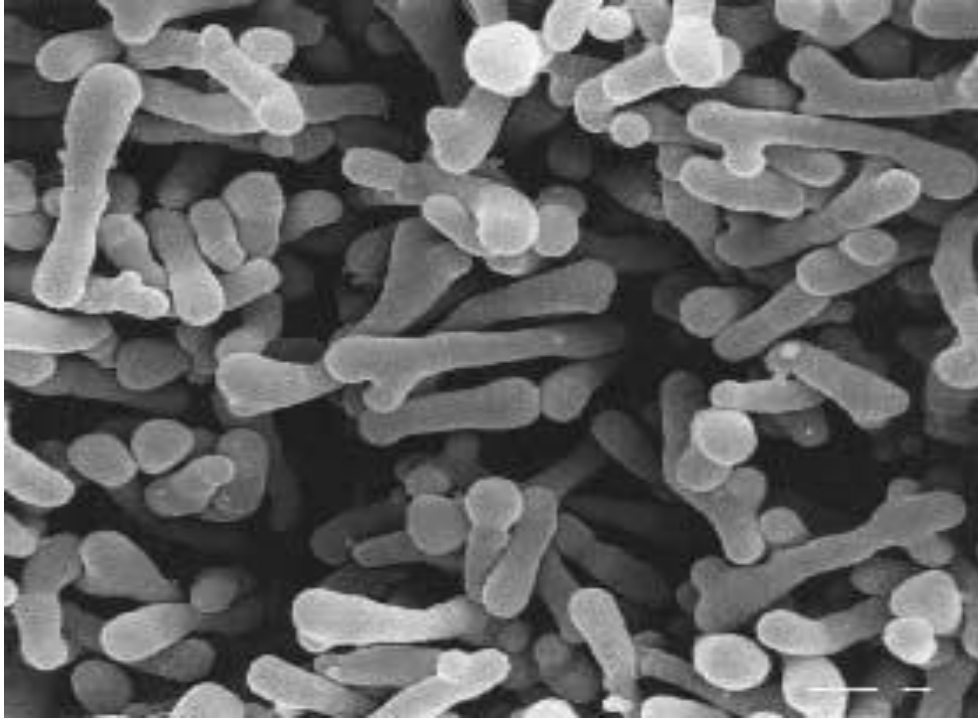
Asit	pKa	İnhibe edilen mikroorganizmalar
Asetik	4,75	Laktik asit bakterileri ve <i>Acetobacter</i> türleri haricindeki bakteriler, birçok küf
Laktik	3,9	Bakteriler (düşük pH'da)
Propiyonik	4,9	Küfler ve bakteriler

2.7. Propiyonik Asit Bakterilerinin Otoagregasyon ve Koagregasyon Yeteneği

Gıdalarda bulunan bazı propiyonik asit bakterileri sağlığa yararlı etkileri ile probiyotik olarak adlandırılmaktadır. Probiyotik bakteriler yararlı etkilerini gösterebilmek için agregasyon ile yeterli bir kütleye ulaşabilmelidir [Collado ve ark., 2008]. Probiyotik bakterilerin intestinal mukus ve enterositlere tutunma yeteneği bu bakterilerin konağın intestinal bölgesinde kolonize olmasının ön koşuludur. Mukozaya tutunma bu bakterilerin bağışıklık sistemini düzenlenmesi [Ouwehand ve ark., 2002] ve enteropatojenlere karşı antagonistik aktivite gösterebilmeleri için çok önemli bir faktördür [Leahy ve ark., 2005]. *In vitro* tutunma çalışmaları immobilize intestinal mukus ve insan enterosit benzeri Caco-2 hücre kültürlerinde başarıyla gerçekleştirilmektedir [Vlková ve ark., 2008]. Ancak bu yöntemler oldukça pahalıdır ve zaman almaktadır. Bu yüzden intestinal yüzeye tutunma özelliği yüksek olan suşların seçiminde daha ucuz ve fazla zaman almayan ön eleme yöntemleri geliştirilmiştir. Yapılan çeşitli araştırmalarda probiyotik bakterilerin agregasyon yeteneği ile bunların tutunma yeteneği arasında bir korelasyon olduğu görülmüştür [Del Re ve ark., 2000; Collado ve ark., 2007c]. Probiyotik bakterilerin intestinal yüzeye tutunmak için enterik patojenlerle yarışması bu bakterilerin probiyotik özelliklerini artıran yeteneklerindendir. Gastrointestinal patojenlere karşı probiyotik bakterilerin koruyucu rolü ve bunun mekanizması dikkat çekmektedir. Mukozal yüzeye tutunma ve kolonizasyon, bağlanma bölgeleri ve besin için yarışma ve bağışıklığı düzenleme sayesinde patojen bakterilere karşı oluşturulan muhtemel koruyucu mekanizmalardır [Collado ve ark., 2007b]. Patojen bakteriler gibi diğer bakterilerle koagregere olabilme yeteneğine sahip olan organizmalar koagregere olamayan organizmalara göre daha avantajlıdır. Probiyotik bakterilerin patojen bakterilerle koagregere olabilmesi patojen bakterilerin gastrointestinal alana kolonizasyonunu engelleyici bir bariyer işlevi görmektedir [Collado ve ark., 2007a]. Bakterilerin koagregere olurken birbirine tutunması hücre yüzeyindeki moleküllerin özellikleri ile ilişkilidir [Ekmekci ve ark., 2009]. Yapılan çalışmalarda probiyotik bakterilerin koagregasyon yeteneği ile patojenlerle etkileşime girebilme yeteneği arasında bir korelasyon olduğu görülmüştür [Bibiloni ve ark., 1999; Bujňáková ve ark., 2004; Collado ve ark., 2008].

2.8. Bifidobakterilerin Genel Özellikleri

Bifidobakteriler gram pozitif, heterofermentatif, hareketsiz, spor oluşturmeyen çubuk şeklindeki bakterilerdir. Laboratuvarında besiyerleri içerisinde geliştirildikleri zaman gelişme şartları ve substrata göre değişen oranlarda asetik asit ve laktik asit üretirler. Bunlar haricinde az miktarda formik asit, etanol ve suksinik asit de üretirler. Bifidobakteriler düzgün basil formunda olabildiği gibi kültür koşullarına veya üreme fazının durumuna göre değişen çeşitli dallanmış formlarda bulunabilirler [Biavati ve Mattarelli, 2001]. Resim 2.2’de bifidobakterilerin taramalı elektron mikroskopundaki dallanmış formu görülmektedir [Biavati ve ark., 2000].



Resim 2.2. *Bifidobacterium* sp. suşunun taramalı elektron mikroskobu görüntüsü.
Çizgi ölçüsü 1 µm (Istituto di Microbiologia, Piacenza University, Italy).

İnsan gastrointestinal alanı birçok bakteri türünden oluşan kompleks bir mikrobiyal ekosistemden meydana gelmektedir [Zoetendal ve Mackie, 2005; Holzapfel, 2006]. Bifidobakteriler memelilerin gastrointestinal sisteminde doğal olarak yayılım göstermektedir. Bifidobakterilerin insan bağırsağındaki sayısı kültür yöntemleriyle

hesaplandığında 10^8 - 10^9 cfu/g'ı bulmaktadır. Fermente süt ürünlerinde kullanılan bazı bifidobakteri suşları gastrointestinal alanda canlılığını yüksek miktarda korumakta ve probiyotik özelliklerini kalın bağırsakta göstermektedir. Birkaç türü ise insanda dış çürüklerinden, lağımdan ve böceklerden izole edilmiştir [Klijn ve ark., 2005]. *Bifidobacterium* sp. cinsine ait türlerin yaşam ortamları Çizelge 2.5'te gösterilmektedir [Biavati ve ark., 2000]. Bunlardan en az 11 tanesi insanlardan izole edilmiştir: *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. pseudocatenulatum* ve *B. scardovii* [Ward ve Roy, 2005]. *B. longum* NCC2705 için tüm genom dizisi tanımlanmıştır [Klijn ve ark., 2005; Schell ve ark., 2002]. Bifidobakterilerin farklı türlerini ayırabilmek için diğer bakterilerde olduğu gibi 16S rRNA dizi analizi yeterli olmadığı için bu ayırım 60 kDA'luk ısı-şok proteininin (HSP60) gen dizisine bakılarak yapılmaktadır [Picard ve ark., 2005]. Şekil 2.1'te HSP60 DNA dizisi baz alınarak yapılan bifidobakterilerin filogenetik ağacı gösterilmektedir [Jian, 2001].

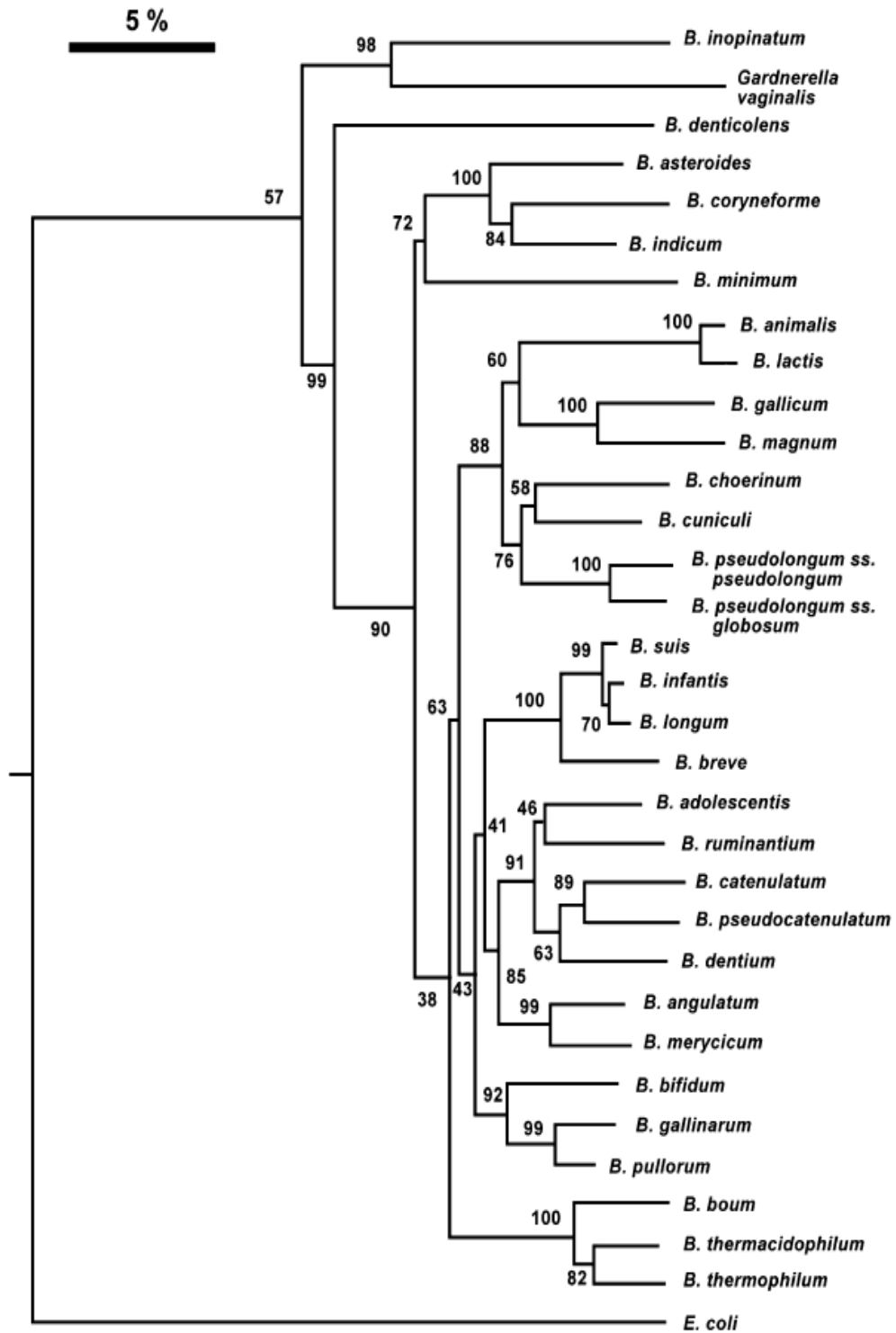
Bifidobakterilerin fermente sütlere ve diğer fermente süt ürünlerine eklenmesi oldukça yenidir. Yaklaşık 10-20 yıl öncesinde canlı bakteriler süt ürünlerine eklenmeye başlamıştır [Tannock, 2005]. Starter kültürlerle zıt olarak bifidobakterilerin sütün asidifikasyonunda veya doku ve aromasının oluşmasında hiçbir rolü yoktur fakat tüketicinin sindirim sisteminde sağlığı destekleyici rol oynadığı düşünülmektedir [Leahy ve ark., 2005].

Çizelge 2.5. *Bifidobacterium* sp. cinsine ait türlerin yaşam alanları [Biavati ve ark., 2000]

Türler	Yaşam Alanları
<i>B. adolescentis</i>	Yetişkin insanların fecesi, sığır rumeni, kanalizasyon atığı, insan vajinası
<i>B. angulatum</i>	Kanalizasyon atığı, yetişkin insanların fecesi
<i>B. animalis</i>	Rat, tavuk, tavşan, inek ve gine domuzunun fecesi, kanalizasyon atığı
<i>B. asteroides</i>	<i>Apis mellifera</i> 'nın bağırsağı
<i>B. bifidum</i>	Buzağı, yeni doğan bebekler ve yetişkin insanların fecesi, insan vajinası
<i>B. boum</i>	Sığır rumeni, yavru domuzların fecesi
<i>B. breve</i>	Buzağı ve yeni doğan bebeklerin fecesi, insan vajinası, kanalizasyon atığı
<i>B. catenulatum</i>	Yeni doğan bebekler ve yetişkin insanların fecesi, kanalizasyon atığı
<i>B. choerinum</i>	Yavru domuzların fecesi, kanalizasyon atığı
<i>B. coryneforme</i>	<i>Apis mellifera</i> 'nın bağırsağı
<i>B. cuniculi</i>	<i>Tavşan fecesi</i>
<i>B. denticolens</i>	<i>İnsan dış çürükleri</i>
<i>B. dentium</i>	<i>İnsan dış çürükleri ve oral boşluk, yetişkin fecesi, apseler ve apandis</i>
<i>B. gallicum</i>	<i>İnsan fecesi</i>
<i>B. gallinarum</i>	<i>Tavuk çekumu</i>
<i>B. indicum</i>	<i>Apis cerana</i> ve <i>A. dorsata</i> 'nın bağırsağı
<i>B. infantis</i>	Buzağı ve yeni doğan bebek fecesi
<i>B. inopinatum</i>	<i>İnsan dış çürükleri</i>
<i>B. lactis</i>	<i>Fermente süt</i>
<i>B. longum</i>	Buzağı, yeni doğan bebek ve yetişkin insan fecesi, insan vajinası, kanalizasyon atığı
<i>B. magnum</i>	<i>Tavşan fecesi</i>
<i>B. merycicum</i>	Sığır rumeni
<i>B. minimum</i>	Kanalizasyon atığı
<i>B. pseudocatenulatum</i>	Buzağı ve yeni doğan bebek fecesi, kanalizasyon atığı
<i>B. pseudolongum</i> subsp <i>pseudolongum</i>	Domuz, tavuk, boğa, buzağı, rat ve gine domuzu fecesi
<i>B. pseudolongum</i> subsp <i>globosum</i>	Domuz yavrusu, buzağı, rat, tavşan ve kuzu fecesi, kanalizasyon atığı, sığır rumeni
<i>B. pullorum</i>	<i>Tavuk fecesi</i>
<i>B. ruminantium</i>	Sığır rumeni

Çizelge 2.5. (Devam) *Bifidobacterium* sp. cinsine ait türlerin yaşam alanları [Biavati ve ark., 2000]

Türler	Yaşam Alanları
<i>B. saeculare</i>	Tavşan fecesi
<i>B. subtile</i>	Kanalizasyon atığı
<i>B. suis</i>	Yavru domuz fecesi
<i>B.thermacidophilum</i>	Anaerobik sindirim kanalı
<i>B. thermophilum</i>	Domuz, tavuk ve buzağı fecesi, sığır rumeni, kanalizasyon atığı



Şekil 2.1. HSP60 DNA dizisini baz alan bifidobakter filogenetik ağacı. Çubuk %5'lik ayrılmayı göstermektedir [Jian, 2001].

2.8.1. Bifidobakterilerin sağlığa yararlı etkileri

Kolonik lümen içerisinde yüzlerce tür bakteri bulunur ve canlı mikrobiotanın ağırlığı birkaç yüz gramı bulabilir [Guarner ve Malagelada, 2003]. İnsan sindirim kanalındaki total bakteri sayısı 10^{13} - 10^{14} 'e kadar çıkabilir ve bu sayı vücut içerisindeki doku hücrelerinin total sayısından 10–20 kat daha fazladır [Suau ve ark., 1999]. Buradaki bakterilerin büyük çoğunluğu *Clostridia*, *Eubacteria*, *Bacteroides* grupları ve *Bifidobacterium* sp. cinsi içerisindeki *Bifidobacterium bifidum* ve *Bifidobacterium infantis* gibi zorunlu anaeroblardan oluşmaktadır. *Bifidobacterium* sp. dominant mikrobiotanın bir üyesidir. Kantitatif PCR ve rRNA-hedefli probler kullanılarak yapılan moleküler hibridizasyon çalışmaları bağırsak lümeninde ve insan feçesinde bu bakterilerin yoğunluğunu kanıtlamıştır [Picard ve ark., 2005]. Gastrointestinal alanda yoğun olarak bulunan bu bakterilerin insan sağlığına olan etkileri birçok bilim insanı tarafından araştırılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda bifidobakterilerin sağlığa yararlı birçok etkisinin olduğu bulunmuştur ve bu konudaki araştırmalar hala devam etmektedir.

Bifidobakteriler kalın bağırsakta kolonize olduklarında fermentasyon sonucunda ürettikleri bazı organik asitler ve kısa zincirli yağ asitleri bağırsak epiteli için enerji kaynağı olmakta ve aynı zamanda hücre gelişimi ve farklılaşmasını düzenlemektedir. Ayrıca bifidobakterilerin sentezlediği vitaminler de buradan emilerek vücuda kazandırılmaktadır. Bifidobakteriler gastrointestinal alanda yaşarken bu bölgeye sindirim yoluyla gelen bazı patojen mikroorganizmalarla karşılaşmaktadırlar. Bulundukları konağı bazı inhibitör maddeler üreterek, adezyon bölgelerine bağlanıp patojenlerin bağlanmasını engelleyerek ve bağırsıklığı düzenleyerek bu zararlı mikroorganizmalardan korumaktadırlar. Bifidobakteriler ayrıca bulaşıcı diyare, rotavirüs kaynaklı diyare, antibiyotikle ilişkili diyare, insan yangısal bağırsak hastalığı hatta kolonik tümörler gibi bağırsakla ilgili birçok hastalığın önlenmesi ve bu hastalıkların tedavisinde kullanılması ile ilgili yapılmış birçok çalışma mevcuttur [Picard ve ark., 2005].

2.8.2. Bifidobakterilerin klinik yararları ve fizyolojik etkileri

Fermentasyon boyunca bakteriyel gelişme stimüle edilirken (biokütle) H_2 , CO_2 ve CH_4 gazı ile birlikte organik asitler (laktik asit ve kısa zincirli yağ asitleri) üretilmektedir. Laktik asit başta bifidobakteriler ve laktik asit bakterileri olmak üzere bağırsaklardaki birçok bakteri türü tarafından üretilen bir organik asittir. Kısa zincirli yağ asitlerinden genellikle asetat, propionat ve bütirat kolondaki bakteriyal fermentatif reaksiyonların majör son ürünleridir. Bütün kısa zincirli yağ asitlerinin sindirim kanalının alt kısımlarında absorbe edilmesi tuz ve su emilimi ile stimüle edilmektedir. Daha sonra bu kısa zincirli yağ asitleri genellikle bağırsak epitelyumu, karaciğer ve kaslar tarafından metabolize edilmektedir. Bu bileşiklerin intestinal epitelyumdaki besleyici etkisi çok önemlidir. Bunlardan en ilgi çekici olan bütirat kolonik epitelyum için enerji kaynağıdır ve hücre gelişimi ve farklılaşmasını düzenler. Eğer bifidobakteriler direk olarak bütirat üretmezse laktat üretilir ve bu daha sonra bütirata çevrilir. Bifidobakteriler ayrıca fermentasyon ürünlerine ek olarak vitamin de sentezlemektedir (genellikle B vitamini). Bu sayede bifidobakteriler fermentasyon sonucunda açığa çıkan bu metabolitlerle sindirim kanalındaki epitel hücrelerini için yararlı etkilerini göstermektedirler.

Bifidobakteriler sindirim kanalında beraber yaşadıkları bazı zararlı mikroorganizmalara karşı inhibitör maddeler üretmektedirler. Bu maddelerin üretimi sayesinde hastalık yapıcı mikroorganizmaların bağırsaklardaki kolonizasyonu engellenmektedir. Örneğin *Bifidobacterium infantis* suşunun patojenlerin gelişimini inhibe eden, asit üretimiyle bağlantısı olmayan, geniş spektrumlu etkisi olan antimikrobiyal bir bileşik üretmektedir. Yapılan diğer çalışmalarda bifidobakter suşlarının kültür süpernatantlarındaki antimikrobiyal içeriklerin varlığı gösterilmiştir. Fujiwara ve ark. *Bifidobacterium longum* SBT 2928 suşunun in vitro koşullarda kolonizasyon faktör adezyon II molekülünü gangliotetraasilseramid GA1 molekülüne çevirerek enterotoksijenik *Escherichia coli* Pb176 suşunun adhezyonunu inhibe eden bir protein molekülü sentezlediğini bulmuşlardır [Fujiwara ve ark., 1997].

Bifidobakteriler epitel hücrelerindeki bağlanma bölgeleri için patojenik virüsler veya bakterilerle yarışarak patojen bakterilerin bu bölgelere bağlanmalarını engellemekte, bu sayede dolaylı olarak da inhibitör etkilerini göstermektedirler.

Sindirim yoluyla vücuda alınan bakterilerin immün sistem ile ilk etkileşimi gut-bağılantılı lenfoid dokularla (GALT) olur. İnsan bağırsağı vücuttaki en büyük lenfoid doku kütesine sahiptir. Mukozal immün sistemin farklı bileşenleri ekzojen antijenlere karşı spesifik olarak odaklanarak rol oynar. Bol miktarda antikor üreten bu savunmadaki ilk hat salgılanan IgA sistemidir. Salgılanan antikorların ana fonksiyonu immünolojik olmayan savunma mekanizmaları ile birlikte yayılan patojenik mikroorganizmaların penetrasyonu ve epitelyuma tutunmayı engelleyerek yabancı antijenlerin uzaklaştırılmasıdır. Sindirim sistemindeki floranın bağışıklıktaki rolü çok önemlidir. Bakteriler spesifik sistemik ve lokal immün yanıtı ortaya çıkaran antijenleri oluştururlar.

Birçok probiyotiğin immün sistemi spesifik olmayan şekilde düzenlediği birçok çeşit antijene karşı oluşan artan immün yanıtı bakılarak anlaşılmıştır. 3 hafta boyunca 14 gönüllüye *B. bifidum* Bb12 (1×10^{10} CFU/ gün) ve *Lactobacillus acidophilus* La1 (7×10^{10} CFU/gün) verilmiş ve fagositik aktiviteli periferel beyaz kan hücrelerinin iki katına çıktığı görülmüştür [Schiffrin ve ark., 1995]. Yapılan başka bir çalışmada yine bu bakterilerin kolonik inflamatuvar infiltrasyonu redüklediği görülmüştür [De Simone ve ark., 1992]. Moreau ve ark. ELISA ve ELISPOT kullanarak yaptıkları çalışmalarda intestinal IgA antirotavirüs antikor yanıtını ölçerek farelerde *B. animalis* DN-173 O10 suşunun immün düzenleyici etkisini görmüşlerdir [Moreau, 2000].

Tüm intestinal epitelyum normal intestinal mikroflora ile birlikte patojenik bakterilerin, antijenlerin ve diğer zararlı bileşiklerin sindirim boşluğundan kana geçmesini engelleyici bir bariyer olarak görev yapmaktadır [Gomes ve Malcata, 1999]. Eğer buradaki epitelyum zarar görür ya da mikroflora bozulursa patojen bakteriler, antijenler ve zararlı diğer bileşikler bu bölgelere yerleşebilir hatta kan damarlarına ulaşp kana karışarak daha kötü sonuçlara sebep olabilirler. Bu yüzden

sindirim kanalındaki mikrofloranın üstlendiği görev çok önemlidir. Sindirim sisteminin akut enfeksiyonları genellikle diyare ve kusma ile karakterize edilmektedir. Bu enfeksiyonların esas etkenleri virüsler ve bakterilerdir. Rotavirüs akut çocuk diyaresine yol açmaktadır. Birçok klinik çalışmada özellikle çocuklarda rotavirüs ile ilişkili akut diyare üzerine probiyotiklerin etkisine bakılmıştır. Bifidobakter eklenmiş süt ile beslenenlerin semptomatik rotavirüs enfeksiyonlarına karşı korunduğu ve bebeklerde diyarenin azaldığı görülmüştür [Saavedra ve ark., 1994].

Gastrointestinal alanda zaten var olan bifidobakterilerin sindirim kanalındaki sayısını, yoğunluğunu ve etkinliğini artırmak için birçok araştırma yapılmıştır. Bunun için canlı mikroorganizmaların genellikle süt ve süt ürünleriyle alınması ya da bağırsak floramızda var olan bifidobakterilerin sayısını artırabilecek katkılar alınmasıdır. Kolon bakterilerinden birinin veya az bir kısmının çoğalmasını veya aktivitesini etkileyerek yararlı bir etki oluşturan sindirilemeyen katkı maddeleri olarak tanımlanan prebiyotikler sindirim kanalındaki bifidobakterilerin sayısını artırmak için kullanılmaktadır. Bu prebiyotikler içerisinde en çok çalışılmış olan prebiyotikler fruktooligosakkaritler, oligofruktoz, inülin, galaktoligosakkaritler, laktuloz ve laktiloldür [Gibson ve Wang, 1994]. Bu prebiyotikler genellikle bitkisel ürünlerde bulunmaktadır [Collins ve Gibson, 1999]. Bu prebiyotikler gıdalar yoluyla vücuda alındığında sindirim kanalında yerleşik olarak bulunan bifidobakterilerin üremesini stimüle etmektedirler. Son yıllarda yapılan çalışmalarda fermente süt ürünleri içerisinde bulunan klasik propiyonik asit bakterilerinin de bifidobakterilerin gelişimini uyardığı belirlenmiştir.

2.8.3. Propiyonik asit bakterilerinin bifidobakterilerin gelişimini düzenleyici (BGD) etkisi

İnsan kalın bağırsağında bulunan bifidobakterilerin intestinal alanda birçok yararlı etkisinin olduğu belirlenmiştir. İnsan sağlığı için bu kadar yararlı olan bir mikroorganizmanın gastrointestinal sistemdeki sayısının ve yararlı özelliklerinin artışının sağlanması için bugüne kadar çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Gaita veya

gastrointestinal sistemin alt bölgelerindeki bifidobakteriyal populasyon emilemeyen fermente karbonhidratlar veya diğer ek besinlerin alımıyla artmaktadır [Picard ve ark., 2005].

İlk olarak Kaneko ve arkadaşları 1994 yılında yaptıkları çalışmada propiyonik asit bakterilerinin bifidobakterilerin gelişimini düzenleyici bir molekül ürettiklerini (BGD) tespit etmişlerdir. Bu çalışmada *P. freudenreichii* 7025 kültürünün hücresiz filtratının eklenmesiyle çalışmada kullanılan bütün bifidobakterilerin gelişiminin arttığı gözlemlenmiş ve bu hücresiz filtratın diğer intestinal bakterilerin gelişimini düzenlemediği görülmüştür. Araştırmacılar bu etkiye bifidobakterilerin gelişimini düzenleyici (BGD) etki; bu etkiye sebep olan moleküle de bifidobakterilerin gelişimini düzenleyen (BGD) moleküller olarak tanımlamışlardır. Propiyonik asit bakterilerinin ürettikleri asetat ve propiyonat gibi organik asitlerin de bifidobakterilerin gelişimini düzenlemede etkilerinin bulunmasına rağmen BGD'nin bu organik asitlerden farklı bir molekül olduğunu söylemişlerdir. Yine propiyonik asit bakterilerinin B12 vitamini gibi bifidobakterileri geliştirici bir molekül üretmesine rağmen bu molekülün hücresiz filtratlarda bulunmaması BGD aktivitesinin bu molekülden kaynaklanmadığını göstermektedir. Bu araştırmacılar aynı zamanda BGD molekülünün az miktarda sentezlenmesine rağmen aktivitesinin yüksek olduğunu söylemişlerdir. Bunun sebebini ise bu molekülün ısıya, proteolitik enzimlere ve geniş pH aralığına dayanıklı olmasına bağlamışlardır. Bu da bize bu molekülün kalın bağırsakta aktivite gösterirken yapısının bozulmadan kalabileceğini göstermektedir. Ayrıca bu çalışmada BGD'nin moleküler kütlesinin 3000 kDA'dan küçük olduğu ve BGD aktivitesinin sıcaklık, pH ve çeşitli enzim uygulamalarından etkilenmediği gözlemlenmiştir [Kaneko ve ark., 1994]. Buna göre BGD aktivitesi pronaz, karboksipeptidaz A, nükleaz P₁ ve ribonükleaz A ile muameleden etkilenmemektedir. BGD aktivitesinin 10°C'de 28 gün bekletildiği zaman pH 2–8 aralığında stabil kalabildiği görülmüştür. Buna karşın 121°C'de 15 dakika sıcaklık ile muamelenin BGD aktivitesini bir miktar düşürdüğü görülmektedir. Bu çalışmada ayrıca bazı kısa zincirli yağ asitlerinin de test mikroorganizmalarının gelişimini düzenlemesine bakılmıştır. Propiyonat, asetat ve bütirat gibi kısa zincirli yağ asitlerinin intestinal bakteriler içerisinde özellikle gram negatif fakültatif ve zorunlu

anaerob mikroorganizmaların gelişimi için yüksek oranda inhibitör etki gösterdiğini belirlemişlerdir. Buna rağmen kısa zincirli yağ asitleri, özellikle propiyonatın bifidobakterilerin gelişimini düzenlediği görülmüştür. BGD etkisi propiyonik asit bakterileri kültürlerinin hücresiz filtratlarında ve hücrelerin metanol ekstraktlarında belirlenirken metanolle muamele edilmiş hücrelerin sonikasyonu ile elde edilen hücre ekstraktlarında böyle bir etki tespit edilememiştir. Bu durum BGD moleküllerinin periplasmada bulunduğunu ve buradan da kültür ortamına verildiğini göstermektedir.

1997 yılında Mori ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *P. freudenreichii*'nin ürettiği BGD saflaştırılmış ve kimyasal yapısı belirlenmiştir. Bu çalışmada BGD üretiminin en yüksek olduğu zaman aralığı propiyonik asit bakterilerinin gelişiminin 72-96 saatleri olarak belirlenmiştir. Silika jel kromatografisi, Sephadex LH-20 kolon kromatografisi ve HPLC ile 1738 g liyofilize *P. freudenreichii*'den 7,1 mg BGD molekülü saf bir şekilde elde edilmiştir. Saflaştırılan BGD molekülünün özelliklerine bakıldığında ise yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi ile BGD'nin kütlelerinin 217,037 olduğu moleküler formülünün $C_{11}H_7NO_4$ olduğu, organik çözücülerde düşük miktarda çözünmediği ve kimyasal yapısının 2-amino-3-karboksi-1,4-naftokinon (ACNQ) olduğu tespit edilmiştir [Mori ve ark., 1997].

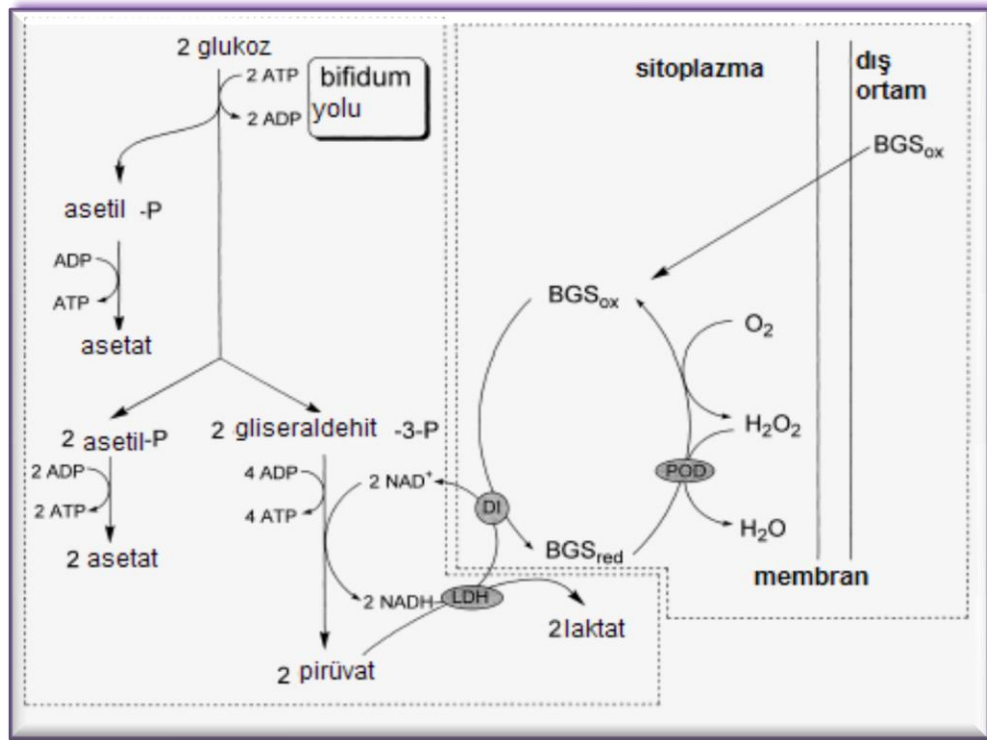
1998 yılında Yamasaki ve arkadaşları fizikokimyasal karakterizasyonunu baz alarak BGD'nin rolü üzerine mekanik çalışmalar yapmışlardır. Yapılan bu çalışmaya göre BGD_{ox} (BGD'nin yükseltgenmiş hali) bifidobakterilerin sitoplazması içerisine girmekte, NAD⁺'nin oluşması için bazı enzimler veya diaforaz yoluyla indirgenmektedir. Sitoplazma içerisindeki BGD_{red}'nin (BGD'nin indirgenmiş hali) artan hidrofiliklik yüzünden membrandan taşınması zordur. Sitoplazma içerisinde, peroksidaz ile BGD_{red} yükseltgenirken H₂O₂ üretilen otooksidasyon yoluyla BGD_{ox} oluşturulur. Daha sonraki önemli basamaklar ise şu şekilde gerçekleşir : (1) NAD⁺ pirüvat harcanmadan oluşturulur, (2) otooksidasyon ile oluşan muhtemel sitotoksik etkili aktif oksijen türleri (H₂O₂) peroksidaz reaksiyonu ile minimize edilir, (3) sitoplazmadaki birikimi ve mediatör olarak görev yapmasından dolayı BGD çok az miktarlarda bile etkilidir. Bifidobakterilerin metabolik yolu olan bifidum yolunda

çok önemli bir molekül olan NAD^+ bu sayede pirüvat harcanmadan düzenlenlenmiş ve görevini yapmış olur. Bu reaksiyonlar Resim 2.3'te gösterilmektedir. BGD'nin bifidobakterileri geliştirici etkisinin mekanizması bu çalışmada ortaya konmuştur [Yamasaki ve ark., 1998].

2002 yılında Isawa ve arkadaşları yaptıkları çalışmada *P. freudenreichii* ET-3 suşu tarafından üretilen yeni bir BGD molekülü bulmuşlar ve tanımlamışlardır. BGD Diaion HP-20 kolon kromatografisi ve HPLC kullanılarak saflaştırılmıştır. H-NMR, UV ve LC-ESI-MS içeren spektroskopik yöntemlerle BGD'nin kimyasal yapısının 1,4-dihidroksi-2-naftoik asit (DHNA) olduğunu tespit etmişlerdir [Isawa ve ark., 2002]. Bu çalışma sonucunda BGD etkisine ACNQ molekülü ile birlikte DHNA molekülünün de sebep olduğu ortaya çıkarılmış olmuştur.

Satomi ve arkadaşlarının 1999 yılında yaptıkları çalışmada BGD içeren *P. freudenreichii* kültür tozunun belirli periyotlarda alımıyla sağlıklı insanların fekal örneklerinde bifidobakteriyel hücrelerin görülme sıklığının fazla miktarda arttığını belirlemişlerdir [Satomi ve ark., 1999].

Warminska-Radyko ve arkadaşları 2002 yılında yaptıkları çalışmada 27 propiyonik asit bakterisi suşunun 6 farklı bifidobakteri suşunun ve 4 farklı gram negatif basilin gelişimini etkilemesi üzerine araştırmalar yapmışlardır. Sonuçta çalışmada kullanılan bütün propiyonik asit bakterilerinin 3 ila 6 bifidobakteri suşunun gelişimini artırdığı görülürken gram negatif basillere karşı antimikrobiyal metabolitler ürettiği gözlemlenmiştir. Bazı propiyonik asit bakteri suşlarının ise bifidobakterilerin gelişimini etkilemediği görülmüştür. Bu durum mikroorganizmaların gelişimini artırıcı ya da inhibe edici özelliklerin çalışılan suşlara göre değişebileceğini kanıtlamaktadır.



Resim 2.3. Bifidobakterilerin metabolik yolu (bifidum yolu) ve BGD'nin rolü için önerilen mekanizma. DI, diaforaz; LDH, laktat dehidrogenaz; POD, NADH peroksidaz [Yamasaki ve ark., 1998]

Hojo ve arkadaşları tarafından BGD'nin gaita kalitesi ve sıklığı üzerine etkisine bakılmıştır. *P. freudenreichii* kültürü içeren tabletlerin alımının intestinal mikroflorayı geliştirerek kabızlık sorunu çeken bayanların defekasyon sayısını artırdığını görmüşlerdir [Hojo ve ark., 2002].

Son yapılan çalışmalarda da 4 hafta boyunca BGD tableti alımı hiçbir yan etki göstermeden aktif ülseratif koliti olan hastaların iyileşmesi endoskopik ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir [Suzuki ve ark., 2006].

3.MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve çözeltiler

Propiyonik asit bakterileri kültürlerinin geliştirilmesinde yüzde asitlik, organik asit üretimi, antimikrobiyal aktivite ve bifidobakterilerin gelişimini düzenleyici etkisinin araştırılması için iki farklı besiyeri kullanılmıştır. Bunlardan ilki modifiye yeast ekstrakt sodyum laktat besiyeri (YEL-G, bkz Çizelge 3.1); diğeri ise modifiye skimmilk besiyeridir (SM, bkz Çizelge 3.2).

Çizelge 3.1. Modifiye yeast ekstrakt sodyum laktat besiyeri (YEL-G) içeriği

Maddeler	1000 mL için
Yeast Extract	5,0 g
Pepton (Pankreatik enzimlerle parçalanmış)	2,0 g
Potasyum dihidrojen fosfat	10,0 g
Hemin	10,0 ml
Tween 80	1,0 ml
Glukoz	20,0 g

Çizelge 3.2. Modifiye skimmilk besiyeri (SM) içeriği

Maddeler	Miktar (%)
Skimmilk	10,0
Yeast extract	0,5
Glukoz	1,0

YEL-G besiyeri için maddeler tartılıp distile su ile 1000 ml'ye tamamlanıp maddelerin çözülmesi sağlandıktan sonra pH $7,2 \pm 0,02$ 'ye ayarlanmıştır. Besiyeri otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir.

Modifiye skimmilk besiyeri için maddeler tartılarak son hacim 100 ml olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır. Besiyeri otoklavda 121 °C'de 5 dakika steril edilmiştir.

EPS üretimi deneyinde propiyonik asit bakterileri kültürlerini geliştirmek için yeast ekstrakt sodyum laktat besiyeri (E-YEL, bkz Çizelge 3.3) farklı bir modifikasyon yapılmış yeast ekstrakt sodyum laktat besiyeri (E-YEL-G, bkz Çizelge 3.3) ve içeriği Çizelge 3.2’de verilmiş olan modifiye skimmilk besiyeri kullanılmıştır. Koagregasyon çalışmasında propiyonik asit bakterileri kültürlerini geliştirmek için E-YEL-G besiyeri, antimikrobiyal aktivite ve koagregasyon çalışmalarında patojen mikroorganizma kültürlerini geliştirmek için nutrient sıvı besiyeri (bkz. Çizelge 3.4) kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. Modifiye yeast ekstrakt sodyum laktat besiyerleri (E-YEL ve E-YEL-G)

Maddeler	E-YEL (1000 ml için)	E-YEL-G (1000 ml için)
Pepton (pankreatik enzimlerle parçalanmış)	10,0 g	10,0 g
Yeast Ekstrakt	10,0 g	10,0 g
Sodyum laktat	10,0 ml	10,0 ml
Potasyum dihidrojen fosfat	0,25 g	0,25 g
Manganez sülfat	0,005 g	0,005 g
Glukoz	-	20 g

E-YEL ve E-YEL-G besiyerleri için maddeler tartılarak distile su ile 1000 ml’ye tamamlanmıştır. Maddelerin çözülmesi sağlandıktan sonra pH $7,00 \pm 0,02$ ’ye ayarlanarak otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edilmiştir.

Çizelge 3.4. Nutrient sıvı besiyeri

Maddeler	Miktar (1000 ml için)
Pepton	10 g
Et özütü	10 g
Sodyum Klorür	5 g

Nutrient sıvı besiyeri için maddeler tartılarak distile su ile 1000 ml’ye tamamlanmıştır. Besiyerinin pH’sı $7,00 \pm 0,02$ ’ye ayarlanmıştır. Katı besiyeri hazırlamak için besiyerine %1,5 oranında agar (Merck) eklenmiştir. Otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edilmiştir.

Bifidobakteri kültürlerinin geliştirilmesinde trypticase phytone yeast extract (TPY) besiyeri kullanılmıştır. Çizelge 3.5'te verilen maddeler tartılarak distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Besiyerinin pH'sı $6,00 \pm 0,02$ 'ye ayarlanmıştır. Katı besiyeri hazırlamak için besiyerine % 1,5 oranında agar eklenmiştir. Otoklavda $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika steril edilmiştir.

Çizelge 3.5. TPY sıvı besiyeri içeriği

Maddeler	Miktar (g/L)
Pepton	7,0
Soya pepton	5,0
Yeast ekstrakt	5,0
Glukoz	15,0
L-sistein	0,5
K₂HPO₄	2,0
MgCl₂.6H₂O	0,5
ZnSO₄.7H₂O	0,25
CaCl₂	0,15
FeCl₃.6H₂O	0,001
Tween 80	1,0 ml
Glasiyel asetik asit	1,0 ml

Çalışmada kullanılan PBS (Phosphate Buffer Saline) tamponu için Çizelge 3.6'da verilen maddeler tartılarak distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. pH $6,20 \pm 0,02$ 'ye ayarlandıktan sonra otoklavda $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika steril edilmiştir.

Çizelge 3.6. PBS (Phosphate Buffer Saline) tamponu

Maddeler	Miktar (g/L)
NaCl	8,0
K₂HPO₄	1,21
KH₂PO₄	0,34

3.1.2. Çalışmada kullanılan bakteriler

Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonu içerisinde bulunan suşlar içerisinde fizyolojik ve biyokimyasal testleri API 20A, 20E ve 50CH ile yapılmış, 16S rDNA dizilerine göre moleküler tanımlamaları yapılmış ve çeşitli tiplerde yöresel peynirlerden izole edilmiş 31 adet propiyonik asit bakterisi kültürü; yenidoğan gaitasından izole edilmiş ve 16S rDNA dizilerine göre tanımlamaları yapılmış 4 adet bifidobakter kültürü (*Bifidobacterium breve* A28, *B. breve* A10, *B. breve* BASO1 ve *B. longum* BASO20) ile standart patojen suşlardan *Escherichia coli* ATCC 35218 ile *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşları kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan propiyonik asit bakterilerinin türlere göre dağılımı Çizelge 3.7’de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Çalışmada kullanılan propiyonik asit bakterilerinin türlere göre dağılımı

Suş Kodu	Tür İsmi
10-1	<i>Propionibacterium freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>
21	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>
24	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>
30-1	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>
30-2	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>
30-6	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>
31-3	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>
31-4	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>
39	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>
43-3	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>
56-2	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>
56-3	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>
57	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>
58	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>
61	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>
76	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>
10-2	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>
28	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>
30-3	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>
40	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>
41	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>
43-4	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>
43-5	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>

Çizelge 3.7. (Devam) Çalışmada kullanılan propiyonik asit bakterilerinin türlere göre dağılımı

Suş Kodu	Tür İsmi
45	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>
6	<i>P. jensenii</i>
IT	<i>P. jensenii</i>
KGN	<i>P. jensenii</i>
71	<i>P. jensenii</i>
73	<i>P. jensenii</i>
72	<i>P. thoenii</i>
75	<i>P. acidipropionici</i>

3.2. Metot

3.2.1. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları

Propiyonik asit bakterileri kültürleri uygun besiyerine %2 oranında aşılandıktan sonra 30 °C ve %10 CO₂'li ortam sağlayan etüvde (Sanyo) 4 gün geliştirilmiştir. Bifidobakteri kültürleri anaerobik jar (Oxoid, Anaerobar) içerisinde 37 °C'de ortamın %10 CO₂'li olmasını sağlayan anaerobik kit (Oxoid, Anaerobik generating kit) kullanılarak 24-72 saat geliştirilmiştir. Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kullanılan patojen mikroorganizmalar nutrient besiyeri içerisinde 37 °C'de 24 saat geliştirilmiştir. Yapılan tüm çalışmalarda iki kez aktifleştirilmiş kültürler kullanılmıştır.

3.2.2. Kültürlerin farklı besiyerlerindeki pH ve yüzde asit üretimlerinin belirlenmesi

Aktif propiyonik asit bakterisi kültürleri modifiye skimmilk (SM) ve modifiye yeast ekstrakt sodyum laktat (YEL-G) besiyerlerine %2 oranında aşılanmış ve inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda kültür besiyerinin pH değerleri ölçülmüştür.

Kültürlerin pH değerleri ölçüldükten sonra 10 ml kültür, distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. 250 ml cam erlene aktarılan karışım üzerine 2-3 damla fenolfitaleyn

indikatörü damlatılarak 0,1 NaOH (Merck) çözeltisi ile titre edilmiştir. Harcanan NaOH miktarına göre bakterilerin ürettiği asit titre edilebilir yüzde asitlik olarak hesaplanmıştır [Demirci ve Gündüz, 1994].

3.2.3. Kültürlerin ürettiği organik asitlerin tayini

Yüzde asit üretimi yüksek olan suşlar organik asit tayini için seçilmiştir. Propiyonik asit bakterilerinin ürettiği laktik, asetik ve propiyonik asit miktarını tayin edebilmek için SM ve YEL-G besiyerlerinde geliştirilen kültürler 15 dakika 10 000 rpm’de santrifüj (Elektro mag) edilmiştir. Süpernatant steril ependorf tüpleri içerisine 0,45 µm por çaplı filtreden geçirilerek alınmıştır. Örnekler organik asit analizine kadar -20°C’de saklanmıştır.

Analizler Varian ProStar model HPLC’ de yapılmıştır. MetaCarb 87H (300 x 7,8 mm) (VARIAN, Part No: A5210, Serial No: 05511338) tipinde kolon kullanılmıştır. Mobil faz, 0,008 N H₂SO₄’ den oluşmuştur. 35 °C sıcaklıkta, 0,5 mL/dk’ lık akım hızında ve 210 nm absorbandsda okunmuştur. Örnekler PDA Dedektör (VARIAN ProStar, Model 330) tipinde detektör ve VARIAN ProStar 410 tipi otomatik örnekleyici kullanılarak analiz edilmiştir. Enjeksiyon hacmi 25 µl’ dir. Analiz için gerekli olan asit standartların HPLC’ ye belli miktarlarda saf konsantrasyon serileri verilerek, standart konsantrasyon doğruları elde edilmiştir. Standartlar: 5, 2,5, 1, 0,5, 0,25, 0,1, 0,05 ve 0,025 mg/ml’ lik laktik, asetik, propiyonik asitler distile suda çözülerek hazırlanmıştır [Woscow ve Glatz, 1991].

3.2.4. Kültürlerin ekzopolisakkarit (EPS) üretimlerinin belirlenmesi

Aktif kültürlerin optik yoğunlukları spektrofotometrede (Digilab Hitachi U-1800) 600 nm dalga boyunda $0,600 \pm 0,002$ ’ye ayarlanarak SM, E-YEL ve E-YEL-G besiyerlerine %2 oranında aşılanmıştır. 7 gün inkübasyon sonunda kültürlerden 1’er ml ependorf tüplerine alınarak 100 °C’de 15 dakika kaynatılmıştır. Örnekler oda sıcaklığına geldikten sonra üzerine %17 oranında %85’lik TCA çözeltisi eklenerek 13,000 rpm’de 25 dakika santrifüj edilmiştir [Frengova ve ark., 2000]. Süpernatant

temiz bir ependorf tüpüne alınarak üzerine eşit hacimde etanol eklenmiştir. Örnekler 15 dakika 13,000 rpm’de santrifüj edilmiş ve EPS’nin presipite olması sağlanmıştır. Presipite olan örnekler 1 ml distile suda çözüldükten sonra üretilen EPS miktarının tayini için fenol sülfirik asit metodu uygulanmıştır [Dubois ve ark., 1956].

Fenol sülfirik asit metodu:

Örneklerin üzerine 0,5 ml fenol (Sigma) ve 5 ml sülfirik asit (Merck) eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra iyice karıştırılmış ve 30°C’de 15-20 dakika bekletilmiştir. Örneklerin optik yoğunlukları 490 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Kültürlerin ürettiği EPS miktarlarını hesaplamak için 5-100 mg/L arasında değişen oranlarda glukoz çözeltisi kullanılarak standart çıkarılmış ve bu standarda göre üretilen EPS miktarı mg/L cinsinden belirlenmiştir [Torino ve ark., 2001].

3.2.5. Kültürlerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi

Aktif kültürlerin optik yoğunluğu spektrofotometrede (Digilab Hitachi U-1800) 600 nm dalga boyunda $0,600 \pm 0,002$ ’ye ayarlanarak 30 °C ve %10 CO₂’li ortamda 4 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kültürler 10,000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant 0,45 µm por çaplı filtreler kullanılarak steril edilmiştir.

Antimikrobiyal aktivitenin tespiti için kuyu difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada test bakterisi olarak *E. coli* ATCC 35218 ile *S. aureus* ATCC 25923 suşlarının nutrient sıvı besiyerinde 24 saat geliştirilmiş aktif kültürleri kullanılmıştır. Çalışma öncesinde aktif kültürlerin yoğunlukları Densimat (BIOMERIOUX) ile McFarland 0,5’e (10^8 cfu/ml) ayarlanarak steril petri kaplarına 50 µl aktarılmıştır. Bunun üzerine daha önceden otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edilmiş ve yaklaşık 50°C’ye kadar soğutulmuş nutrient katı besiyerinden 20 ml kadar ilave edilerek karıştırılmıştır. Daha sonra katı besiyerine kuyular açılmış ve kuyuların içerisine 100 µl propiyonik asit bakterilerinin süpernatantından ilave edilerek 37

°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyular etrafında oluşan inhibisyon zonlarının çapı kumpas yardımıyla ölçülmüştür [Reinheimer ve ark., 1990].

3.2.6. Kültürlerin otoagregasyon ve koagregasyon yeteneklerinin belirlenmesi

Kültürlerin otoagregasyon yeteneklerinin belirlenmesi Reniero ve ark.’nın (1992) metoduna göre yapılmıştır [Collado ve ark., 2008]. Bu metoda göre iki kez aktifleştirilmiş propiyonik asit bakterisi kültürleri 13,000 rpm’de 15 dakika iki kez PBS ile yıkanmış ve pellet yine PBS içerisinde süspanse edilmiştir. Yıkanan kültürlerin optik yoğunlukları 600 nm dalga boyundaki spektrofotometrede (Digilab Hitachi U-1800) optik yoğunluğu 0,600’e ayarlanmıştır. 4 saat oda sıcaklığında hareket ettirilmeden bekletilen süspansiyonun üst fazından alınan örneğin optik yoğunluğu spektrofotometrede 600 nm’de ölçülmüştür. Kültürlerin yüzde otoagregasyon değerleri $[1-(A_t/A_0)] \times 100$ formülüne göre hesaplanmıştır. Bu formülde A_t değeri 4 saat sonunda ölçülen optik yoğunluğu; A_0 değeri ise kültürlerin ayarlanan ilk optik yoğunluğu göstermektedir.

Kültürlerin koagregasyon yeteneklerinin belirlenmesi için Handley ve ark.’nın (1987) metodu kullanılmıştır [Collado ve ark., 2008]. Bunun için aktif propiyonik asit bakterileri ve patojen test bakterilerinin optik yoğunlukları yukarıda anlatıldığı gibi 600 nm’de 0,600’e ayarlanmıştır. Propiyonik asit bakterileri ve patojen test bakterilerinden eşit hacimlerde cam deney tüplerine alınmış ve homojen bir karışım elde edilmiştir. Karışık süspansiyonun optik yoğunluğu 600 nm’de ölçülmüştür. Bu süspansiyon oda sıcaklığında 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda karışımın optik yoğunluğu yine 600 nm’de ölçülmüştür. Kültürlerin % koagregasyon yetenekleri $[(A_{pat} + A_{probio}) - (A_{kar}) / (A_{pat} + A_{probio})] \times 100$ formülüne göre hesaplanmıştır [Malik ve ark., 2003]. Bu formülde $A_{pat} + A_{probio}$ değeri karışık bakteri süspansiyonunun inkübasyon öncesi optik yoğunluğunu; A_{kar} değeri ise süspansiyonun 4 saat sonraki optik yoğunluğunu göstermektedir.

3.2.7. Kùltürlerin bifidobakterilerin gelişimini düzenleyici (BGD) etkisinin belirlenmesi

Bu çalışmada BGD etkisinin belirlenebilmesi için propiyonik asit ve EPS üretimi yüksek olan 8 farklı propiyonik asit bakterisi suşu kullanılmıştır (Bkz. Çizelge 3.8). BGD etkisinin gelişimin hangi saatinde olduğunun belirlenebilmesi için propiyonik asit bakterilerinin 48 ve 96 saatlik kùltürleri kullanılmıştır. YEL-G besiyerinde aktifleştirilen propiyonik asit bakterisi kùltürleri inkübasyon sonunda 13,000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant 0,2 µm por çaplı disposable filtrelerden geçirilerek içerisinde 5 ml steril trypticase phytone yeast extract (TPY) sıvı besiyeri bulunan deney tüpleri üzerine 3 ve 5 ml aktarılmıştır. Kontrol grubundaki tüplere süpernatant yerine yine 3 ve 5 ml steril YEL-G besiyeri aktarılmıştır. Aktif bifidobakteri kùltürlerinin (Bkz. Çizelge 3.8) optik yoğunlukları 600 nm dalga boyundaki spektrofotometrede 0,600’e ayarlanmış ve hazırlanan tüplere %2 oranında aşılanmıştır. Örnekler 37°C’de ve %10 CO₂’li ortamda 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kùltürlerin canlılık değerleri seri dilüsyonlar yapılarak cfu/ml cinsinden hesaplanmıştır.

Çizelge 3.8. BGD aktivitesi çalışmasında kullanılan propiyonik asit bakterileri ve bifidobakteriler

Propiyonik Asit Bakterileri	Bifidobakteriler
<i>P. freudenreichii</i> spp. <i>freudenreichii</i> 21	<i>B. breve</i> A28
<i>P. freudenreichii</i> spp. <i>freudenreichii</i> 30-2	<i>B. breve</i> A10
<i>P. freudenreichii</i> spp. <i>shermanii</i> 28	<i>B. breve</i> BASO1
<i>P. freudenreichii</i> spp. <i>shermanii</i> 30-3	<i>B. longum</i> BASO20
<i>P. freudenreichii</i> spp. <i>shermanii</i> 40	
<i>P. freudenreichii</i> spp. <i>shermanii</i> 41	
<i>P. freudenreichii</i> spp. <i>shermanii</i> 43-4	
<i>P. thoenii</i> 72	

3.2.8. Sonikasyon, sıcaklık, asitlik ve bazı enzimlerin BGD aktivitesi üzerine etkisi

Sonikasyonun BGD aktivitesine etkisini belirleyebilmek için BGD etkisi yüksek çıkan 2 adet propiyonik asit bakterisi suşunun (*P. freudenreichii* ssp. *shermanii* 40 ve *P. thoenii* 72) 48 saatlik kültürleri ve bu etkinin görüldüğü bifidobakteri kültürleri (*B. breve* A28 ve *B. breve* BASO1) ile çalışılmıştır. YEL-G besiyerinde 2 kez aktifleştirilen propiyonik asit bakterisi kültürleri inkübasyon sonunda 5 dakika buz içerisinde sonike edilmiş ve 13,000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant 0,2 µm por çaplı disposable filtrelerden geçirilerek içerisinde 5 ml steril TPY sıvı besiyeri bulunan deney tüplerine 5 ml aktarılmıştır. Kontrol grubu için aktif propiyonik asit bakterilerinin süpernatantı yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Kontrol ve deney tüplerine optik yoğunluğu 600 nm'de 0,600'e ayarlanmış bifidobakteri kültürleri %2 oranında eklenmiş ve 37°C'de ve %10 CO₂'li ortamda 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kültürlerin canlılık değerleri seri dilüsyonlar yapılarak cfu/ml cinsinden hesaplanmıştır.

Sıcaklığın BGD aktivitesi üzerine etkisinin belirlenebilmesi için kültür süpernatantları 50, 80, 100 ve 121 °C' de 15 dakika bekletilmiş ve BGD etkisine 3.2.7'de belirtildiği şekilde bakılmıştır. Farklı pH değerlerinde BGD aktivitesinin etkilenip etkilenmediğini belirlemek için kültür süpernatantlarının pH'sı 2, 4, 6 ve 8'e ayarlanarak bu ortamda 5 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda BGD etkisine bakılmıştır. Farklı enzimlerin BGD aktivitesi üzerine etkisini araştırmak için kültür süpernatantları proteaz (Sigma), lipaz (Sigma), ribonükleaz A (Sigma), kimotripsin (Sigma) ve proteinaz-K (Fermentas) enzimleri ile 37°C' de 5 saat inkübasyona bırakılmış ve BGD aktivitesine yine 3.2.7'de belirtildiği şekilde bakılmıştır.

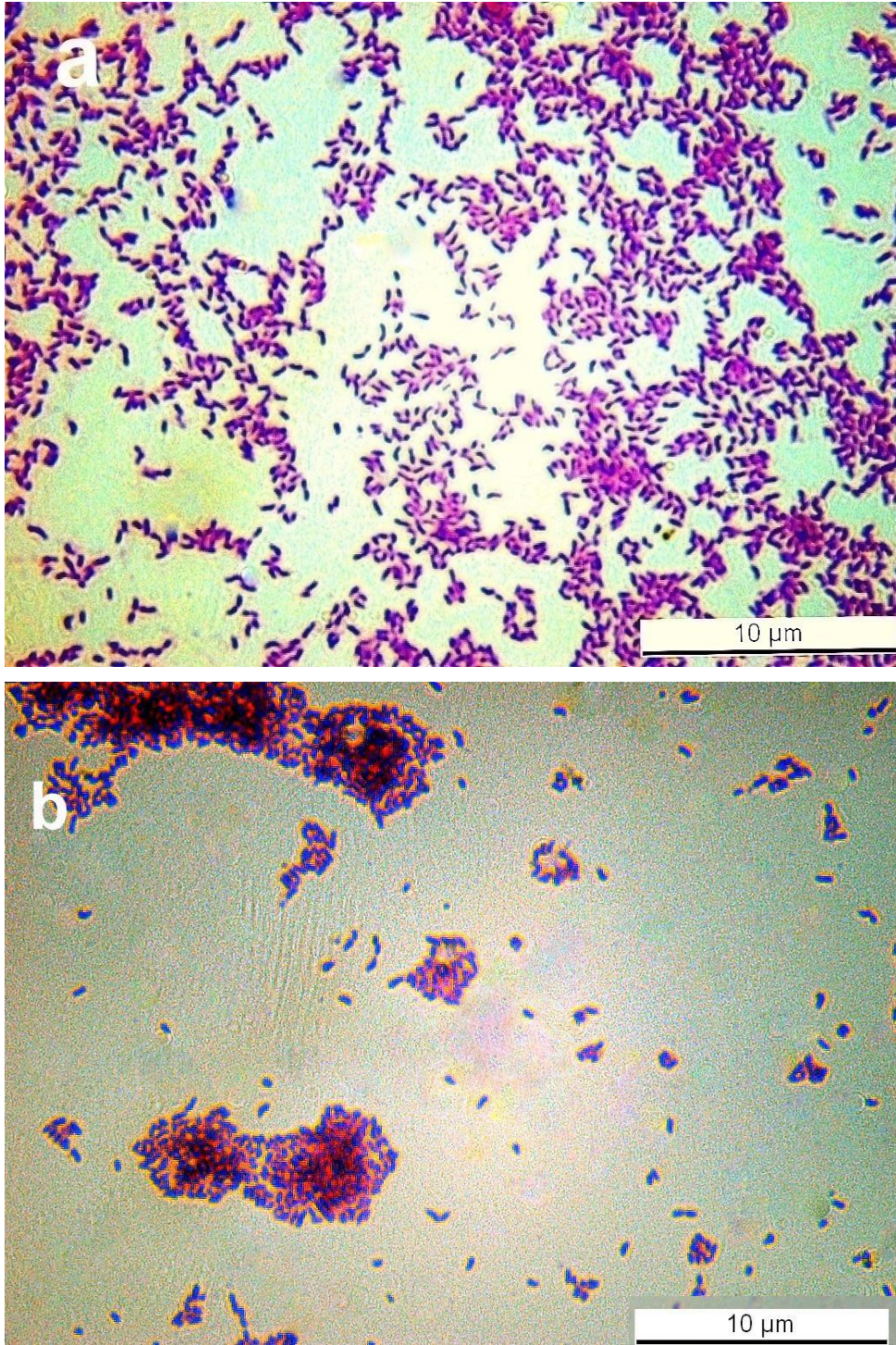
3.2.9. İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizlerde SPSS Inc. Software (16.0 Versiyonu; SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılmıştır. Pearson'un korelasyonuna göre, suşların yüzde asit üretimi-EPS üretimi, propiyonik asit üretimi-EPS üretimi, asit üretimi-antimikrobiyal aktivite, EPS üretimi-antimikrobiyal aktivite, EPS üretimi-otoagregasyon, EPS üretimi-koagregasyon, propiyonik asit üretimi-BGD aktivitesi, EPS üretimi-BGD aktivitesi ve çalışmada kullanılan farklı besiyerlerinde geliştirilen suşların aktiviteleri arasında korelasyon olup olmadığı incelenmiştir. Çalışmalarda kullanılan farklı besiyerlerindeki yüzde asit, EPS üretimi ve antimikrobiyal aktivite değerlerinde besiyerleri arasında anlamlı bir fark olup olmadığını belirleyebilmek için parametrik testlerden çift örnekli T testi, nonparametrik testlerden ise Wilcoxon işaret sıra testi ve Friedman testi ile kullanılmıştır. Örneklerin normal bir dağılıma sahip olup olmadığı bu analiz öncesinde tek örnekli Kolmogorov-Smirnov testi ile belirlenmiştir.

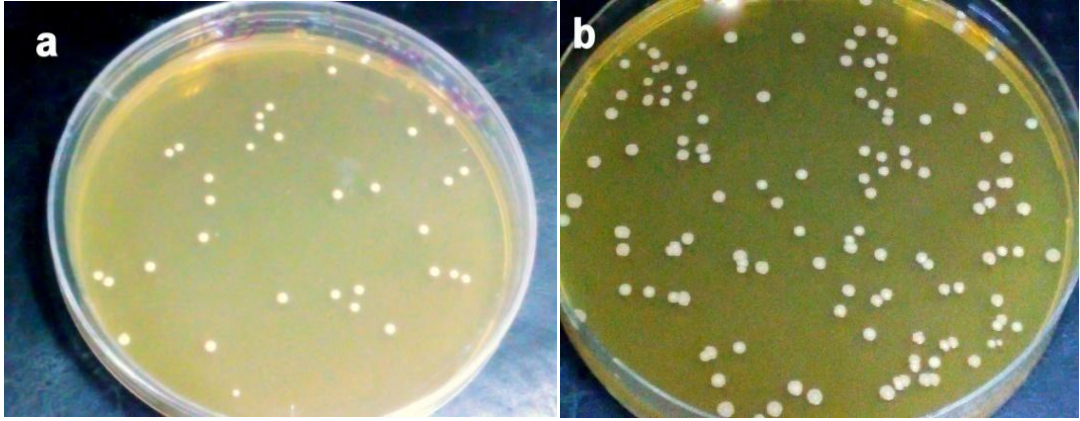
4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler

Bu çalışmada, 15 adet peynirden izole edilmiş propiyonik asit bakterisi cinsine ait 31 adet suş kullanılmıştır. Bu suşların fizyolojik, biyokimyasal testler ve moleküler düzeyde tanımlamaları gerçekleştirilmiştir ancak başka bir çalışma kapsamında yapıldığından sonuçlar bu tez çalışmasında verilmemiştir. Bu çalışma kapsamında kullanılan tüm mikroorganizmaların saf kültürlerinin kullanıldığı çalışmanın bütün aşamalarında mikroskopik inceleme yapılarak doğrulanmıştır. Peynirden izole edilmiş propiyonik asit bakterilerinin asit ve EPS üretim kapasiteleri ile antimikrobiyal aktiviteleri tüm suşlarda belirlendikten sonra diğer çalışmalarda bu yetenekleri yüksek olan suşlar kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan propiyonik asit bakterilerine ait bazı suşların gram boyama sonucunda ışık mikroskopundaki görüntüleri ve katı besi ortamındaki koloni morfolojileri sırasıyla Resim 4.1 ve 4.2’de gösterilmiştir.



Resim 4.1. Propiyonik asit bakterilerinin ışık mikroskopundaki görüntüleri (a- *P. jensenii* 6; b- *P. freudenreichii* spp. *shermanii* 40)



Resim 4.2. Propiyonik asit bakterilerinin YEL-G besiyerindeki koloni morfolojileri (a-*P. freudenreichii* spp. *shermanii* 28; b- *P. thoenii* 72)

4.2. Kùltürlerin Farklı Besiyerlerindeki pH ve Yüzde Asit Üretimleri

Çizelge 3.7’de belirtilen 31 adet propiyonik asit bakterisi kùltürünün SM ve YEL-G besiyerlerinde oluşturduğu pH ve ürettiği toplam asitlik 3.2.2’de anlatıldığı gibi belirlenmiştir. Suşların bu besiyerlerindeki pH ve yüzde asitlik değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir. Yapılan çalışmada SM besiyerinde geliştirilen suşların daha fazla asit ürettiği ve besiyerinin pH’sını YEL-G besiyerine oranla daha fazla düşürdüğu gözlemlenmiştir. Bu durumu ispatlamak için çift örnekli T-testi ile istatistiksel analiz yapılmış ve iki besiyerindeki asit üretimleri arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir. Suşların bu iki besiyerindeki yüzde asit üretimleri arasında % 65’lik doğrusal bir korelasyon olduğu gör÷lmektedir ve $p=0$ olduğundan bu ilişki kuvvetli bir şekilde anlamlıdır. Bu durum yüzde asit üretimi yüksek olan suşlar bu özelliği her iki besiyerinde de gösterdiğini belirtmektedir. Yüksek oranda asit üreten suşların bulunduğu besiyerinin pH’sının daha düşük olduğu gör÷lmüştür. Yüzde asit üretimi arttıkça pH düşmektedir. Son kùltür pH’sı ile yüzde asitlik arasında % 82’lik ters yönlü bir korelasyon bulunmaktadır. $P=0$ olduğundan bu ilişki kuvvetli bir şekilde anlamlıdır.

Her iki besiyerinde de yüzde asit üretimi en yüksek olan suşlar *P. freudendreichii* spp. *shermanii* 41 (SM’de % $1,58\pm0,00$; YEL-G’de % $1,04\pm0,00$) ve *P. freudendreichii* spp. *shermanii* 30-3 (SM’de % $1,59\pm0,10$; YEL-G’de % $0,77\pm0,06$)

olarak belirlenmiştir. En düşük asit üretimi ise *P. jensenii* 6 suşunda tespit edilmiştir (SM’de % $0,19 \pm 0,02$; YEL-G’de % $0,20 \pm 0,01$). Bütün şartların aynı olmasına rağmen asit üretiminin türlere göre dikkate değer bir farklılık göstermediği ve asit üretimindeki farklılıkların suş farklılığından kaynaklandığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar propiyonik asit bakterilerine ait sadece belirli türlerin asit üretiminin yüksek olduğunu değil, aynı tür içindeki farklı suşların bazılarının yüksek bazılarının ise düşük asit ürettiğini göstermektedir. Sonuç olarak bu verilere dayanarak asit üretimi için en verimli besiyeri olan modifiye skimmilk ve asit üretimi en yüksek suşlar olan *P. freudendreichii* spp. *shermanii* 41 ile *P. freudendreichii* spp. *shermanii* 30-3 önerilmektedir.

Çizelge 4.1. Propiyonik asit bakterisi kültürlerinin SM ve YEL-G besiyerlerindeki pH ve yüzde asitlik değerleri

Suş Kodu	Tür İsmi	SM Besiyeri		YEL-G Besiyeri	
		pH	% Asitlik	pH	% Asitlik
10-1	<i>P. freudendreichii</i> <i>spp. freudendreichii</i>	4,67 ± 0,02	0,60 ± 0,01	5,36 ± 0,01	0,27 ± 0,02
21	<i>P. freudendreichii</i> <i>spp. freudendreichii</i>	5,48 ± 0,01	0,23 ± 0,00	5,21 ± 0,03	0,21 ± 0,01
24	<i>P. freudendreichii</i> <i>spp. freudendreichii</i>	5,65 ± 0,02	0,20 ± 0,00	5,29 ± 0,03	0,29 ± 0,00
30-1	<i>P. freudendreichii</i> <i>spp. freudendreichii</i>	4,65 ± 0,01	0,88 ± 0,07	5,08 ± 0,04	0,23 ± 0,02
30-2	<i>P. freudendreichii</i> <i>spp. freudendreichii</i>	4,6 ± 0,04	0,98 ± 0,10	5,18 ± 0,03	0,30 ± 0,02
30-6	<i>P. freudendreichii</i> <i>spp. freudendreichii</i>	4,69 ± 0,03	0,72 ± 0,00	5,35 ± 0,01	0,21 ± 0,01
31-3	<i>P. freudendreichii</i> <i>spp. freudendreichii</i>	4,69 ± 0,03	0,74 ± 0,03	5,02 ± 0,05	0,35 ± 0,05
31-4	<i>P. freudendreichii</i> <i>spp. freudendreichii</i>	4,69 ± 0,03	0,65 ± 0,03	5,04 ± 0,01	0,25 ± 0,03
39	<i>P. freudendreichii</i> <i>spp. freudendreichii</i>	4,72 ± 0,01	0,77 ± 0,02	5,41 ± 0,02	0,24 ± 0,02
43-3	<i>P. freudendreichii</i> <i>spp. freudendreichii</i>	4,65 ± 0,02	0,81 ± 0,04	5,16 ± 0,08	0,31 ± 0,03
56-2	<i>P. freudendreichii</i> <i>spp. freudendreichii</i>	4,76 ± 0,01	0,64 ± 0,02	5,16 ± 0,01	0,34 ± 0,02
56-3	<i>P. freudendreichii</i> <i>spp. freudendreichii</i>	4,75 ± 0,02	0,75 ± 0,05	5,17 ± 0,01	0,27 ± 0,02
57	<i>P. freudendreichii</i> <i>spp. freudendreichii</i>	4,79 ± 0,02	0,87 ± 0,02	5,29 ± 0,01	0,30 ± 0,01
58	<i>P. freudendreichii</i> <i>spp. freudendreichii</i>	5,81 ± 0,01	0,21 ± 0,00	5,33 ± 0,03	0,33 ± 0,00
61	<i>P. freudendreichii</i> <i>spp. freudendreichii</i>	4,74 ± 0,02	0,84 ± 0,03	5,44 ± 0,02	0,29 ± 0,00
76	<i>P. freudendreichii</i> <i>spp. freudendreichii</i>	5,45 ± 0,03	0,31 ± 0,03	4,93 ± 0,03	0,19 ± 0,01 [#]
10-2	<i>P. freudendreichii</i> <i>spp. shermanii</i>	5,62 ± 0,01	0,19 ± 0,01	5,30 ± 0,01	0,26 ± 0,03
28	<i>P. freudendreichii</i> <i>spp. shermanii</i>	4,61 ± 0,02	0,90 ± 0,05	4,83 ± 0,03	0,46 ± 0,17
30-3	<i>P. freudendreichii</i> <i>spp. shermanii</i>	4,70 ± 0,05	1,59 ± 0,10 [*]	4,72 ± 0,04	0,77 ± 0,06
40	<i>P. freudendreichii</i> <i>spp. shermanii</i>	4,68 ± 0,02	0,90 ± 0,01	5,03 ± 0,03	0,39 ± 0,02
41	<i>P. freudendreichii</i> <i>spp. shermanii</i>	4,65 ± 0,03	1,58 ± 0,00	4,83 ± 0,01	1,04 ± 0,00
43-4	<i>P. freudendreichii</i> <i>spp. shermanii</i>	4,57 ± 0,01	0,99 ± 0,12	5,01 ± 0,00	0,41 ± 0,00

Çizelge 4.1. (Devam) Propiyonik asit bakterisi kültürlerinin SM ve YEL-G besiyerlerindeki pH ve yüzde asitlik değerleri

Suş Kodu	Tür İsmi	SM Besiyeri		YEL-G Besiyeri	
		pH	% Asitlik	pH	% Asitlik
43-5	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	4,73 ± 0,01	0,77 ± 0,06	5,03 ± 0,03	0,33 ± 0,04
45	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	4,78 ± 0,04	0,70 ± 0,08	4,93 ± 0,05	0,34 ± 0,04
6	<i>P. jensenii</i>	5,68 ± 0,02	0,19 ± 0,02	5,48 ± 0,05	0,20 ± 0,01
IT	<i>P.jensenii</i>	5,73 ± 0,04	0,22 ± 0,05	4,89 ± 0,02	0,38 ± 0,02
KGN	<i>P.jensenii</i>	5,29 ± 0,02	0,29 ± 0,02	5,23 ± 0,01	0,25 ± 0,01
71	<i>P. jensenii</i>	4,65 ± 0,01	0,97 ± 0,02	4,90 ± 0,02	0,20 ± 0,02
73	<i>P.jensenii</i>	5,26 ± 0,01	0,28 ± 0,03	4,56 ± 0,01	0,52 ± 0,01
72	<i>P. thoenii</i>	4,52 ± 0,01	1,16 ± 0,03	5,01 ± 0,01	0,60 ± 0,01
75	<i>P. acidipropionici</i>	4,64 ± 0,00	0,99 ± 0,04	5,17 ± 0,02	0,50 ± 0,02

* Pembe renk asit üretiminin yüksek olduğunu belirtmektedir.

Sarı renk asit üretiminin düşük olduğunu belirtmektedir.

4.3. Kültürlerin Ürettiği Organik Asit Miktarları

Yüzde asit üretimi yüksek olarak belirlenen suşlar SM ve YEL-G besiyerlerindeki organik asit analizi için seçilmiş 7 suşun organik asit analizi 3.2.3'te belirtildiği şekilde HPLC cihazı ile gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre yalnız üç suшта düşük miktarlarda laktik asit gözlenirken, (*P. freudendreichii* spp. *shermanii* 30-3, *P. freudendreichii* spp. *shermanii* 40 ve *P. thoenii* 72) bütün suşların asetik asit ve propiyonik asit ürettikleri saptanmıştır. Yine elde edilen verilere göre propiyonik asit üretiminin asetik asit üretimine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. En yüksek propiyonik asit üretimini SM besiyerinde geliştirilen *P. thoenii* 72 suşunun (15,50 ± 0,15 mg/ml) gerçekleştirdiği görülmüştür. Aynı suşun YEL-G besiyerinde en düşük miktarda propiyonik asit ürettiği belirlenmiştir (2,93 ± 0,00 mg/ml). Organik asit üretiminde bakterilerin geliştirildiği besi ortamının çok önemli olduğu belirlenmiştir. Aynı suşun farklı besi ortamlarında

geliştirilmesine bağlı olarak çok büyük farklar gösterebileceği bu çalışmanın önemli tespitlerinden biri olmuştur. Suşların ürettikleri asetik asit ve propiyonik asit miktarlarına bakıldığında her iki organik asit üretiminin de SM besiyerinde daha yüksek olduğu görülmektedir. Suşların yüzde asit üretiminin de SM besiyerinde daha yüksek olması asit üretimi için bu besiyerinin asit üretimi bakımından en uygun besiyeri olduğunu doğrulamaktadır.

Çizelge 4.2. Propiyonik asit kültürlerinin üretmiş olduğu organik asit miktarları

Suş Kodu	Tür Adı	Besiyeri	Laktik asit miktarı (mg/ml)	Asetik asit miktarı (mg/ml)	Propiyonik asit miktarı (mg/ml)
28	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	YEL-G	t.e.*	2,62 ± 0,01	5,90 ± 0,10
		SM	t.e.	5,42 ± 0,08	8,84 ± 0,02
30-2	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	YEL-G	t.e.	3,94 ± 0,03	6,66 ± 0,03
		SM	t.e.	6,11 ± 0,11	10,52 ± 0,19
30-3	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	YEL-G	2,48 ± 0,08	1,12 ± 0,00	3,41 ± 0,22
		SM	t.e.	5,31 ± 0,04	9,18 ± 0,11
40	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	YEL-G	t.e.	2,57 ± 0,09	6,47 ± 0,06
		SM	0,45 ± 0,02	4,20 ± 0,11	6,59 ± 0,29
41	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	YEL-G	t.e.	3,13 ± 0,03	7,04 ± 0,03
		SM	t.e.	5,76 ± 0,05	9,97 ± 0,24
43-4	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	YEL-G	t.e.	3,03 ± 0,01	7,32 ± 0,34
		SM	t.e.	5,25 ± 0,02	8,57 ± 0,15
72	<i>P. thoenii</i>	YEL-G	2,92 ± 0,02	2,35 ± 0,05	2,93 ± 0,00
		SM	2,86 ± 0,06	5,32 ± 0,08	15,50 ± 0,15

* t.e. = tespit edilemedi

4.4. Kültürlerin Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimleri

31 adet propiyonik asit bakterisi kültürünün SM, E-YEL, E-YEL-G besiyerlerindeki EPS üretimleri 3.2.4'te anlatıldığı şekilde belirlenmiştir. Buna göre tüm suşların ürettiği EPS miktarları Çizelge 4.3'te gösterilmiştir. Bu verilere göre suşların E-

YEL-G besiyerindeki EPS üretim kapasitesinin diğer besiyerlerine göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu besiyerinde E-YEL besiyerinden farklı olarak 20 g/L oranında glukoz bulunmaktadır. Bu durum propiyonik asit bakterilerinin EPS üretiminde glukozu daha etkili bir şekilde kullandığını göstermektedir. EPS üretimi en yüksek olan suş *P. freudendreichii* spp. *freudendreichii* 21 olarak belirlenmiştir (SM'de 53 ± 2 mg/L; E-YEL'de 121 ± 1 mg/L; E-YEL-G'de 148 ± 4 mg/L). Her ne kadar diğer besiyerlerinde yüksek EPS üretmese de *P. freudenreichii* spp. *shermanii* 43-4 suşu E-YEL-G besiyerinde yüksek EPS üreten diğer bir suştur (149 ± 3 mg/L). E-YEL-G besiyerinde en düşük EPS üretimi olan suşlar ise *P. freudenreichii* spp. *shermanii* 10-2 (25 ± 1 mg/L) ve *P. jensenii* IT (29 ± 7 mg/ml) olarak belirlenmiştir. EPS üretiminin türlere göre dağılımına bakıldığında genel olarak *P. freudenreichii* türünde EPS üretiminin diğer türlere göre daha yüksek olduğu görülse de aynı tür içerisinde EPS üretiminin değişmesi bu üretimin suşlara göre değişebildiğini ve EPS üretimi yüksek olan bakterilere karar verebilmek için türlere göre değil suşlara göre bir seçim yapılmasının gerektiğini göstermektedir. Tüm suşlar esas alındığında EPS üretimi bakımından en uygun besiyeri E-YEL-G olarak belirlenmiştir. Bu durumu desteklemek için Friedman testi uygulanmış ve bu çalışmada kullanılan besiyerlerindeki EPS üretimleri arasında anlamlı bir fark olduğu görülürken ($p=0$) EPS üretiminin en yüksek olduğu besiyerinin E-YEL-G olduğu doğrulanmıştır.

Çizelge 4.3. Propiyonik asit bakterisi kültürlerinin farklı besiyerlerinde ürettiği EPS miktarları

Suş Kodu	Tür İsmi	EPS Miktarı (mg/L)		
		SM	E-YEL	E-YEL-G
10-1	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	55 ± 2	51 ± 3	57 ± 1
21	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	53 ± 2	121 ± 1	148 ± 4
24	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	21 ± 2	68 ± 1	112 ± 1
30-1	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	49 ± 3	34 ± 1	101 ± 1
30-2	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	54 ± 1	103 ± 1	94 ± 4
30-6	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	49 ± 1	34 ± 1	49 ± 1
31-3	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	41 ± 2	35 ± 3	103 ± 3
31-4	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	44 ± 1	24 ± 1	114 ± 3
39	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	48 ± 2	70 ± 2	126 ± 3
43-3	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	82 ± 1	53 ± 2	85 ± 1
56-2	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	54 ± 1	29 ± 2	34 ± 1
56-3	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	54 ± 1	115 ± 1	132 ± 4
57	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	48 ± 1	61 ± 0	63 ± 1
58	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	77 ± 4	41 ± 5	89 ± 1
61	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	54 ± 2	93 ± 1	127 ± 2
76	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	53 ± 1	64 ± 1	52 ± 4
10-2	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	53 ± 2	50 ± 1	25 ± 1
28	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	52 ± 2	75 ± 3	60 ± 1
30-3	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	68 ± 2	31 ± 1	44 ± 2
40	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	78 ± 1	44 ± 1	64 ± 1
41	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	54 ± 2	56 ± 2	116 ± 7
43-4	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	65 ± 2	77 ± 5	149 ± 3

Çizelge 4.3. (Devam) Propiyonik asit bakterisi kültürlerinin farklı besiyerlerinde ürettiği EPS miktarları

Suşun Adı	Tür İsmi	EPS Miktarı (mg/L)		
		SM	E-YEL	E-YEL-G
43-5	<i>P. freudendreichii.spp. shermanii</i>	79 ± 2	35 ± 1	98 ± 5
45	<i>P. freudendreichii.spp. shermanii</i>	40 ± 1	26 ± 1	70 ± 0
6	<i>P.jensenii</i>	56 ± 1	41 ± 2	50 ± 8
IT	<i>P.jensenii</i>	49 ± 3	32 ± 2	29 ± 7
KGN	<i>P.jensenii</i>	69 ± 2	35 ± 1	80 ± 1
71	<i>P. jensenii</i>	55 ± 1	15 ± 1	82 ± 7
73	<i>P.jensenii</i>	53 ± 1	87 ± 3	85 ± 4
72	<i>P. thoenii</i>	54 ± 2	113 ± 1	131 ± 2
75	<i>P. acidipropionici</i>	50 ± 1	72 ± 4	85 ± 1

4.5. Kültürlerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

Propiyonik asit bakterilerinin *E. coli* ATCC 35218 ile *S. aureus* ATCC 25923 suşları üzerine antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi için 3.2.5.'te anlatılan yöntem uygulanmıştır. Bu yöntemde SM ve YEL-G besiyerlerinde geliştirilen kültürlerin etkilerine ayrı ayrı bakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre SM besiyerinde geliştirilen kültürlerin her iki test bakterisine de diğer besiyerinde geliştirilen kültürlerle göre daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durumu tespit edebilmek için çift örnekli T-testi ile istatistiksel analiz yapılmış ve bunun sonucunda antimikrobiyal açısından bu iki besiyeri arasında anlamlı bir fark görülmüş ve antimikrobiyal aktivitenin SM besiyerinde daha yüksek olduğu doğrulanmıştır. Ayrıca kültürlerin gram negatif bir mikroorganizma olan *E. coli* ATCC 35218'e karşı antimikrobiyal etkisinin gram pozitif mikroorganizmalar içerisinde yer alan *S. aureus* ATCC 25923'ten daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum propiyonik asit bakterilerinin inhibisyon etkisinin gram negatif bakterilere karşı daha etkili olduğunu göstermektedir. Kültürlerin *E. coli* ATCC 35218 suşuna karşı gösterdikleri

antimikrobiyal aktivite Çizelge 4.4'te; *S. aureus* ATCC 25923 suşuna karşı gösterdikleri antimikrobiyal aktivite ise Çizelge 4.5'te oluşan zon çapı cinsinden gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre *E. coli* ATCC 35218 suşuna karşı inhibisyon etkisi en yüksek olan suşlar SM besiyerinde *P. acidipropionici* 75 (zon çapı $0,85 \pm 0,02$ cm), YEL-G besiyerinde ise *P. freudenreichii* spp. *shermanii* 41 (zon çapı $0,48 \pm 0,00$); *S. aureus* ATCC 25923 suşuna karşı inhibisyon etkisi en yüksek olan suşlar ise SM besiyerinde *P. freudenreichii* spp. *freudenreichii* 31-4 (zon çapı $0,66 \pm 0,11$ cm), YEL-G besiyerinde ise *P. freudenreichii* spp. *freudenreichii* 30-1 (zon çapı $0,44 \pm 0,03$) olarak tespit edilmiştir. SM ve YEL-G besiyerinde geliştirilen *P. jensenii* 6 suşunun ve SM besiyerinde geliştirilen *P. jensenii* IT suşlarının *E. coli* ATCC 35218 üzerine; ayrıca SM besiyerinde geliştirilen *P. jensenii* 6, *P. jensenii* IT ve *P. jensenii* KGN suşlarının da *S. aureus* ATCC 25923 üzerine antimikrobiyal aktivite göstermediği tespit edilmiştir.

Antimikrobiyal aktivite çalışması sonucunda elde edilen verilere göre kültürlerin antimikrobiyal etkinliği suşa göre değişken olmakla birlikte kullanılan besiyerine göre de değişebilmektedir. Antimikrobiyal aktivitesi yüksek olan suşların büyük bir çoğunluğu yüzde asit üretimi de yüksek olan suşlardır. Bu durum istatistiksel analizlerle de doğrulanmış olup, asit üretimi ile antimikrobiyal aktivite arasında pozitif bir korelasyon ($p < 0,01$) belirlenmiştir. Asit üretimi düşük olan bazı suşların inhibisyon etkisinin yüksek olması ise bu suşların organik asitler dışında başka antimikrobiyal moleküller ürettiğini göstermektedir. Antimikrobiyal aktivitenin türlere göre dağılımına bakıldığında genel olarak *P. freudenreichii* türünün diğer türlere göre aktivitesinin daha yüksek olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.4. Propiyonik asit bakterilerinin *E. coli* ATCC 35218 suşuna gösterdiği antimikrobiyal aktivite

Suş Kodu	Tür İsmi	İnhibisyon Zon Çapı (cm)	
		SM	YEL-G
10-1	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,54 ± 0,00	0,20 ± 0,00
21	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,56 ± 0,00	0,26 ± 0,00
24	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,50 ± 0,00	0,35 ± 0,02
30-1	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,59 ± 0,02	0,25 ± 0,01
30-2	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,43 ± 0,03	0,22 ± 0,00
30-6	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,53 ± 0,05	0,20 ± 0,00
31-3	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,79 ± 0,04	0,40 ± 0,00
31-4	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,77 ± 0,02	0,43 ± 0,04
39	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,81 ± 0,02	0,37 ± 0,02
43-3	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,41 ± 0,02	0,32 ± 0,00
56-2	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,43 ± 0,02	0,31 ± 0,01
56-3	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,40 ± 0,11	0,30 ± 0,00
57	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,26 ± 0,00	0,22 ± 0,00
58	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,39 ± 0,01	0,27 ± 0,01
61	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,42 ± 0,00	0,20 ± 0,00
76	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,72 ± 0,00	0,34 ± 0,03
10-2	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	0,41 ± 0,02	0,35 ± 0,02
28	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	0,71 ± 0,01	0,40 ± 0,00
30-3	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	0,78 ± 0,00	0,25 ± 0,01
40	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	0,70 ± 0,00	0,36 ± 0,00
41	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	0,66 ± 0,00	0,48 ± 0,00
43-4	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	0,57 ± 0,04	0,38 ± 0,02

Çizelge 4.4. (Devam) Propiyonik asit bakterilerinin *E. coli* ATCC 35218 suşuna gösterdiği antimikrobiyal aktivite

Suş Kodu	Tür İsmi	İnhibisyon Zon Çapı (cm)	
		SM	YEL-G
43-5	<i>P. freudendreichii</i> <i>spp. shermanii</i>	0,41 ± 0,01	0,26 ± 0,00
45	<i>P. freudendreichii</i> <i>spp. shermanii</i>	0,61 ± 0,01	0,24 ± 0,00
6	<i>P. jensenii</i>	Zon yok	Zon yok
IT	<i>P. jensenii</i>	Zon yok	0,29 ± 0,04
KGN	<i>P. jensenii</i>	0,44 ± 0,06	0,20 ± 0,00
71	<i>P. jensenii</i>	0,42 ± 0,00	0,21 ± 0,01
73	<i>P. jensenii</i>	0,22 ± 0,00	0,28 ± 0,00
72	<i>P. thoenii</i>	0,53 ± 0,02	0,18 ± 0,03
75	<i>P. acidipropionici</i>	0,85 ± 0,02	0,21 ± 0,01

Çizelge 4.5. Propiyonik asit bakterilerinin *S. aureus* ATCC 25923 suşuna gösterdiği antimikrobiyal aktivite

Suş Kodu	Tür İsmi	İnhibisyon Zon Çapı (cm)	
		SM	YEL-G
10-1	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,32 ± 0,00	0,31 ± 0,01
21	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,54 ± 0,03	0,24 ± 0,00
24	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,38 ± 0,00	0,35 ± 0,01
30-1	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,45 ± 0,01	0,44 ± 0,03
30-2	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,28 ± 0,00	0,37 ± 0,07
30-6	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,42 ± 0,03	0,28 ± 0,00
31-3	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,49 ± 0,04	0,30 ± 0,00
31-4	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,66 ± 0,11	0,23 ± 0,01
39	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,42 ± 0,00	0,28 ± 0,06
43-3	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,47 ± 0,01	0,23 ± 0,01
56-2	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,58 ± 0,02	0,29 ± 0,02
56-3	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,24 ± 0,00	0,31 ± 0,02
57	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,25 ± 0,01	0,30 ± 0,00
58	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,40 ± 0,03	0,33 ± 0,05
61	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,21 ± 0,01	0,33 ± 0,02
76	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	0,48 ± 0,00	0,32 ± 0,00
10-2	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	0,34 ± 0,01	0,22 ± 0,03
28	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	0,36 ± 0,03	0,36 ± 0,06
30-3	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	0,26 ± 0,03	0,27 ± 0,04
40	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	0,36 ± 0,00	0,23 ± 0,02
41	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	0,53 ± 0,01	0,35 ± 0,01
43-4	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	0,42 ± 0,00	0,34 ± 0,03

Çizelge 4.5. (Devam) Propiyonik asit bakterilerinin *S. aureus* ATCC 25923 suşuna gösterdiği antimikrobiyal aktivite

Suş Kodu	Tür İsmi	İnhibisyon Zon Çapı (cm)	
		SM	YEL-G
43-5	<i>P. freudentreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	0,44 ± 0,03	0,30 ± 0,03
45	<i>P. freudentreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	0,48 ± 0,00	0,26 ± 0,00
6	<i>P. jensenii</i>	Zon yok	0,23 ± 0,02
IT	<i>P. jensenii</i>	Zon yok	0,42 ± 0,00
KGN	<i>P. jensenii</i>	Zon yok	0,28 ± 0,00
71	<i>P. jensenii</i>	0,42 ± 0,01	0,23 ± 0,01
73	<i>P. jensenii</i>	0,20 ± 0,00	0,26 ± 0,00
72	<i>P. thoenii</i>	0,52 ± 0,00	0,23 ± 0,02
75	<i>P. acidipropionici</i>	0,53 ± 0,03	0,20 ± 0,00

4.6. Kültürlerin Otoagregasyon ve Koagregasyon Yeteneklerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada EPS üretimi yüksek olarak belirlenen propiyonik asit bakterileri kültürlerinin otoagregasyon ve koagregasyon yeteneklerinin belirlenmesinde 3.2.6'da anlatılan yöntem uygulanmıştır. Yapılan çalışma sonucunda kültürlerin yüzde otoagregasyon yetenekleri Çizelge 4.6'da verilmiştir. Yine aynı suşların *E. coli* ATCC 35218 ve *S. aureus* ATCC 25923 ile koagregere olabilme yetenekleri Çizelge 4.7'de yüzde olarak belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre suşların yüzde otoagregasyon değerleri %17-49 arasında değişmektedir. Otoagregasyon yeteneği en yüksek olan suş *P. acidipropionici* 75 olarak belirlenmiştir (%49±4). Yapılan analizlerde EPS üretimi ile otoagregasyon arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. EPS üretimi ile koagregasyon arasında ise böyle bir ilişki tespit edilmemiştir. Koagregasyon yeteneği en yüksek olan suş yine *P. acidipropionici* 75 olarak belirlenmiştir (*E. coli* ile %19; *S. aureus* ile %14). Bu durum *P. acidipropionici* 75 suşunun hem kendi arasında hem de diğer bakterilerle tutunma kabiliyetinin yüksek olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda suşların otoagregasyon ve

koagregasyon yetenekleri arasında anlamlı bir ilişki gözlenememiştir. Bu durum istatistiksel analizlerle de doğrulanmıştır.

Çizelge 4.6. Propiyonik asit bakterisi kültürlerinin yüzde otoagregasyon değerleri

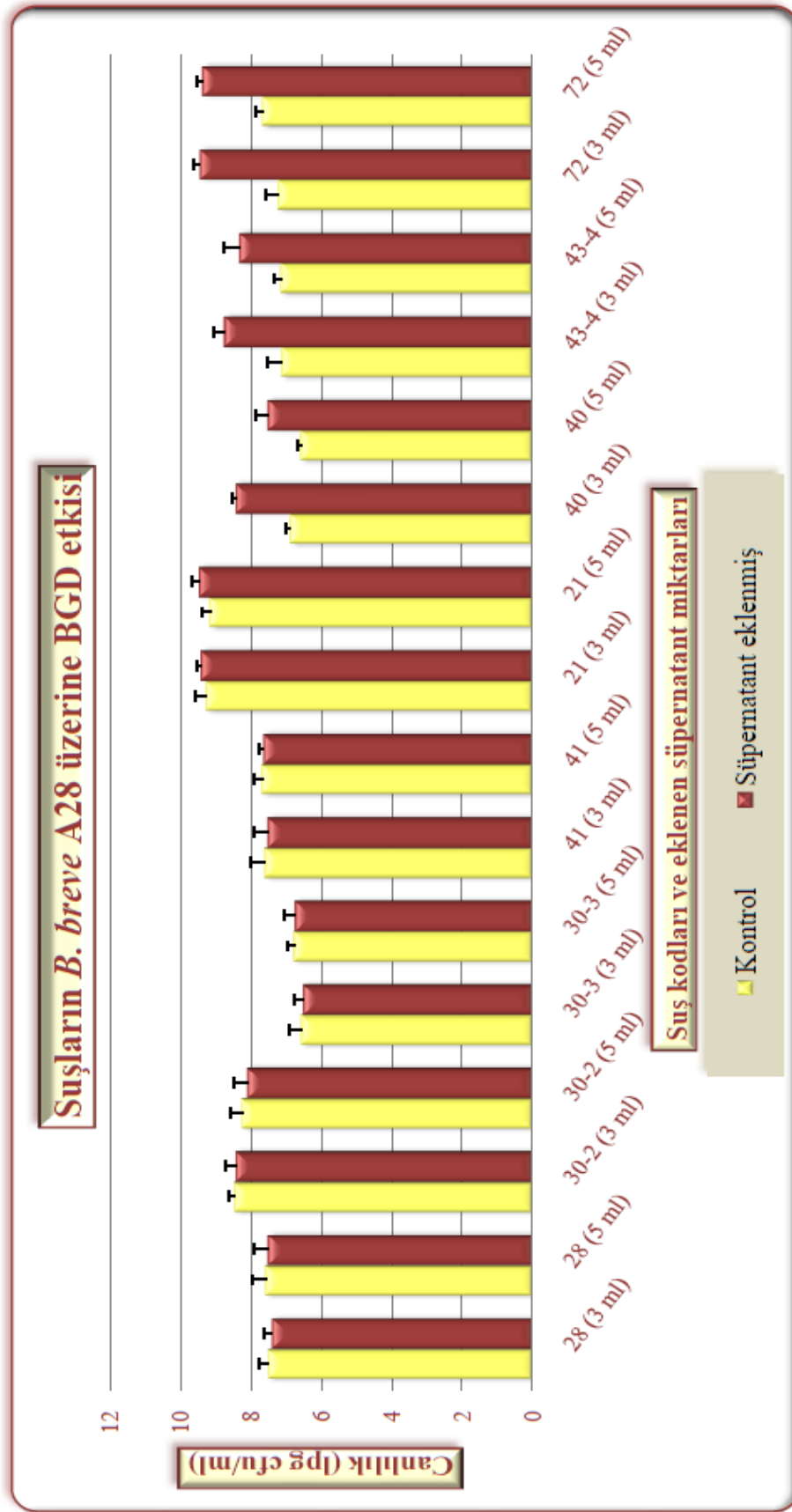
Suş Kodu	Tür Adı	Otoagregasyon (%)
21	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	19 ± 2
30-1	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	47 ± 4
31-4	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	19 ± 1
39	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	17 ± 2
56-3	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	44 ± 2
41	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	32 ± 1
43-4	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	19 ± 3
72	<i>P. thoenii</i>	19 ± 3
75	<i>P. acidipropionici</i>	49 ± 4

Çizelge 4.7. Propiyonik asit bakterisi kültürlerinin yüzde koagregasyon değerleri

Suş Kodu	Tür Adı	<i>E. coli</i> ATCC 35218 ile koagregasyon (%)	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 ile koagregasyon (%)
21	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	14 ± 3	16 ± 1
30-1	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	10 ± 5	11 ± 1
31-4	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	14 ± 3	16 ± 2
39	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	2 ± 0	13 ± 2
56-3	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>freudendreichii</i>	13 ± 2	14 ± 0
41	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	13 ± 3	12 ± 2
43-4	<i>P. freudendreichii</i> spp. <i>shermanii</i>	12 ± 2	15 ± 2
72	<i>P. thoenii</i>	7 ± 1	9 ± 2
75	<i>P. acidipropionici</i>	19 ± 1	14 ± 0

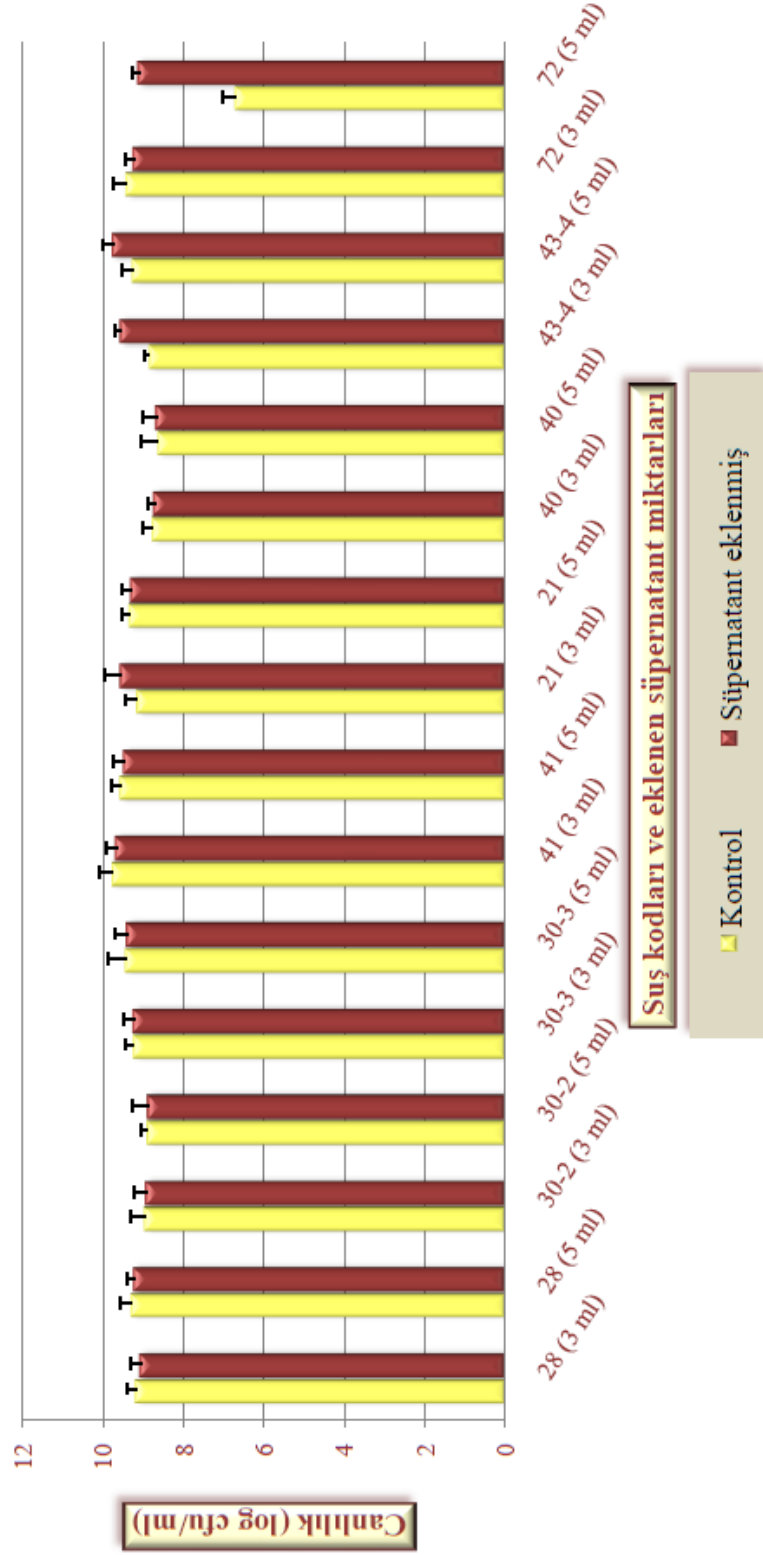
4.7. Kùltürlerin Bifidobakterilerin Gelişimini Düzeyleyici (BGD) Etkisinin Belirlenmesi

YEL-G besiyerinde geliştirilmiş propiyonik asit bakterisi kùltürlerinin bifidobakterilerinin gelişimini düzenleyici etkisinin araştırılması için 3.2.7’de belirtilen yöntem asit ve EPS üretimi yüksek olan propiyonik asit bakterisi suşlarına uygulanmıştır. BGD aktivitesi çalışılan 8 adet propiyonik asit bakterilerine ait suş içerisinde sadece 4 suşta belirlenmiştir. Bu aktivitenin propiyonik asit bakterilerinin gelişiminin hangi aşamasında oluştuğunun belirlenebilmesi için 48 ve 96 saatlik kùltürlerle çalışılmıştır ve 96 saatlik kùltürlerde herhangi bir aktivite gözlenemediğinden sonuçları verilmemiştir. Bu çalışmada test bakterisi olarak *B. breve* A28, *B. breve* BASO1, *B. breve* A10 ve *B. longum* BASO20 suşları ile çalışılmıştır. Çalışmada kullanılan propiyonik asit bakterisi suşlarının *B. breve* A10 ve *B. longum* BASO20 suşlarının gelişimini etkilemediği belirlenmiştir. Denenen propiyonik asit bakterilerinin gelişimine etki göstermediği bifidobakteri suşlarına ait sonuçlar tez içerisinde verilmemiştir. Elde edilen sonuçlara göre BGD etkisi *B. breve* A28 ve *B. breve* BASO1 suşları üzerine belirlenirken, BGD etkisi en fazla *B. breve* A28 suşunda tespit edilmiştir. Çalışılan suşlar içerisinde hem asit hem de EPS üretimi diğer suşlara göre daha yüksek olan *P. thoenii* 72 suşının BGD etkisinin diğerlerine göre yüksek olduğu görülmüştür. Suşların *B. breve* A28 suşuna gösterdikleri etki Şekil 4.1’te; *B. breve* BASO1 suşuna gösterdikleri etki ise Şekil 4.2’te verilen grafiklerde gösterilmiştir. Eklenen süpernatant miktarının BGD aktivitesini çok fazla etkilemediği dikkat çekmektedir. 3 ml süpernatant eklenen besiyerindeki bifidobakterilerin canlılığı ile 5 ml arasında çok büyük bir fark görülmemiştir. Elde edilen verilere göre *P. thoenii* 72 suşu *B. breve* A28 suşının canlılığını 3 ml süpernatant eklendiğinde 7,22 log cfu/ml’den 9,44 log cfu/ml’ye; 5 ml süpernatant eklendiğinde ise 7,65 log cfu/ml’den 9,37 log cfu/ml’ye yükseltmiştir. Yine aynı suş *B. breve* BASO1 suşının canlılığını 3 ml süpernatant eklendiğinde 9,41 log cfu/ml’den 9,21 log cfu/ml’ye, 5 ml süpernatant eklendiğinde ise, 6,72 log cfu/ml’den 9,09 log cfu/ml’ye değiştirdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.1. Propiyonik asit bakterisi kültürlerinin *B. breve* A28 suşunu geliştirici etkisi (Kontrol grubuna propiyonik asit bakterisi kültürlerinin süpernatantı eklenmemiştir. Süpernatant eklenmiş olanlara eklenen süpernatant miktarları suşların yanında 3 ve 5 ml olarak belirtilmiştir)

Suşların *B. breve* BASO 1 üzerine BGD etkisi



Şekil 4.2. Propiyonik asit bakterisi kültürlerinin *B. breve* BASO1 suşunu geliştirici etkisi (Kontrol grubuna propiyonik asit bakterisi kültürlerinin süpernatantı eklenmemiştir. Süpernatant eklenmiş olanlara eklenen süpernatant miktarları suşların yanında 3 ve 5 ml olarak belirtilmiştir).

Suşların total asit, propiyonik asit ve EPS üretimi ile BGD aktivitesi istatistiksel olarak karşılaştırıldığında bu iki aktivite arasında anlamlı bir ilişki olamadığı görülmüştür. Ayrıca suşların antimikrobiyal aktiviteleri, otoagregasyon ve koagregasyon yetenekleri ile BGD etkisi arasında da anlamlı bir ilişkiye rastlanmamıştır.

4.8. Sonikasyon, sıcaklık, asitlik ve bazı enzimlerin BGD aktivitesi üzerine etkisi

Propiyonik asit bakterilerinin BGD aktivitesine sonikasyonun etkisinin araştırılması için 3.2.8’de belirtilen yöntem esas alınarak *P. thoenii* 72, *P. freudenreichii* spp. *shermanii* 40 ve *P. freudenreichii* spp. *shermanii* 43-4 suşlarının 48 saatlik kültürlerine uygulanmıştır. Sonikasyonun BGD aktivitesine etkisi ve bu etkinin kontrol grubuyla karşılaştırılması Çizelge 4.8 ve 4.9’da gösterilmiştir. *B. breve* A28 suşunun propiyonik asit bakterisi süpernatantı eklenmemiş besiyerindeki (kontrol grubu) canlılığı $8,07 \pm 0,26$ log cfu/ml iken, bu suşun canlılığı *P. thoenii* 72 suşunun süpernatantı eklendiğinde $9,11 \pm 0,13$ log cfu/ml’ye, sonike edilmiş kültür süpernatantı eklendiğinde ise $9,29 \pm 0,11$ log cfu/ml’ye yükseldiği belirlenirken; aynı suşun canlılığı *P. freudenreichii* spp. *shermanii* 40 suşunun süpernatantı eklendiğinde $9,18 \pm 0,42$ log cfu/ml’ye, sonike edilmiş kültür süpernatantı eklendiğinde ise $8,80 \pm 0,07$ log cfu/ml’ye; *P. freudenreichii* spp. *shermanii* 43-4 suşunun süpernatantı eklendiğinde $9,16 \pm 0,15$ log cfu/ml’ye, sonike edilmiş kültür süpernatantı eklendiğinde ise $9,87 \pm 0,23$ log cfu/ml’ye yükselmiştir. *B. breve* BASO1 suşunun kontrol grubundaki canlılığı $8,67 \pm 0,11$ log cfu/ml iken, *P. thoenii* 72 suşunun kültür süpernatantı eklendiğinde canlılık $9,22 \pm 0,37$ log cfu/ml, sonike edilmiş kültür süpernatantı eklendiğinde $9,05 \pm 0,15$ log cfu/ml olarak belirlenirken, *P. freudenreichii* spp. *shermanii* 40 suşunun kültür süpernatantı eklendiğinde aynı suşun canlılığının $8,93 \pm 0,17$ log cfu/ml ve sonike edilmiş kültür süpernatantı eklendiğinde $8,85 \pm 0,16$ log cfu/ml; *P. freudenreichii* spp. *shermanii* 43-4 suşunun kültür süpernatantı eklendiğinde aynı suşun canlılığının $9,01 \pm 0,26$ log cfu/ml ve sonike edilmiş kültür süpernatantı eklendiğinde $9,16 \pm 0,16$ log cfu/ml olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlara bakıldığında sonikasyonun BGD etkisini önemli

ölçüde düşürmediği gözlenmiştir. *P. thoenii* 72 suşunun BGD aktivitesinin diğer suşlara göre yüksek çıkması ilk yaptığımız BGD çalışmamızı doğrulamaktadır.

Propiyonik asit bakterisi kültürlerinin süpernatantı kullanılarak BGD etkisine sebep olan moleküllerin bakteriler tarafından üretilip dış ortama verildiğini; sonike edilmiş kültürlerde BGD etkisinin düşmemesi bu molekülün sonikasyondan etkilenmediğini göstermektedir.

BGD aktivitesinin propiyonik asit bakterilerinin ürettiği diğer metabolitler ile ilişkisini araştırmak için korelasyon testleri yapılmıştır. Bu analizler sonucunda BGD aktivitesi ile total asit üretimi, propiyonik asit üretimi, EPS üretimi, antimikrobiyal aktivite, otoagregasyon ve koagregasyon arasında anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir. Ancak BGD aktivitesinin en yüksek olduğu *P. thoenii* 72 suşunun aynı zamanda SM besiyerinde propiyonik asit üretiminin de en yüksek olduğu suş olması dikkat çekmektedir.

Çizelge 4.8. Sonikasyonun *B. breve* A28 üzerine olan BGD aktivitesine etkisi

	Canlılık (log cfu/ml)
Kontrol	8,07 ± 0,26
<i>P. thoenii</i> 72 ^a	9,11 ± 0,13
<i>P. thoenii</i> 72 ^b	9,29 ± 0,11
<i>P. freudenreichii</i> spp. <i>shermanii</i> 40 ^a	9,18 ± 0,42
<i>P. freudenreichii</i> spp. <i>shermanii</i> 40 ^b	8,80 ± 0,07
<i>P. freudenreichii</i> spp. <i>shermanii</i> 43-4 ^a	9,16 ± 0,15
<i>P. freudenreichii</i> spp. <i>shermanii</i> 43-4 ^b	9,87 ± 0,23

^a Süpernatant

^b Sonikasyon uygulanmış süpernatant

Çizelge 4.9. Sonikasyonun *B. breve* BASO1 üzerine olan BGD aktivitesine etkisi

	Canlılık (log cfu/ml)
Kontrol	8,67 ± 0,11
<i>P. thoenii</i> 72 ^a	9,22 ± 0,37
<i>P. thoenii</i> 72 ^b	9,05 ± 0,15
<i>P. freudenreichii</i> spp. <i>shermanii</i> 40 ^a	8,93 ± 0,17
<i>P. freudenreichii</i> spp. <i>shermanii</i> 40 ^b	8,85 ± 0,16
<i>P. freudenreichii</i> spp. <i>shermanii</i> 43-4 ^a	9,01 ± 0,26
<i>P. freudenreichii</i> spp. <i>shermanii</i> 43-4 ^b	9,16 ± 0,16

^a Süpernatant^b Sonikasyon uygulanmış süpernatant

Propiyonik asit bakterilerinin BGD aktivitesine sıcaklık, pH ve bazı enzimlerin etkisinin araştırılması için 3.2.8’de belirtilen yöntem *P. thoenii* 72, *P. freudenreichii* spp. *shermanii* 40 ve *P. freudenreichii* spp. *shermanii* 43-4 suşlarının 48 saatlik kültürlerine uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.10, 4.11 ve 4.12’de gösterilmiştir. Bu verilere göre proteaz, ribonükleaz A, lipaz, proteinaz-K ve kimotripsin enzimlerinin, yüksek sıcaklığın (50-121 °C), yüksek veya düşük pH’nın (pH 2-8) BGD aktivitesini olumsuz etkilemediği görülmektedir. Bu durum insan bağırsağında BGD molekülleri üretildiğinde aktivitesini kaybetmeyeceğini, gıdalarda kullanılması istendiğinde de yüksek sıcaklıklardan etkilenmeyeceğini göstermektedir. Aynı zamanda bu çalışma bize BGD aktivisine sebep olan molekülün yapısı hakkında da bilgi vermektedir. BGD aktivitesinin çalışmada kullandığımız enzimlerden etkilenmemesi bu molekülün protein, lipid ya da nükleik asit yapısında olmadığını göstermektedir. Yine bu aktivitenin yüksek sıcaklıktan da etkilenmemesi molekülün protein yapısında olmadığını doğrulamaktadır.

Çizelge 4.10. *P. thoenii* 72 suşunun *B. breve* A28 ve *B. breve* BASO1 suşları üzerine BGD aktivitesine sıcaklık, pH ve farklı enzimlerin etkisi

	Etkenler	<i>B. breve</i> A28 Canlılık (log cfu/ml)¹	<i>B. breve</i> BASO1 Canlılık (log cfu/ml)¹
	Kontrol²	8,52±0,06	8,15 ± 0,09
	Süpernatant³	9,20±0,05	9,85 ± 0,07
Enzimlerin Etkisi⁴	Proteaz	9,39±0,04	9,78 ± 0,02
	Ribonükleaz A	9,06±0,23	9,69 ± 0,12
	Lipaz	8,95±0,09	9,72 ± 0,08
	Proteinaz-K	9,28±0,07	9,54 ± 0,06
	Kimotripsin	9,23±0,16	9,79 ± 0,09
Sıcaklığın Etkisi⁵	50°C'de 15 dk	9,55±0,16	9,88 ± 0,06
	80°C'de 15 dk	9,43±0,17	9,81 ± 0,12
	100°C'de 15 dk	9,23±0,11	9,77 ± 0,11
	121°C'de 15 dk	9,21±0,05	9,63 ± 0,18
pH'nın Etkisi⁶	pH 2	9,43±0,01	9,79 ± 0,04
	pH 4	9,29±0,02	9,74 ± 0,03
	pH 6	9,34±0,04	9,81 ± 0,15
	pH 8	9,20±0,08	9,77 ± 0,11

¹ *B. breve* A28 ve *B. breve* BASO1 suşlarının canlılığı

² Süpernatant eklenmemiş besiyeri

³ İşlem yapılmamış süpernatant eklenmiş besiyeri

⁴ Süpernatant enzimlerle 37 °C'de 5 saat inkübe edilmiş ve besiyerine eklenmiştir

⁵ Süpernatant verilen sıcaklıklarda 15 dk inkübe edilmiş ve besiyerine eklenmiştir

⁶ Süpernatant verilen pH değerlerinde 37°C'de 5 saat inkübe edilmiş ve nötralize edildikten sonra besiyerine eklenmiştir.

Çizelge 4.11 *P. freudenreichii* spp. *shermanii* 40 suşunun *B. breve* A28 ve *B. breve* BASO1 suşları üzerine BGD aktivitesine sıcaklık, pH ve farklı enzimlerin etkisi

	Etkenler	<i>B. breve</i> A28 Canlılık (log cfu/ml) ¹	<i>B. breve</i> BASO1 Canlılık (log cfu/ml) ¹
	Kontrol ²	8,57 ± 0,03	8,22 ± 0,07
	Süpernatant ³	9,11 ± 0,07	9,02 ± 0,01
Enzimlerin Etkisi ⁴	Proteaz	9,08 ± 0,09	9,04 ± 0,06
	Ribonükleaz A	9,06 ± 0,14	8,98 ± 0,14
	Lipaz	8,89 ± 0,08	8,94 ± 0,05
	Proteinaz-K	9,02 ± 0,05	9,06 ± 0,04
	Kimotripsin	9,13 ± 0,06	9,03 ± 0,07
Sıcaklığın Etkisi ⁵	50°C'de 15 dk	9,12 ± 0,11	9,10 ± 0,03
	80°C'de 15 dk	9,01 ± 0,07	8,99 ± 0,07
	100°C'de 15 dk	9,11 ± 0,05	9,05 ± 0,01
	121°C'de 15 dk	9,07 ± 0,13	9,04 ± 0,12
pH'nın Etkisi ⁶	pH 2	8,99 ± 0,01	9,08 ± 0,11
	pH 4	9,07 ± 0,07	9,03± 0,05
	pH 6	9,02 ± 0,02	8,99 ± 0,07
	pH 8	9,10 ± 0,13	9,08 ± 0,11

¹ *B. breve* A28 ve *B. breve* BASO1 suşlarının canlılığı

² Süpernatant eklenmemiş besiyeri

³ İşlem yapılmamış süpernatant eklenmiş besiyeri

⁴ Süpernatant enzimlerle 37 °C'de 5 saat inkübe edilmiş ve besiyerine eklenmiştir

⁵ Süpernatant verilen sıcaklıklarda 15 dk inkübe edilmiş ve besiyerine eklenmiştir

⁶ Süpernatant verilen pH değerlerinde 37°C'de 5 saat inkübe edilmiş ve nötralize edildikten sonra besiyerine eklenmiştir

Çizelge 4.12 *P. freudenreichii* spp. *shermanii* 43-4 suşunun *B. breve* A28 ve *B. breve* BASO1 suşları üzerine BGD aktivitesine sıcaklık, pH ve farklı enzimlerin etkisi

	Etkenler	<i>B. breve</i> A28 Canlılık (log cfu/ml) ¹	<i>B. breve</i> BASO1 Canlılık (log cfu/ml) ¹
	Kontrol ²	8,78 ± 0,06	8,51 ± 0,05
	Süpernatant ³	9,27 ± 0,03	9,15 ± 0,07
Enzimlerin Etkisi ⁴	Proteaz	9,21 ± 0,04	9,12 ± 0,03
	Ribonükleaz A	9,22 ± 0,15	9,11 ± 0,12
	Lipaz	9,18 ± 0,07	9,13 ± 0,04
	Proteinaz-K	9,23 ± 0,04	9,06 ± 0,08
	Kimotripsin	9,25 ± 0,08	9,12 ± 0,08
Sıcaklığın Etkisi ⁵	50°C'de 15 dk	9,26 ± 0,04	9,10 ± 0,06
	80°C'de 15 dk	9,27 ± 0,02	9,14 ± 0,04
	100°C'de 15 dk	9,19 ± 0,03	9,09 ± 0,11
	121°C'de 15 dk	9,15 ± 0,11	9,11 ± 0,03
pH'nın Etkisi ⁶	pH 2	9,23 ± 0,08	9,07 ± 0,08
	pH 4	9,26 ± 0,04	8,99 ± 0,12
	pH 6	9,18 ± 0,03	9,11 ± 0,06
	pH 8	9,19 ± 0,09	9,09 ± 0,08

¹ *B. breve* A28 ve *B. breve* BASO1 suşlarının canlılığı

² Süpernatant eklenmemiş besiyeri

³ İşlem yapılmamış süpernatant eklenmiş besiyeri

⁴ Süpernatant enzimlerle 37 °C'de 5 saat inkübe edilmiş ve besiyerine eklenmiştir

⁵ Süpernatant verilen sıcaklıklarda 15 dk inkübe edilmiş ve besiyerine eklenmiştir

⁶ Süpernatant verilen pH değerlerinde 37°C'de 5 saat inkübe edilmiş ve nötralize edildikten sonra besiyerine eklenmiştir

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Probiyotik bakteriler yeterli miktarda alındığında konak üzerinde sağlığa yararlı etkileri olan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır [FAO/WHO, 2006]. Klasik propiyonik asit bakterilerinin bazı suşları tek başına veya laktik asit bakterileri ve/veya bifidobakteriler ile birlikte probiyotik preparatlarda kullanılmaktadır. Laktik asit bakterileri ve bifidobakteriler kadar çok olmamasına rağmen son yıllarda propiyonik asit bakterilerinin probiyotik özellikleri ile ilgili daha fazla araştırma yapılmaktadır. Bir bakterinin probiyotik olarak önerilebilmesi için bazı kriterlere bakılması gereklidir. Bu kriterlerden bazıları; güvenli olması, sindirim esnasındaki stresten korunabilmesi, intestinal hücrelere tutunabilmesi ve insan kaynaklı olmasıdır [Cousin ve ark., 2010].

Klasik propiyonik asit bakterileri çiğ sütte bulunmaktadır. Propiyonik asit bakterilerinin çiğ sütteki gelişebilmesinin sebebi karbon kaynağı olarak sütteki laktat ve laktozu kullanmasıdır. Bu bakterilerin zayıf proteolitik aktiviteye sahip olmaları sebebiyle sütteki gelişimleri azalmaktadır. Ancak bazı peynirlerin yapımı sırasında özel koşullar propiyonik asit bakterilerinin daha iyi bir şekilde gelişmelerine zemin hazırlamaktadır. Örneğin klasik propiyonik asit bakterilerinin İsviçre tipi peynirlerde baskın olarak bulunmasının sebebi uzun olgunlaşma sürecinin sağladığı uygun sıcaklık (birkaç hafta boyunca 24 °C), düşük tuz konsantrasyonu ve nispeten yüksek pH (5,2)'dir [Gautier, 2004]. İsviçre tipi peynirlerde klasik propiyonik asit bakterilerinden *P. freudenreichii* türü daha baskın olarak bulunmaktadır. *P. jensenii* türü ise *P. freudenreichii*'den sonra peynirlerde bulunan baskın türdür. Süt ürünlerinde bulunan diğer klasik propiyonik asit bakterileri ise *P. acidipropionici* ve *P. thoenii*'dir. Bu çalışmada kullanılan propiyonik asit bakterileri Türkiye'nin çeşitli yörelerinden temin edilmiş ev yapımı peynirlerden izole edilmiştir. Propiyonik asit bakterilerinin türlere göre dağılımına baktığımızda *P. freudnreichii* türüne ait iki alttürün (*P. freudenreichii* spp. *freudenreichii* ve *P. freudenreichii* spp. *shermanii*) baskın olduğu görülmektedir. Bu türden sonra gelen diğer baskın tür ise *P. jensenii*'dir. *P. thoenii* ve *P. acidipropionici* türlerinden ise birer suş izole edilebilmiştir. *P. freudenreichii* türünün peynirlerde baskın olması literatür bilgilerini

desteklemektedir. Peynirde bulunan klasik propiyonik asit bakterileri ürettikleri metabolitlerle bu peynirlerin aromasını oluşturmakta, aynı zamanda gösterdiği lipolitik aktiviteyle peynirin yoğunluğunu artırmaktadır [Deborde, 2003].

Propiyonik asit bakterilerinin fermentasyon sonucunda ürettiği en önemli metabolitlerden biri propiyonik asittir. Propiyonik asit, tavuk ve diğer hayvanların yemlerinde küf önleyici olarak kullanılmakla birlikte parfüm, herbisit ve selüloz bazlı plastiklerin üretiminde de kullanılmaktadır. Propiyonik asitin kalsiyum, sodyum ve potasyum tuzları gıda koruyucusu olarak birçok gıda maddesine güvenilir bir şekilde eklenmektedir. Çeşitli tipte el yapımı yöresel peynirlerden izole edilmiş olan 31 farklı suşun hepsinin propiyonik asit üretiminin belirlenmesi hem zaman hem de maliyet yönünden gereksiz kayıplara neden olacağından çalışmada ilk etapta tüm suşların farklı iki besiyerindeki total asit üretimi yüzde olarak bulunmuştur. Bu aşamada asit üretim yeteneği yüksek olan suşlar ve besiyeri belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda modifiye skim milk besiyerinde toplam asit üretiminin daha yüksek olduğu görülmüştür. Elde edilen verilere göre modifiye skim milk besiyerinde suşların asit üretimi % 0,19 ile % 1,59 arasında değişmekte iken YEL-G besiyerinde bu oran % 0,19 ile % 1,04 arasında değişmektedir. Yüzde asit üretimi en yüksek olan suşlar *P. freudenreichii* spp. *shermanii* 41 (SM'de % 1,58±0,00; YEL-G'de % 1,04±0,00) ve *P. freudenreichii* spp. *shermanii* 30-3 (SM'de % 1,59±0,10; YEL-G'de % 0,77±0,06) olarak belirlenmiştir. Klasik propiyonik asit bakterilerinin doğal yaşam ortamı süt ve süt ürünleri olduğundan bu bakterilerin doğal ortamlarına daha yakın olan skim milk besiyerinde daha fazla asit üretmeleri olumlu bir sonuçtur. Klasik propiyonik asit bakterileri ana enerji kaynağı olarak laktatı kullanmalarına rağmen glukoz, laktoz, gliserol gibi şekerleri de kullanabilmektedirler [Piveteau, 1999]. Skim milk besiyerinde asit üretiminin fazla olmasının sebebinin bu besiyerinin bileşiminde bulunan laktozdan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu veriler ışığında her iki besiyerinde de yüzde asit üretim yeteneği en fazla olan 7 suş organik asit analizi için seçilmiştir. Farklı türler arasındaki genel asit üretiminin yüksek olduğu türlere bakıldığında *P. freudenreichii* türünün diğer türlere göre daha yüksek asit üretme kapasitesine sahip olduğu söylenebilir.

Colomban ve ark., 1993 yılında yaptıkları çalışmada bir membran reaktöründe 50 saatlik döngü sonucunda peynir altı suyundan 30-40 g/L propiyonik asit üretmişlerdir. Bodie ve arkadaşları 1987 yılında *P. shermanii* ve *Lactobacillus casei*'nin karışık kültürünü kullanarak 100 saatlik inkübasyon sonucunda yoğunlaştırılmış peynir altı suyundan yaklaşık 65 g/L propiyonik asit üretebilmişlerdir. Goswami ve arkadaşları, 2000 yılında devamlı fermentasyonla laktozu substrat olarak kullanarak pH 6,5 ve 30 °C sıcaklıkta *P. acidipropionici* kültürünün 20,75 g/L propiyonik asit ürettiğini göstermişlerdir. Rickert ve arkadaşları 1998 yılında yaptıkları çalışma sonucunda alginat-immobilize propiyonik asit bakterilerinin sürekli fermentasyonunda 12 saat gibi kısa bir sürede substrat olarak 75 g/L glukoz kullanıldığında 34 g/L propiyonik asit, 7 g/L asetik asit üretildiğini; substrat olarak 42 g/L laktik asit kullanıldığında ise 22 g/L propiyonik asit ve 8 g/L asetik asit üretildiğini görmüşlerdir.

Yapılan çalışma sonucunda organik asit analizi için seçilen 7 suşun hepsinin asetik asit ve propiyonik asit ürettikleri görülmüştür. Suşların YEL-G besiyerinde ürettikleri asetik asit miktarı 1,12-3,94 mg/ml arasında değişirken, aynı besiyerindeki propiyonik asit miktarı 2,93-7,32 mg/ml arasında görülmüştür. SM besiyerinde üretilen asetik asit miktarı 4,20-6,11 mg/ml ve propiyonik asit miktarı 6,59-15,50 mg/ml arasında değişmektedir. Bu verilere göre her iki besiyerinde de propiyonik asit üretiminin asetik asite göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Propiyonik asit bakterileri laktoz, glukoz ve laktatı kullanarak yüksek oranda propiyonik asit, bunun yanında asetik asit ve CO₂ üretmektedirler [Piveteau, 1999]. SM besiyerinde bu karbon kaynaklarının hepsinin bulunmasından dolayı bu besiyerinde üretilen propiyonik ve asetik asit miktarları YEL-G besiyerine göre daha yüksek çıkmıştır. Propiyonik asit üretimi en yüksek olan suşun *P. thoenii* 72 (SM besiyerinde 15,50 mg/ml) olduğu görülmektedir. Bu suşun genel asit üretiminin organik asit analizi yapılan diğer suşlara göre daha düşük olmasına rağmen propiyonik asit üretiminin diğerlerinden daha yüksek olması propiyonik asit üretimi için bu suşun tercih edilmesi gerektiğini göstermektedir. Suşların organik asit üretimine bakıldığında propiyonik asit üretiminin asetik ve laktik asitten daha yüksek olduğu görülmektedir. Propiyonik asit bakterileri fermentasyon sonucunda diğer asitlere göre daha yüksek

oranda propiyonik asit üretmektedirler [Benjelloun ve ark., 2005]. Yapılan çalışma da bu bilgiyi desteklemektedir.

Normalde laktik asit propiyonik asit bakterilerinin metabolizmaları sonucu üretilen bir asit değildir. Laktik asit anaerobik şartlarda propiyonik asit üretimi için bir substrat olarak kullanılmaktadır. Laktik asit laktat dehidrogenaz enzimi ile pirüvata dönüştürülerek transkarboksilasyon döngüsüne katılmakta ve sonuçta propiyonik asit üretilmektedir [Piveteau, 1999]. Ancak ortamdaki oksijen oranı yükseldiğinde propiyonik asit üretimi durmakta ve düşük miktarlarda laktik asit üretilmektedir [Quesada-Chanto ve ark., 1994]. Bizim çalışmamızda da sadece 3 suşta düşük miktarlarda laktik asit (0,45-2,92 mg/ml) gözlenmiştir. Bu durum fermentasyon sonucunda bakterilerin oksijene maruz kaldıklarını ya da ortamdaki laktik asitin hepsini fermente edemediklerini göstermektedir.

P. thoenii 72 suşunun ürettiği propiyonik asit miktarı (15,50 mg/ml) diğer araştırma sonuçlarına daha yakınlık gösterirken diğer suşların propiyonik ve asetik asit üretim miktarlarının daha düşük olduğu gözlenmiştir. Ancak diğer çalışmalarda sürekli fermentasyon ortamı sağlayan, pH kontrolünün de sağlandığı büyük hacimli biyoreaktörler kullanılmıştır. Bazı çalışmalarda ise daha etkin asit üretimini sağlamak için immobilize hücreler kullanılmıştır. Bizim yaptığımız çalışmada ise daha küçük hacimlerde basit fermentasyon teknikleri ile bakteri kültürleri geliştirilmiş olmasına rağmen elde edilen sonuçlara bakıldığında asit üretiminin çok da düşük olmadığı söylenebilir.

Propiyonik asit bazı bakterileri ve küfleri inhibe ederek özellikle gıdaların raf ömrünü uzattığı için gıda koruyucusu olarak kullanılan bir asittir [Woscov ve Glatz, 1991]. Fermentasyon yöntemleriyle üretilen propiyonik asitin gıdalarda kullanılması tercih edilmektedir. Peynir gibi gıda ürünlerinde zaten bulunan propiyonik asit bakterilerinin ürettiği propiyonik asitin belirlenmesi ve bu asidi daha yüksek miktarda üreten suşların seçilmesi bu yüzden çok önemlidir.

Gıda endüstrisinde mikrobiyal ekzopolisakkaritler genellikle kıvam artırıcı, dengeleyici, emülgatör, jelleştirici ve su bağlayıcı araçlar olarak kullanılmaktadır. Gıdalarda kullanılan bakterilerden EPS üretme yeteneği üzerine en çok çalışma laktik asit bakterileri üzerine yapılmış olmasına rağmen bifidobakteriler ve propiyonik asit bakterilerinin de EPS ürettikleri bilinmektedir [Dobrichowska ve ark., 2008], ancak klasik propiyonik asit bakterilerinin EPS üretimiyle ilgili yapılmış çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalarda ise bu bakterilerin EPS üretiminin suşa bağımlı olduğu, besiyeri bileşiminden ve fermentasyon şartlarından etkilendiği belirtilmiştir [Crow, 1988; Gorret ve ark., 2001a,b; Racine ve ark., 1991; Skogen ve ark., 1974].

Laktik asit bakterilerinin EPS üretimi ile ilgili yapılan bir çalışmada bu bakterilere ait farklı suşların 16-315 mg/L arasında değişen miktarlarda EPS ürettiği gösterilmiştir [Aslim ve ark., 2006]. Propiyonik asit bakterilerinin ürettiği EPS miktarı ile ilgili bu şekilde bir çalışma bulunmamaktadır. Halbuki EPS üretimi yüksek olan bir propiyonik asit bakterisi hem gıdalarda kullanıldığında doğal bir jelleştirici ajan olarak kullanılabilir, hem de probiyotik olarak kullanıldığında insan gastrointestinal alanında faydalı etkilerini gösterebilir. Bizim çalışmamızda kullanılan suşların ürettiği EPS miktarı bu üretimin en yüksek olduğu E-YEL-G besiyerinde 25-149 mg/L arasında değişmektedir. Bu sonuç propiyonik asit bakterilerinin laktik asit bakterileri kadar yüksek oranda EPS üretmediğini göstermektedir. Ancak propiyonik asit bakterileri içinde değerlendirildiğinde bazı suşların iyi EPS ürettiği düşünülebilir.

Gorret ve arkadaşları, 2001 yılında yaptıkları çalışmada süt mikrofiltratına yeast ekstraktı eklemenin laktoz tüketimini, biyokütle, EPS ve organik asit üretimini artırdığını görmüşlerdir. Biz de çalışmamızda skimmilk besiyerine yeast ekstrakt ve glukoz ekleyerek suşların daha yüksek EPS ve organik asit üretmelerini sağlamış olduk. Bu mikroorganizmalar özellikle süt ve süt ürünlerinde kullanıldığından EPS üretimi yüksek olan suşların gıdalara eklenmesi EPS'nin gıdalardaki kıvam artırma, jelleştirme gibi özelliklerini göstermesi bakımından önemlidir. Ayrıca, EPS üretimi yüksek olarak belirlenen suşların ürettikleri EPS saflaştırılarak gıdalara eklenerek

kimyasal araçlara bir alternatif doğal bir aracı olarak kullanılabilir. EPS ayrıca sağlık için yararlı özellikleri ile dikkat çekmektedir. Bunlardan bazıları kolesterol düşürücü aktivitesinin yanında immün düzenleyici özelliklerinin olmasıdır [Chabot ve ark., 2001; Makino ve ark., 2006; Nakajima ve ark., 1992]. Probiyotik olarak da önerilen propiyonik asit bakterilerinin EPS üretim kapasitelerinin ve EPS üretimi yüksek olan suşların belirlenmesi bu bakterilerin sindirim kanalında yaşarken aynı zamanda EPS'nin sağlığa yararlı özellikleri probiyotik açıdan önemli suşlara karar verilmesi açısından önemlidir. Bu nedenlerden dolayı gıda ve sağlık sektöründe kullanılması için EPS üretimi yüksek olan *P. freudenreichii* spp. *shermanii* 43-4 (149 mg/L) ve *P. freudenreichii* spp. *freudenreichii* 21 (148 mg/L) suşları önerilmektedir.

Propiyonik asit bakterileri propiyonik asit, asetik asit ve diasetil gibi antimikrobiyal aktiviteli metabolitler üretmektedirler [Holo ve ark., 2002]. Microgard isimli biyokoruyucu *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* ile fermente edilmiş skim miltir [Weber ve Broich, 1986]. Bu ürünün peynir ve yoğurt gibi bazı gıda maddelerinde kullanılabileceği onaylanmıştır [Salih ve ark., 1990]. Microgard bazı mantarları ve Gram (-) bakterileri inhibe ederken Gram (+) bakterileri inhibe edememektedir. Microgard'ın antimikrobiyal aktivitesinin propiyonik ve asetik asit gibi fermentasyon ürünleriyle birlikte moleküler ağırlığı yaklaşık 700 g/mol olan bir peptid ile kombinasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir [Al-Zoreky ve ark., 1991]. Buna benzer diğer bir ticari ürün olan BioProfit, *Lactobacillus rhamnosus* LC 705 ve *Propionibacterium freudenreichii* JS'den oluşmaktadır. Koruyucu kültür olarak kullanılan bu ürünün (10^7 hücre / gram) süt ürünlerindeki mayaları ve ekmek hamurundaki *Bacillus* spp.'leri inhibe ettiği rapor edilmiştir. Bu inhibitör etki iki suş arasındaki sinerjistik aktiviteden kaynaklanmaktadır [Soumalainen ve Mäyrä, 1999].

Microgard ve BioProfit benzeri ürünler propiyonik asit bakterilerinin antimikrobiyal potansiyelinin bir kısmını kanıtlamaktadır. Propiyonik asit bakterileri aynı zamanda antiviral peptidler ve çeşitli bakteriyosinler de üretmektedirler [Holo ve ark., 2002]. Bakteriyosinler mikroorganizmalar tarafından üretilen antibakteriyal peptidler ya da proteinlerdir. Propiyonik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler fizyokimyasal yapısı ve alışılmamış aktivite spektrumu ile ilginç bir grup olarak

bilinmektedir. Bu bakteriyosinler çeşitli bakteri gruplarına karşı antimikrobiyal aktivite göstermektedir [Gwiazdowska ve Trojanowska, 2006].

Çalışmamızda propiyonik asit bakterilerinin Gram (-) patojen bir bakteri olan *E. coli* ATCC 35218 ile Gram (+) bir patojen olan *S. aureus* ATCC 25923 suşları üzerine antimikrobiyal aktivitesi kuyu difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bu aktivitenin belirlenmesi için propiyonik asit bakterileri iki farklı besiyerinde geliştirilmiştir (Skim milk ve YEL-G). Suşların geliştirildiği besiyerine göre antimikrobiyal etkisinin de değiştiği gözlemlenmiştir. Buna göre skimmilk besiyerinde geliştirilen suşların her iki test bakterisine karşı da antimikrobiyal aktivitesinin yüksek olduğu görülmüştür. Bu besiyerinde yüzde asit, toplam propiyonik ve asetik asit miktarının da diğer besiyerine göre yüksek olması antimikrobiyal aktivite ile asit üretimi arasında bir bağlantı olduğunu göstermektedir. Yaptığımız istatistiksel analizler de asit üretimi ile antimikrobiyal aktivite arasında pozitif bir korelasyon olduğunu göstermektedir. Hettinga ve Reinbold, 1972 yılında propiyonik asit bakterilerinin ürettiği propiyonik, asetik asit, diasetil ve hidrojen peroksit gibi metabolitlerin antimikrobiyal etkili metabolitler olduğunu söylemişlerdir. Bu durum asit üretiminin yüksek olduğu besiyerinde antimikrobiyal aktivitenin de yüksek olmasını açıklamaktadır. Ayrıca propiyonik asit bakterileri tarafından üretilen bazı bakteriyosinlerin bazı Gram (-) ve (+) bakteriler üzerine inhibitör etki gösterdiği açıklanmıştır. Gwiazdowska ve Trojanowska, 2006 yılında yaptıkları çalışmada propiyonik asit bakterilerinden hazırlanan bakteriyosin preparatlarının bazı Gram (-) bakteriler üzerine bakteriyostatik etkileri olduğunu göstermişlerdir. Bazı bakteriyosinler sadece kısıtlı bir mikroorganizma grubuna karşı inhibisyon etkisi gösterirken diğerleri Gram (-) bakteriler ve fungusların aralarında bulunduğu geniş bir gruba inhibitör etki göstermektedirler [Holo ve ark., 2002]. Propiyonik asit bakterilerinin ürettiği bakteriyosinlerin özellikle Gram (-) bakteriler üzerine etkili olduğu birçok literatürde belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda da kullandığımız propiyonik asit bakterilerinin Gram (-) bir bakteri olan *E. coli* üzerine daha fazla antimikrobiyal etki göstermesi bu çalışmaları desteklemektedir. Warminska-Radyko ve arkadaşları 2002 yılında yaptıkları bir çalışmada propiyonik asit bakterilerinin gram negatif basiller üzerindeki antimikrobiyal aktivitesini incelemişler ve *E. coli*

O157:H7 suşundaki inhibisyon zonunun 0-24 mm arasında olduğunu, *E. coli* 205 suşundaki inhibisyon zonunun ise 0-25 mm arasında olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca bu çalışmada en yüksek inhibisyon zonları propiyonik asit bakterilerinin 8 günlük kültürlerinde gözlenmiştir. Yaptığımız çalışmada *E. coli* ATCC 35218 suşuna karşı antimikrobiyal aktivitesi en yüksek olan suş *P. acidipropionici* 75 (inhibisyon zonu 8,5 mm) olarak belirlenmiştir. Bu sonucun diğer çalışmalarda elde edilen sonuçlara göre düşük çıkmasının sebebi bizim çalışmamızda propiyonik asit bakterilerinin 4 günlük kültürleri ile çalışılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bir bakterinin probiyotik özelliklerini gösterebilmesi için öncelikle gastrointestinal alandaki epitel hücrelerine bağlanabilmelidir. Gıdalarda güvenilir bir şekilde kullanılan klasik propiyonik asit bakterilerinin probiyotik etkilerini açıklarken aynı zamanda epitel hücrelere tutunma yeteneğini de açığa çıkarmak gereklidir. Bunun için de hücre kültürü üzerinde yapılan in vitro tutunma deneyleri kullanılabilmektedir. Ancak bu çalışma oldukça maliyetlidir ve fazla zaman almaktadır. Bu yüzden bir bakterinin epitel yüzeye tutunma yeteneğini belirleyebilmek için öncelikle daha ucuz ve kolay ön eleme yöntemleri kullanılmalıdır [Del Re ve ark., 2000]. *B. bifidum* ve *B. suis* ile yapılan çalışmalar bu bakterilerin tutunma yetenekleri ve otoagregasyon arasında bir korelasyon olduğunu belirtmişlerdir [Perez ve ark., 1998; Del Re ve ark., 1998]. Bizim de yaptığımız çalışmada bakterilerin birbirine yapışmasında etkili olduğu düşünülen EPS üretimi yüksek olan suşların yüzde agregasyon değerlerine bakılmış ve agregasyon yeteneği en yüksek olan suş *P. acidipropionici* 75 (% 49 ± 4) olarak belirlenmiştir. Çeşitli laktik asit bakterileri ve bifidobakteriler ile yapılan bir çalışmada bu bakterilerin otoagregasyon değerlerinin % 36,2 ile % 51,8 arasında olduğu belirlenmiştir [Xu ve ark., 2009]. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar bu çalışmalarla karşılaştırıldığında elimizdeki suşların otoagregasyon yeteneklerinin yüksek olduğunu göstermektedir. Elde edilen sonuçlar agregasyon yeteneğinin türe ve suşa göre değişken olduğunu göstermektedir. Yine elde edilen sonuçlar suşların agregasyon yeteneğinde EPS üretiminin yanında başka faktörlerin de etkili olduğunu göstermektedir. Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler ışığında agregasyon yeteneği yüksek olan suşlar bu bakterilerin epitel yüzeye tutunması ile ilgili

yapılacak çalışmalarda tercih edilmelidir. Probiyotik bakterilerin sağlığa yararlı etkilerini gösterebilmeleri için agregasyon ile yeterli sayıya gelebilmeleri gerekmektedir.

Probiyotik bakterilerin gastrointestinal alana tutunması bu alana patojen mikroorganizmaların yerleşmesini engellemekte ve böylece gastrointestinal hastalıklar önlenmektedir [Collado ve ark., 2007c]. Probiyotik bakterilerin koagregasyon yeteneği patojen bakterilerin kolonizasyonunu engelleyici bir bariyer görevi görmektedir. Aynı zamanda probiyotik bakteriler bu alanda yaşarken ürettikleri antimikrobiyal metabolitlerle patojen mikroorganizmaların gelişmesini engelleyerek bu etkiyi artırmaktadırlar.

Collado ve arkadaşları, 2008 yılında yaptıkları çalışmada *P. freudenreichii* ssp *shermanii* JS suşunun % otoagregasyon ve çeşitli patojen bakterilerle % koagregasyon yeteneklerine bakmışlardır. Yaptıkları çalışma sonucunda 2 saat sonunda % otoagregasyon değerini 20 °C’de %7,7 iken 37 °C’de %17,4 olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda oda sıcaklığında 4 saat sonundaki % otoagregasyon değerleri %17-49 arasında görülmüştür. Bu sonuçlar Collado ve arkadaşlarının buldukları sonuçlardan oldukça yüksektir. Bu da bize elimizdeki suşların epitel yüzeye tutunmada daha başarılı olacağını, dolayısıyla probiyotik niteliklerinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca otoagregasyon yeteneği yüksek olan suşlar daha dayanıklı olacağından ve daha fazla kolonize olabilme yeteneğine sahip olacağından avantaj sağlamaktadır. Collado ve arkadaşları aynı suşun *S. aureus* patojeni ile % koagregasyon yeteneğini 4 saat sonunda % 6,7 olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda suşların *E. coli* ile % koagregasyon değeri %2-19 arasında iken *S. aureus* ile bu değer %9-16 arasında bulunmuştur. Elde edilen sonuçların daha önce yapılmış çalışmalara göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum bize elimizdeki suşların gastrointestinal alanda patojen bakterilerle koagregasyon olarak bu patojenleri etkisiz kılacağını ve probiyotik olarak % koagregasyon değeri yüksek olan suşların tercih edilmesi gerektiğini göstermektedir. Yüzde koagregasyon yeteneği en yüksek olan *P. acidipropionici* 75 suşu (*E. coli* ile % 19; *S. aureus* ile % 16) aynı zamanda otoagregasyon yeteneği (% 49 ± 4) ve *E. coli* üzerine

antimikrobiyal aktivitesi de en yüksek olan suş olarak dikkat çekmektedir (inhibisyon zon çapı 0,85 cm). *P. acidipropionici* 75 suşu bu özellikleri sayesinde gastrointestinal alanda epitelyum yüzeye daha iyi tutunacak ve enterik patojenlerin yerleşmesini engelleyerek ve bu patojenleri inhibe ederek sağlığa yararlı etkilerini gösterebilmesi sebebiyle probiyotik olarak önerilmektedir.

Propiyonik asit bakterilerinin sağlığa yararlı etkilerinden biri de gastrointestinal sistemde probiyotik olarak bulunan bifidobakterilerin gelişimini düzenlemesidir. Çalışmamızda bu etkiyi belirleyebilmek için asit ve EPS üretimi yüksek olan propiyonik asit bakterisi suşları ile çalışılmıştır. Bu suşların etkisi *B. breve* A28, *B. breve* A10, *B. breve* BASO1 ve *B. longum* BASO20 suşları üzerinde incelenmiştir. *B. breve* A10 ve *B. longum* BASO20 suşlarına herhangi bir BGD aktivitesinin olmadığı belirlenmiştir. Bu durum BGD aktivitesinin aynı türe ait suşlara göre değişebileceğini göstermektedir. Warminska ve Radyko 2002 yılında yaptıkları çalışmada çalıştıkları 27 adet propiyonik asit bakterisi suşundan yalnız 12 tanesinin bifidobakterilerin gelişimini artırdığını tespit etmişlerdir. Aynı şekilde çalışılan bütün bifidobakteri suşlarının gelişiminin düzenlenmediğini, 5 ve 8 günlük propiyonik asit bakterisi kültürleriyle çalıştıklarında inkübasyon süresi kısa olan kültürlerden bifidobakterilerin gelişimini düzenleyen suşların daha fazla olduğunu söylemişlerdir. Bu durumda BGD aktivitesinin çalışılan suşlara göre farklılık gösterdiği, ayrıca BGD aktivitesine sahip moleküllerin propiyonik asit bakterilerinin gelişiminin erken dönemlerinde üretildiği düşünülmektedir.

Bizim çalışmamızda da *P. freudenreichii* spp. *freudenreichii* 21, *P. freudenreichii* spp. *shermanii* 40, *P. freudenreichii* spp. *shermanii* 43-4 ve *P. thoenii* 72 suşlarının *Bifidobacterium breve* A28 ve *B. breve* BASO1 suşlarının gelişimini düzenlediği belirlenmiştir. BGD etkisinin üzerinde en fazla etkili olduğu suş *B. breve* A28 olmuştur. Çalışılan suşlar içerisinde aktivitesi en yüksek olan suş ise *P. thoenii* 72 olarak belirlenmiştir. Bu suşun kültür süpernatantı besiyerine 3 ml eklendiğinde *B. breve* A28 suşunun canlılığını 7,22 log cfu/ml'den 9,44 log cfu/ml'ye; 5 ml eklendiğinde ise 7,65 log cfu/ml'den 9,37 log cfu/ml'ye yükselttiği görülmüştür. Kaneko ve arkadaşları, 1994 yılında yaptıkları çalışmada *P. freudenreichii* 7025 ve

Bifidobacterium adolescentis 6003 suşlarını ayrı ayrı ve birlikte geliştirmişlerdir. Çalışma sonucunda *B. adolescentis* 6003 suşunun tek başına geliştiğinde canlılığın 3,58 log cfu/ml'den 6,57 log cfu/ml'ye yükseldiğini; *P. freudenreichii* 7025 ile birlikte geliştirildiğinde ise 3,58 log cfu/ml'den 8,34 log cfu/ml'ye yükseldiğini görmüşlerdir. Bizim çalışmamız da yapılan bu çalışma ile paralellik göstermiştir. Farklı oranlarda süpernatant eklenmiş (3 ve 5 ml) besiyerlerindeki bifidobakterilerin gelişmelerinde anlamlı bir fark görülmemesi BGD aktivitesine sahip moleküllerin düşük konsantrasyonda da etkili olabildiklerini göstermektedir. Kaneko ve arkadaşları yaptıkları çalışmada BGD moleküllerinin düşük miktarda olsa bile yüksek aktiviteye sahip olduğunu söylemişlerdir. Bu durum bizim çalışmamızı desteklemektedir.

Çalışmamızda sonikasyonun BGD aktivitesini değiştirmedeği gösterilmiştir. Kaneko ve arkadaşları 1994 yılında yaptıkları çalışmada propiyonik asit bakterilerinin sonikasyonla çıkarttıkları hücre ekstraktlarında herhangi bir BGD aktivitesi tespit edememişler ve sonike edilmiş hücrelerden dış ortama BGD moleküllerinin çıkmadığını, dolayısıyla bu moleküllerin propiyonik asit bakterilerinin inkübasyonu sırasında üretilip dış ortama salındığını söylemişlerdir. Bizim çalışmamızda da propiyonik asit bakterisi kültürlerini sonike ettiğimizde BGD aktivitesinde artma olmadığı gibi dikkate değer bir düşüş de gözlenmemiştir. Bu durum da bize sonikasyona bağlı hücre içi BGD aktivitesi oluşturacak bir molekül olmadığı gibi bu aktivitesinin sonikasyondan etkilenmemesi bu molekülün protein yapısında olmadığını göstermektedir. BGD aktivitesi üzerine sonikasyonun etkisi ile ilgili daha önceden yapılmış bir çalışmanın bulunmaması çalışmaya özgünlük katmaktadır. Mori ve arkadaşları 1997 yılında *P. freudenreichii*'den BGD molekülünü saflaştırmışlar kimyasal yapısını açıklamışlardır. Buna göre BGD'nin 2-amino-3-karboksi-1,4-naftokinon (ACNQ) olduğunu belirlemişlerdir. Isawa ve arkadaşları 2002 yılında yeni bir BGD molekülü bulmuşlar ve yapısının 1,4-dihidroksi-2-naftoik asit (DHNA) olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmalar BGD aktivitesini oluşturduğu düşünülen moleküllerin protein, lipid ya da nükleik asit yapısında olmadığını göstermektedir. Yine yaptığımız çalışmalar sonucunda BGD aktivitesi üzerine yüksek sıcaklığın, düşük veya yüksek asitliğin, proteolitik, lipolitik enzimlerin

herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Bu durum BGD aktivitesine sahip molekül ya da moleküllerin protein, lipid, nükleik asit yapısında olmadığını göstermekte ve daha önce yapılmış çalışmaları desteklemektedir. Ayrıca BGD aktivitesinin bu şartlardan etkilenmemesinin tespiti ile eğer bu BGD molekülleri vücuda dışarıdan verilmek istenirse ya da bağırsakta propiyonik asit bakterilerinin gelişimi sırasında üretilirse aktivitesini kaybetmeyeceği gösterilmiştir. Bu durumda propiyonik asit bakterilerinin üretmiş olduğu BGD molekülleri prebiyotik olarak kullanılmak istenildiğinde ağızdan kullanımlarda bu ajanın mide barsak sıvılarındaki farklı pH ve enzimlerden etkilenmemesi bunu daha da avantajlı kılmaktadır. Bu özellikleri sebebiyle propiyonik asit bakterileri probiyotik mikroorganizmalar olarak kullanılabilmesinin yanında prebiyotik olarak da kullanılabileceği düşünülmektedir. Bifidobakterilerin gelişimini artırmak için kullanılan prebiyotikler dışarıdan vücuda alınmakta ve kalın bağırsağa geldiğinde aktivitesini göstermektedir ve bu maddeler genellikle bitkilerden elde edilmektedir. Prebiyotik olarak önerdiğimiz propiyonik asit bakterilerinden BGD molekülleri saflaştırılarak insanlara verildiğinde floradaki bifidobakterilerin gelişimini uyararak bu özelliğini gösterebilir, enzim, değişken pH değerleri ve sıcaklıktan etkilenmeyeceği için bu etki devamlılığını koruyabilecektir. Mikroorganizmalar daha ucuz yöntemlerle mevsim şartları gibi dış faktörlerden etkilenmeden istenildiği zaman bol miktarda üretilbildiği için diğer prebiyotiklere göre daha az maliyetli ve kolay ulaşılabilir bir prebiyotik olarak önerilmektedir.

Propiyonik asit bakterilerinin BGD aktivitesi ile ürettiği metabolitler arasında bir ilişkinin olup olmadığını belirleyebilmek için istatistiksel analizlerden yararlanılmıştır. Yapılan analizler sonucunda BGD aktivitesinin total asit üretimi, propiyonik asit üretimi, EPS üretimi, antimikrobiyal aktivite, otoagregasyon ve koagregasyon arasında anlamlı bir ilişkinin olmadığı görülmüştür. Ancak propiyonik asit üretimi SM besiyerinde en yüksek olan *P. thoenii* 72 suşunun BGD aktivitesinin de yüksek olması BGD molekülleri yanında propiyonik asitin de bu aktiviteyi etkilediğini düşündürmektedir. Kaneko ve arkadaşları 1994 yılında yaptıkları çalışmada propiyonik asitinde bifidobakterilerin gelişimini düzenlediğini belirtmişlerdir. Bu durum da yaptığımız çalışmayı desteklemektedir. Bu çalışmanın

BGD aktivitesi ile propiyonik asit bakterilerinin ürettiği metabolitlerin ilişkilendirilmesi bakımından bir ilk olması çalışmaya özgünlük katmaktadır.

Sonuç olarak bu çalışma sonucunda *P. thoenii* 72 suşu ürettiği yüksek oranda propiyonik asit ile gıdalarda doğal bir koruyucu olarak önerilmektedir. Aynı zamanda bu suş ürettiği yüksek oranda EPS sayesinde insan sindirim kanalında probiyotik özelliklerini gösterecek, yüksek BGD aktivitesi ile prebiyotik bir etki gösterecektir. Bütün bu veriler ışığında hayvan modelleri üzerinde de denemeler yapılarak bu mikroorganizmanın kullanılması önerilebilecektir.

Bu çalışma ile propiyonik asit bakterilerinin gıda ve sağlık sektöründe kullanılabilecek propiyonik asit ve EPS üretimi, antimikrobiyal aktivitesi, otoagregasyon ve koagregasyon yeteneği, bifidobakterilerin gelişimini düzenleyici aktivitesi ve bu aktiviteye bazı faktörlerin etkisinin birlikte araştırıldığı tek çalışma olmuştur. Ayrıca ülkemizde propiyonik asit bakterilerinin BGD aktivitesi ile ilgili yapılmış bir çalışma bulunmaması ve propiyonik asit bakterilerinin ürettiği metabolitlerle BGD aktivitesi ile ilişkilendirildiği ve BGD aktivitesine sonikasyonun etkisinin belirlendiği ilk araştırma olması çalışmamıza ayrıca bir özgünlük katmaktadır. Bu çalışmada kullanılan propiyonik asit bakterilerinin Türkiye’de bulunan el yapımı peynirlerden izole edilmiş olması ülkemizdeki propiyonik asit bakterilerinin faydalı özelliklerinin açığa çıkarılmış olması açısından da önemlidir. Yaptığımız bu çalışmanın BGD aktivitesi ile ileride yapılacak olan çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Al-Zoreky N., Ayres J.W., Sandine W.E., “Antimicrobial activity of Microgard against food spoilage and pathogenic microorganisms”, **J. Dairy Sci.**, 74:758–763 (1991).
- Aslim, B., Beyatli, Y., Yuksekdağ, Z.N., “Productions and monomer compositions of exopolysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from traditional home-made yoghurts and raw milk”, **Int. J. Food Sci. Tech.**, 41(8):973-979 (2006).
- Babuchowski, A., Hammond, E.G., Glatz, B.A., “Survey of propionibacteria for ability to produce propionic and acetic acids”, **J. Food Protect.**, 56:493-496 (1993).
- Barefoot, S.F., Nettles, C.G., “Antibiosis Revisited: Bacteriocins Produced”, **J. Dairy Sci.**, 76:2366-2379 (1993).
- Benjelloun, H., Rochex, A., Lecouturier, D., Dechemi, S., Lebeault, J., “An on-line technique for monitoring propionic acid fermentation”, **Appl. Microbiol. Biot.**, 68:316-321 (2005).
- Bernard, K.A., Shuttleworth, L., Munro, C., Forbes-Faulkner, J.C., Pitt, D., Norton, J.H., Thomas, A.D., “*Propionibacterium australiense* sp. nov. derived from granulomatous bovine lesions”, **Anaerobe**, 8:41–47 (2002).
- Biavati, B., Mattarelli, P., “The family Bifidobacteriaceae. In: The Prokaryotes” (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H. and Stackebrandt, E., Eds.). **Springer**, New York 1–70 (2001).
- Biavati, B., Vescovo, M., Torriani, S., Bottazzi, V., “Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications”, **Ann. Microbiol.**, 50:117-131 (2000).
- Bibiloni, R., Fernando, P., De Antoni, G.L., “Will a high adhering capacity in a probiotic strain guarantee exclusion of pathogens from intestinal epithelia”, **Anaerobe**, 5:519–524 (1999).
- Bodie, E., Anderson, T., Goodman, N., Schwartz, R., “Propionic acid fermentation of ultra-high-temperature sterilized whey using mono- and mixed-cultures”, **Appl. Microbiol. Biot.**, 25:434-437 (1987).
- Britz, T.J., Riedel, K.H.J., “*Propionibacterium* species diversity in Leerdammer cheese”, **Int. J. Food Microbiol.**, 22:257–267 (1994).
- Bujňáková, D., Vlková, E., Rada, V., Kmeť, V., “Aggregation of lactobacilli and bifidobacteria with *Escherichia coli* O157”, **Folia Microbiol.**, 49:143–146 (2004).

Carrondo, M.J.T., Crespo, J.P.S.G., Moura, M.J., “Production of propionic acid using a xylose utilizing *Propionibacterium*”, **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 17:295-312 (1988).

Chabot, S., Yu, H., de Léséleuc, L., Cloutier, D., van Calsteren, M.R., Lessard, M., Roy, D., Lacroix, M., Oth, D., “Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW- 9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN-gamma in mouse splenocytes”, **Lait**, 81:683–697 (2001).

Collado, M.C., Meriluoto, J., Salminen, S., “Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: In vitro evaluation of different methods”, **J. Microbiol. Meth.**, 71:71–74 (2007a).

Collado, M.C., Meriluoto, J., Salminen, S., “Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus”, **Lett. Appl. Microbiol.**, 45:454–460 (2007b).

Collado, M.C., Surono, I., Meriluoto, J., Salminen, S., “Indigenous lactic acid bacteria: cell-surface properties and interactions with pathogens”, **J. Food Sci.**, 72:89–93 (2007c).

Collado, M.C., Meriluoto, J., Salminen, S., “Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains”, **Eur Food Res Technol**, 226:1065–1073 (2008).

Collins, M.D., Gibson, G.R., “Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut”, **Am. J. Clin. Nutr.**, 69:1052-1057 (1999).

Colomban, A., Roger, L., Boyaval, P., “Production of propionic acid from whey permeate by sequential fermentation, ultrafiltration, and cell recycling”, **Biotechnol Bioeng.**, 42:1091-1098 (1993).

Cousin, F.J., Mater, D.D.G., Foligne, B., Jan, G., “Dairy propionibacteria as human probiotics: A review of recent evidence”, **Dairy Sci. Technol.**, 1-25 (2010).

Crow, L., “Polysaccharide production by propionibacteria during lactose fermentation”, **Appl. Environ. Microbiol.**, 54:1892-1895 (1988).

Cummins, C.S.; Johnson, J.L., “In The Prokaryotes; Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H., Eds.” **Springer**: New York, Vol. 1:834–849 (1992).

Dabour, N., LaPointe, G., Benhamou, N., Fliss, I., Kheadr, E., “Impact of ropy and capsular exopolysaccharide-producing strains of *Lactococcus lactis* subsp. cremoris on reduced-fat Cheddar cheese production and whey composition”, **Int. Dairy J.**, 15:1044–1055 (2005).

De Simone, C., Ciardi, A., Grassi, A., “Effect of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* on gut mucosa and peripheral blood B lymphocytes”, ***Immunopharm. Immunot.***, 14: 331–40 (1992).

De Vuyst, L., Degeest, B., “Exopolysaccharides from lactic acid bacteria. Technological bottlenecks and practical solutions”, ***Macromol. Symp.***, 140:31–41 (1999).

De Vuyst, L., de Vin, F., Vaningelgem, F., Degeest, B., “Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria”, ***Int. Dairy J.***, 11:687–707 (2001).

Deborde, C., “*Propionibacterium* spp.” in Encyclopedia of Dairy Sciences. Eds. Robinski, H., Fuquay, J.W., Fox, P.F., ***Academic Press***, 2330–2339 (2003).

Del Re, B., Busetto, A., Vignola, G., Sgorbati, B. and Palenzona, D., “Autoaggregation and adhesion ability in a *Bifidobacterium suis* strain”, ***Lett. Appl. Microbiol.***, 27:307-310 (1998).

Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., Palenzola, D., “Adhesion, auto-aggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*”, ***Lett. Appl. Microbiol.***, 31:438–442 (2000).

Demirci, M., Ve Gündüz, H., "Süt Teknolojisi El Kitabı", ***Hasad Yayıncılık, Ankara***, 184 (1994).

Dobruchowska, J.M., Gerwig, G.J., Babuchowski, A., Kamerling, J.P., “Structural studies on exopolysaccharides produced by three different propionibacteria strains”, ***Carbohydrate Research***, 343:726-745 (2008).

Draughon, F.A., Mobley, D.C., Safley, L.M., Backus, W.R., “Effect of calcium propionate and sodium diacetate on fungi in stillage”, ***J Food Sci.***, 44:1018-1019 (1982).

Duboc, P.; Mollet, B., “Applications of exopolysaccharides in the dairy industry”, ***Int. Dairy J.***, 11:759–768 (2001).

Eaton, D.C., Gabelman, A., “Fed-batch and continuous fermentation of *Selenomonas ruminantium* for natural propionic, acetic and succinic acids”, ***J Ind Microbiol.***, 15:32-38 (1995).

Ekmekci, H., Aslim, B., Ozturk, S., “Characterization of vaginal lactobacilli coaggregation ability with *Escherichia coli*”, ***Microbiol Immunol.***, 53:59–65 (2009).

Emde, R., Schink, B., “Enhanced propionate formation by *Propionibacterium freudenreichii* in a three-electrode amperometric culture system”, **Appl Environ Microbiol.**, 56:2771-2776 (1990).

Faber, E.J., Zoon, P., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G., “The exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* Rs and Sts have the same repeating unit but differ in viscosity of their milk cultures”, **Carbohydrate Research**, 310:269–276 (1998).

FAO, WHO, “Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation”, **FAO Food Nutr. Pap.**, (2006).

Frengova, G.I.; Simova, E.D.; Beshkova, D.M., Simov, Z.I., “Production and monomer composition of exopolysaccharides by yogurt starter cultures”, **Canadian J. Microbiol.**, 46:1123-1127 (2000).

Fujiwara, S., Hashiba, H., Hirota, T., Forstner, J.F., “Proteinaceous factor(s) in culture supernatant fluids of bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* to gangliosylceramide”, **App. Environ. Microbiol.**, 63:506–512 (1997).

Gautier, M., “*Propionibacterium*”, **Encyclopedia of Food Microbiology**, 1850–1857 (2004).

Gibson, G.R., Wang, X., “Bifidogenic Properties of Different types of Fructooligosaccharides”, **Food Microbiol.**, 11:491-498 (1994).

Gomes, A.M.P., Malcata, F.X., “*Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics”, **Trends in Food Sci. Technol.**, 10:139-157 (1999).

Gorret, N., Maubois, J.L., Engasser, J.M., Ghoul, M., “Study of the effects of temperature, pH and yeast extract on growth and exopolysaccharides production by *Propionibacterium acidi-propionici* on milk microfiltrate using a response surface methodology”, **J. Appl. Microbiol.**, 90:788–796 (2001a).

Gorret, N., Maubois, J.L., Ghoul, M., Engasser, J.M., “Exopolysaccharide production by *Propionibacterium acidi-propionici* on milk microfiltrate”. **J. Appl. Microbiol.**, 90:779–787 (2001b).

Goswami, V., Srivastava, A.K., “Fed-batch propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici*”, **Biochem. Eng. J.**, 4:121-128 (2000).

Guarner, F., Malagelada, J.R., “Gut flora in health and disease”, **Lancet**, 361:512–519 (2003).

Gwiazdowska, D., Trojanowska, K., “Antimicrobial activity and stability of partially purified bacteriocins produced by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *freudenreichii* and ssp. *shermanii*”, **Lait**, 86:141–154 (2006).

Handley, P.S., Harty, D.W., Wyatt, J.E., Brown, C.R., Doran, J.P., Gibbs, A.C., “A comparison of the adhesion, coaggregation and cell-surface hydrophobicity properties of fibrillar and fimbriate strains of *Streptococcus salivarius*”, **J Gen Microbiol.**, 133(11):3207–3217 (1987).

Hendricks, B., Korus, R.A., Heimsch, R.C., “Propionic acid production by bacterial fermentation”, **Biotechnol Bioeng.**, 15:241–245 (1986).

Hettinga, D.H., Reinbold, G.W., “The propionic acid bacteria - a review. I- Metabolism”, **J Milk Food Technol.**, 35:358–372 (1972).

Hojo, K., Yoda, N., Tsuchita, H., Ohtsu, T., Seki, K., Taketomo, N., Murayama, T., Iino, H., “Effect of ingested culture of *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 on fecal microflora and stool frequency in healthy females”, **Bioscience Microflora**, 21:115–120 (2002).

Holo, H., Faye, T., Brede, D. A., Nilsen, T., Ødegard, I., Langsrud, T., Brendehaug, J., Nes, I. F., “Bacteriocins of propionic acid bacteria”, **Lait**, 82:59–68 (2002).

Holzapfel, W.H., “Introduction to prebiotics and probiotics, In Goktepe, I., Junepa, V. K., Ahmedna, M. (ed.), Probiotics in food safety and human health”, **CRC Press, Florida**, 1–34 (2006).

Huitson, J. J., “Cereals preservation with propionic acid”, **Process Biochem.**, 31–32 (1968).

Isawa, K., Hojo, K., Yoda, N., Kamiyama, T., Makino, S., Saito, M., Sugano, H., Mizoguchi, C., Kurama, S., Shibasaki, M., Endo, N., Sato, Y., “Isolation and identification of a new bifidogenic growth stimulator produced by *Propionibacterium freudenreichii* ET-3”, **Biosci. Biotech. Biochem.**, 66:679–681 (2002).

Jian W., “New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences”, **Int. J. Systematic and Evol. Microbiol.**, 51:1633–1638 (2001).

Kaneko, T., Mom, H., Iwata, M., Meguro, S., “Growth Stimulator for Bifidobacteria Produced by *Propionibacterium freudenreichii* and Several Intestinal Bacteria”, **J. Dairy Sci.**, 77:393–404 (1994).

Kim, B.H., Gadd, G.M., “Bacterial physiology and metabolism 1st ed.”, **Cambridge University Press**, New York, 278–280 (2008).

Klaenhammer, T.R., “Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria”, *FEMS Microbiol. Rev.*, 12:39–86 (1993).

Klijn, A., Mercenier, A., Arigoni, F., “Lessons from the genomes of bifidobacteria”, *FEMS Microbiol. Rev.*, 29:491–509 (2005).

Koussemon, M., Combet-Blanc, Y., Patel, B.K., Cayol, J.L., Thomas, P., Garcia, J.L., Ollivier, B., “*Propionibacterium microaerophilum* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from olive mill wastewater”, *Int. J. Systematic and Evol. Microbiol.*, 51:1373–1382 (2001).

Kouya, T., Misawa, K., Horiuchi, M., Nakayama, E., Deguchi, M., Tanaka, T., Taniguchi, M., “Production of extracellular bifidogenic growth stimulator by anaerobic and aerobic cultivations of several propionibacterial strains”, *J. Biosci. Bioeng.*, 103:464–471 (2007).

Kusano, K., Yamada, H., Niwal, M., Yamasato, K., “*Propionibacterium cyclohexanicum* sp. nov., a new acid-tolerant omega-cyclohexyl fatty acid containing *Propionibacterium* isolated from spoiled orange juice”, *Int. J. Systematic Bacteriol.*, 47:825–831 (1997).

Laws, A., Gu, Y.C., Marshall, V., “Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria”, *Biotechnol. Adv.*, 19:597–625 (2001).

Leahy, S.C., Higgins, D.G., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D., “Getting beter with bifidobacteria. A review”, *J. Appl. Microbiol.*, 98:1303–1315 (2005).

Lewis, P.V., Yang, S.T., “Propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici*: effect of growth substrate”, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 37:437–442 (1992a).

Lewis, P.V., Yang, S.T., “A novel extractive fermentation process for propionic acid production from whey lactose”, *Biotechnol Prog.*, 8:104–110 (1992b).

Lueck, E., “Propionic acid. In: Lueck E (ed) Antimicrobial food additives. Characteristics, Uses, Effects.”, *Springer, Berlin Heidelberg New York*, 175–182. (1980).

Makino, S., Ikegami, S., Kano, H., Sashihara, T., Sugano, H., Horiuchi, H., Saito, T., Oda, M., “Immunomodulatory effects of polysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1”, *J. Dairy Sci.*, 89:2873–2881 (2006).

Malik, A., Sakamoto, M., Ono, T., Kakii, K., “Coaggregation between *Acinetobacter johnsonii* S35 and *Microbacterium esteraromaticum* strains isolated from sewage activated sludge”, *J. Biosci. Bioeng.*, 96:10–15 (2003).

Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R.M., Remaud-Siméon, M., “Homopolysaccharides from lactic acid bacteria”, *Int. Dairy J.*, 11:675–685 (2001).

Moreau, M. C., “Intestinal flora, prebiotics and effects on intestinal immune response to IgA”, *Archives de Pédiatrie*, 7:247–248 (2000).

Mori, H., Sato, Y., Taketomo, N., Kamiyama, T., Yoshiyama, Y., Meguro, S., Sato, H., and Kaneko, T., “Isolation and structural identification of bifidogenic growth stimulator produced by *Propionibacterium freudenreichii*”, *J. Dairy Sci.*, 80:1959–1964 (1997).

Nakajima, H., Suzuki, Y., Kaizu, H., Hirota, T., “Cholesterol lowering activity of ropy fermented milk”, *J. Food Sci.*, 57:1327–1329 (1992).

Nordmark, E., Yang, Z., Huttunen, E., Widmalm, G., “Structural studies of the exopolysaccharide produced by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS”, *Biomacromol.*, 6:521-523 (2005).

Ouwehand, A.C., Isolauri, E., Salminen, S.J., “The role of the intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood”, *Eur.J.Nutr.* 41:132–137 (2002).

Ouwehand, C.A., “The probiotic potential of Propionibacteria. Lactic Acid Bacteria –Microbiological and Functional Aspects”, Third Edition, *Marcel Dekter*, 159–175 (2004).

Perez, P.F., Minnaard, Y., Disalvo, E.A. and De Antoni, G.L., “Surface properties of bifidobacterial strains of human origin”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:21-26 (1998).

Picard, C., Fioramonti, Francois, J. A., Robinson, T., Neant, F., Matuchansky, C., “Review article: bifidobacteria as probiotic agents – physiological effects and clinical benefits”, *Alimen. Pharma. Therap.*, 22:495–512 (2005).

Piveteau, P., “Metabolism of lactate and sugars by dairy propionibacteria: A review”, *Lait*, 79: 23-41 (1999).

Playne, M.J., “Propionic and butyric acids”, In M. Moo-Young (ed.), *Comprehensive biotechnology*, vol. 3. *Pergamon Press, Oxford*, 731-759 (1985).

Quesada-Chanto, A., Afschar, A. S., Wagner, F., “Microbial production of propionic acid and vitamin B12 using molasses or sugar”, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 41:378-383 (1994).

Racine, M., Dumont, J., Champagne, C.P., Morin, A., “Production and characterization of the exopolysaccharide from *Propionibacterium acidipropionici* on whey-based media”, *J. Appl. Bacteriol.*, 71:233-238 (1991).

Reddy, M.S., Washam, C.J., Reinbold, G.W., Vedamuthu, E.R., “Immunogenic properties of slime from propionibacteria”, *J. Milk Food Technol.*, 36:200-201 (1973).

Reinheimer, J.A., Demkow, M.R., Condioti, M.C., “Inhibition of coliform bacteria by lactic cultures”, *Aust J. Dairy Technol.*, 5:5-9 (1990).

Reniero, R., Cocconcelli, P., Bottazzi, V., Morelli, L., “High frequency of conjugation in *Lactobacillus* mediated by an aggregation-promoting factor”, *J Gen Microbiol.*, 138:763–768 (1992).

Rickert, D.A., Glatz, C.E., Glatz, B.A., “Improved organic acid production by calcium alginate-immobilized propionibacteria”, *Enzyme and Microbial Technol.*, 22: 409-414 (1998).

Ruas-Madiedo, P., de los Reyes-Gavilan, C. G., “Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria”, *J. Dairy Sci.*, 88:843–856 (2005).

Saavedra, J.M., Bauman, N.A., Oung, I., Perman, J.A., Yolken, R.H., “Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus”, *Lancet*, 344:1046–9 (1994).

Salih, M.A., Sandine, W.E., Ayres, J.W., “Inhibitory effects of Microgard on yogurt and cottage cheese spoilage organisms”, *J. Dairy Sci.*, 73:887–893 (1990).

Satomi, K., Kurihara, H., Isawa, K., Mori, H., Kaneko, T., “Effects of culture-powder of *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 on fecal microflora of normal adults”, *Biosci. Microflora*, 18:27–30 (1999).

Schell, M.A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., Zwahlen, M.C., Desiere, F., Bork, P., Delley, M., Pridmore, R.D., Arigoni, F., “The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99:14422–14427 (2002).

Schiffrin, E.J., Rochat, F., Link-Amster, H., Aeschlimann, J.M., Donnet-Hughes, A., “Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria”, *J. Dairy Sci.*, 78: 491–7 (1995).

Skogen, L.O., Reinbold, G.W., Vedamuthu, E.R., “Capsulation of Propionibacterium”, *J. Milk Food Technol.*, 37:314-321 (1974).

Soumalainen T., Mäyrä-Mäkinen A., “Propionic acid bacteria as protective cultures in fermented milks and breads”, *Lait*, 79:165–174 (1999).

Stackebrandt, E., Rainey, A., Ward-Rainey, N. L., “Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov.”, **Int. J. Systematic Bacteriol.**, 47:479–491 (1997).

Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., “Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut”, **Appl. Environ. Microbiol.**, 65:4799–807 (1999).

Sutherland, I.W., “Novel and established applications of microbial polysaccharides”, **Trends Biotechnol.**, 16:41–46 (1998).

Suzuki, A., Mitsuyama, K., Koga, H., Tomiyasu, N., Masada, J., Takaki, K., Tsuruta, O., Toyonaga, A., Sata, M., “Bifidogenic growth stimulator for the treatment of active ulcerative colitis: a pilot study”, **Nutrition**, 22:76–81 (2006).

Tannock, G.W., “Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspects”, **Caister Academic Press, USA**, (2005).

Thierry, A., Maillard, M.B., Richoux, R., Kerjean, J.R., Lortal, S., “*Propionibacterium freudenreichii* strains quantitatively affect production of volatile compounds in Swiss cheese”, **Le Lait**, 85:57–74 (2005).

Torino, M. I.; Taranto, M. P.; Sesma, F. and Font de Valdez, G., “Heterofermentative pattern and exopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* 15807 in response to environmental pH”, **J. Appl. Microbiol.**, 91:846–852 (2001).

Vlková, E., Rada, V., Šmehilová, M., Killer, J., “Auto-Aggregation and Co-Aggregation Ability in Bifidobacteria and Clostridia”, **Folia Microbiol.** 53(3):263–269 (2008).

Wang, L., Lv, J., Chu, Z., Cui, Y., Ren, X., “Production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii*”, **Food Chemistry**, 103:313–318 (2007).

Ward, P., Roy, D., “Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria”, **Le Lait**, 85:23–32 (2005).

Warminska-Radyko, I., Laniewska-Moroz, L., Babuchowski, A., “Possibilities for stimulation of *Bifidobacterium* growth by propionibacteria”, **Lait**, 82:113–121 (2002).

Welman, A.D., Maddox, I.S., “Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges”, **Trends in Biotechnol.**, 21:269–274 (2003).

Woscov, S.A., Glatz, B.A., “Propionic acid production by a propionic acid-tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici* in batch and semicontinuous fermentation”, **Appl. Environ. Microbiol.**, 57(10):2821–2828 (1991).

Xu, H., Jeong, H.S., Lee, H.Y., Ahn, J., “Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains”, ***Lett Appl Microbiology***, 49:434-442 (2009).

Yamasaki, S., Kano, K., Ikeda, T., Isawa, K., Kaneko, T., “Mechanistic study on the role of a bifidogenic growth stimulator based on physicochemical characterization”, ***Biochimica et Biophysica Acta.***, 1425:516–526 (1998).

Zhang, A. And Yang, S.T., “Propionic acid production from glycerol by metabolically engineered *Propionibacterium acidipropionici*” , ***Process Biochemistry***, 44:1346–1351 (2009).

Zoetendal, E.G., Mackie, R.I., “Molecular methods in microbial ecology, In Tannock, G.W. (ed.), Probiotics and prebiotics: scientific aspects”, ***Caistar Academic Press, Wymondham, UK***, 1–24 (2005).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : AYDIN, Betül
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 20.08.1986 Ankara
Medeni hali : Evli
Telefon : 0 (505) 818 52 06
Faks : 0 (312) 212 22 49
e-mail : barslan@gazi.edu.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Gazi Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	2008
Lise	Süleyman Demirel Anadolu Lisesi	2004

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2009-2011	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce