

**T. C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN  
KULLANIMI İLE  
KOLESTEROLÜN AZALTIKMASI**

**HATİCE ALOĞLU**

**Danışman: Yrd. Doç. Dr. Zübeyde ÖNER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**ISPARTA, 2005**

## ÖZET

Bu çalışmada gastrit ve spesifik olmayan gastrit rahatsızlığı bulunan 21 bireyden alınan gastrik biyopsi ve dışkı örnekleri ile 13 sağlıklı bireyden sağlanan dışkı örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin kolesterolü azaltabilme özellikleri incelenmiştir.

96 adet laktobasil ve 33 adet enterokokun, 150 µg/mL kolesterol ilave edilmiş MRS-THIO sıvı besiyerinden kolesterolü azaltma yüzdeleri belirlenmiştir. Bu amaçla 24 saatlik inkübasyon sonrası süpernatantaki, peletteki ve kontroldeki kolesterol miktarları spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Laktobasillerden kolesterolü azaltma yüzdesi en yüksek bakteri %58.17 ile *L. casei* subsp. *casei* BK10-48, en düşük bakteri ise % 0.49 kolesterol azaltma oranı ile *L. acidophilus* AB5-18'dur. Enterokoklardan ise kolesterolü azaltma yüzdesi en yüksek bakteri %52.24 ile *E. faecalis* BC21-104, en düşük bakteri ise % 4.69 kolesterol azaltma oranı ile *E. malodoratus* AK7-32'dir. Ayrıca bakterilerin 24 saatlik inkübasyonları sonrasında pH tayinleri de yapılmış ve pH değişimi ile kolesterol azalımı arasında bir ilişki bulunamamıştır. pH değerleri oldukça değişkenlik göstermiştir. Bakterilerin gösterdiği en düşük pH değeri 4.18 iken en yüksek değer 5.30'dur.

İncelenen bakteriler arasında kolesterol azaltma yüzdeleri yüksek olan 13 tanesi seçilmiştir. Seçilen bakterilerin asit ve safra toleransları ayrıca safra tuzlarını dekonjuge etme özellikleri incelenmiştir. 13 bakteriden 6 tanesi 60. dakikaya kadar canlılığını kaybetmişken 4 tanesi pH 2'de 120 dakika süresince canlılığını devam ettirebilmiştir. Bakterilerin safra toleransları değişkenlik göstermiş ve bakterilerden bir tanesi safra tuzu varlığında hiç gelişmemiştir. *L. agilis* AC3-10 safraya dayanıklılığı en yüksek bakteri iken *L. agilis* BK10-47 safra dayanıklılığı en düşük bakteridir.

Seçilen 13 adet bakterinin %15 yağlı kremada kolesterolü azaltma özellikleri incelenmiştir. Kremadaki kolesterol tayini gaz kromatografisinde yapılmıştır. Bakterilerin kremadaki kolesterolü azaltma yüzdeleri ile sıvı besiyerindeki azaltma yüzdeleri arasında farklılıklar görülmüştür. MRS-THIO sıvı besiyerinde kolesterolü

en fazla azaltan mikroorganizma *L. casei* subsp. *casei* BK10-48 iken kremada *L. maltaromicus* AC3-16 ve *L. maltaromicus* A21-101 en iyi azaltmayı yapmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Kolesterol azaltma oranı, Laktik asit bakterileri, Asit toleransı, Safra toleransı

## ABSTRACT

In this study, cholesterol assimilation of lactic acid bacteria which were isolated previously from feces samples of 13 healthy persons and gastric biopsy samples of 21 persons who have gastritis or non specific gastritis were investigated.

Cholesterol reduction rate of 96 lactobacilli and 33 enterococci were determined in MRS-THIO broth supplemented with 150 µg/ml cholesterol. For this purpose cholesterol in culture supernatants, pellets and control samples were determined by spectrophotometric methods after 24h incubation period.

Among Lactobacillus, while *L. casei* subsp. *casei* BK10-48 has shown the highest cholesterol assimilation ( 58.17 %) and *L. acidophilus* AB5-18 the lowest (0.49 %). Regarding cholesterol reduction ability of enterococci, maximum assimilation was determined in *E. faecalis* BC21-104 (52.24%) and minimum assimilation in *E. malodoratus* AK7-32(4.69 %). Besides pH was determined after 24 h incubation. There was no evidence for any correlation between the pH and cholesterol assimilation ratio. pH value of the cultures rather varied from 4.18 to 5.30.

Thirteen lactic acid bacteria having high cholesterol reduction ratio were selected. Selected bacteria were examined for their acid tolerance, bile salt tolerance and deconjugation of bile salt. Among these 13 bacteria, 6 bacteria were inhibited after 60 min. at pH 2.0, 4 bacteria could survive for 120 min. Bile salt tolerance of the strains was variable. One bacterium did not grow in bile salt MRS-THIO broth. *L. agilis* AC3-10 was the most resistant strain to bile salt however, *L. agilis* BK10-47 was the most sensitive strain. Cholesterol assimilation of these bacteria were also examined by using a gas chromatographic method in cream (Fat 15 %). *L. casei* subsp. *casei* BK10-48 caused the highest cholesterol reduction in MRS-THIO broth while *L. maltaromicus* AC3-16 and *L. maltaromicus* A21-101 had the best cholesterol assimilation in cream.

**Keywords:** Cholesterol reduction ratio, Lactic acid bacteria, Acid tolerance, Bile tolerance

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
İÇİNDEKİLER .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
1. GİRİŞ .....	V
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	X
2. 1. Kolesterolün Yapısı .....	x
2. 2. İnsan Organizmasında Kolesterol .....	xi
2. 3. Kolesterolün Kanda Taşınma İşlemi .....	xii
2. 3. 1. Plazma Lipoproteinleri .....	xii
2. 3. 1. 1. Şilomikronlar (CM) .....	xiii
2. 3. 1. 2. Çok Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler (VLDL) .....	xiii
2. 3. 1. 3. Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler (LDL) .....	xiii
2. 3. 1. 4. Yüksek Yoğunluklu Lipoproteinler (HDL) .....	xv
2. 4. Diyetle Alınan Kolesterolün Vücut Üzerindeki Etkisi .....	xv
2. 5. Kan Kolesterolü ve Kalp Damar Hastalıkları .....	xv
2. 6. Fermente veya Fermente Olmamış Süt Mamüllerinin Kolesterol Konsantrasyonuna Etkisi .....	xviii
2. 6. 1. Süt Tüketiminin Kolesterol Düşürücü Etkisi .....	xix
2. 6. 2. Fermente Süt Ürünlerinin Kolesterol Konsantrasyonu Üzerine Etkisinin Hayvanlar Üzerinde Yapılan Çalışmalarla İncelenmesi .....	xx
2. 7. Gıdalardaki Kolesterolün Azaltılması .....	xxii
2. 7. 1. Biyolojik Yolla Kolesterolün Azaltılması .....	xxiii
2. 7. 2. Kimyasal Yolla Kolesterolün Azaltılması .....	xxiv
2. 7. 2. 1. Katı - Sıvı Ekstraksiyonu .....	xxiv
2. 7. 2. 2. Kompleks Oluşturma .....	xxiv
2. 7. 3. Fiziksel Yolla Kolesterolün Azaltılması .....	xxv
2. 7. 3. 1. Distilasyon ve Kristalizasyon .....	xxv
2. 7. 3. 2. Süperkritik Sıvı Ekstraksiyonu .....	xxvi

2. 8. Laktik Asit Bakterileri ile Serum Kolesterol Düzeyinin Düşürülmesi .....	xxvii
3. MATERYAL VE METOT .....	XXXİ
3. 1. Materyal .....	xxxı
3. 2. Metot .....	xxxı
3. 2. 1. Saf Kültürlerin Muhafaza Edilmesi .....	xxxı
3. 2. 2. Kültürlerin Aktifleştirilmesi .....	xxxii
3. 2. 3. Sıvı Besiyerinin Hazırlanması .....	xxxii
3. 2. 4. Suda Çözünür Kolesterolün Hazırlanması .....	xxxiii
3. 2. 5. Bakteriler Tarafından Azalan Kolesterolün Ölçümü .....	xxxiii
3. 2. 6. Kültürlerin Asit Toleransı .....	xxxiv
3. 2. 7. Kültürlerin Safra Tuzuna Dayanıklılık Testi .....	xxxiv
3. 2. 8. Kültürlerin Safra Tuzlarını Dekonjuge Etme Özelliklerinin Belirlenmesi	xxxv
3. 2. 9. Kültürlerin Kremadaki Kolesterolü Azaltma Özelliklerinin Belirlenmesi	xxxv
3. 2. 9. 1. Kültürlerin Hazırlanması .....	xxxv
3. 2. 9. 2. Kolesterol Standardının Hazırlanması .....	xxxvi
3. 2. 9. 3. Gaz Kromatografisi Çalışma Şartları .....	xxxvi
3. 2. 9. 4. Örnek Hazırlama .....	xxxvi
3. 3. İstatistiksel Analizler .....	xxxvi
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....	xxxvii
4. 1. Bakteriler Tarafından MSR-THİO Sıvı Besiyerinde Azalan Kolesterolün Ölçümü .....	xxxvii
4. 2. Kültürlerin Asit Toleransı .....	xlviii
4. 3. Kültürlerin Safra Toleransı .....	lii
4. 4. Kültürlerin Safra Tuzlarını Dekonjuge Etme Özelliklerinin Belirlenmesi .....	lvii
4. 5. Kültürlerin Kremada Kolesterol Azaltması .....	lxi
5. SONUÇ .....	LXİİİ
KAYNAKLAR .....	LXİV
ÖZGEÇMİŞ .....	LXXİİ

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.1. Kolesterolün Yapısı .....	4
Şekil 2.1.2. Kolesterolün Yapısı .....	4
Şekil 2.2. Karaciğer kolesterolünün kaynakları ve kolesterolün karaciğerden ayrılma yolları .....	6
Şekil 2.3.1. Lipoproteinlerin genel yapısı .....	7
Şekil 2.3.1.3. LDL partiküllerinin alım ve yıkımı .....	8
Şekil 2.5.1. Normal insan karaciğerinde LDL reseptörlerinin durumu.....	11
Şekil 2.5.2 Bireysel ve aileden gelen hiperkolesterolemi' de karaciğer LDL reseptörleri .....	11
Şekil 2.5.3 Yüksek kolesterol içeren diyetle beslenen bireylerde LDL reseptörlerinin durumu .....	12
Şekil 4.2.1. <i>L. agilis</i> suşlarının asit toleransları .....	45
Şekil 4.2.2. <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> suşlarının asit toleransları.....	45
Şekil 4.3.1. <i>L. agilis</i> AC3-10 safra toleransı .....	49
Şekil 4.3.2. <i>L. maltaromicus</i> AC3-16 safra toleransı.....	49
Şekil 4.3.3. <i>L. agilis</i> AB7-35 safra toleransı.....	49
Şekil 4.3.4. <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> AB16-65 safra toleransı .....	49
Şekil 4.3.5. <i>L. murinus</i> BB16-75 safra toleransı .....	49
Şekil 4.3.6. <i>L. intestinalis</i> AC18-85 safra toleransı .....	49
Şekil 4.3.7. <i>L. maltaromicus</i> A21-101 safra toleransı .....	50
Şekil 4.3.8. AK4-19 safra toleransı.....	50
Şekil 4.3.9. <i>L. agilis</i> BK10-47 safra toleransı.....	50
Şekil 4.3.10. <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> BK10-48 safra toleransı .....	50
Şekil 4.3.11. <i>E. malodaratus</i> BK9-43 safra toleransı .....	50
Şekil 4.3.12. AC12-48 safra toleransı .....	51
Şekil 4.4.1. Taurokolik asitin (TCA) sodyum tuzunu içeren MRS agar üzerinde gelişen koloniler .....	53

Şekil 4.4.2. Taurokolik asitin (TCA) sodyum tuzunu içeren MRS agar üzerinde gelişen koloniler .....	53
Şekil 4.4.3. Glikokolik asitin (TCA) sodyum tuzunu içeren MRS agar üzerinde gelişen koloniler .....	54
Şekil 4.4.4. Glikokolik asitin (TCA) sodyum tuzunu içeren MRS agar üzerinde gelişen koloniler .....	54
Şekil 4.5.1. Kolesterol standardına ait kromatogram .....	56
Şekil 4.5.2. <i>L.agilis</i> AC3-10 bakterisinin kremadaki inkübasyonu sonrasında kremadaki kolesterol miktarını gösteren kromatogram .....	56



## 1. GİRİŞ

Kolesterol, hayvanlar alemindeki tüm canlıların hücre membranında bulunan ve insan metabolizmasında önemli rol oynayan organik bir maddedir. Kanda ve bütün organizmada belirli miktarda kolesterol bulunur. Safra asitleri ile cinsiyet ve adrenalin hormonları gibi bazı steroid hormonların biyosentezinde kolesterol gereklidir. Vücuda gıda maddeleri yolu ile giren ve bağırsaklarda absorbe edilen kolesterolden çok daha fazlası aslında vücut tarafından ihtiyaca bağlı olarak sentezlenmektedir (Gönç vd., 1996). Yetişkin normal bir insanın vücudunda yaklaşık 150 g kolesterol bulunmaktadır. Dışkı ve diğer yollarla meydana gelen kayıpları karşılamak için ise vücut tarafından günde 750-1500 mg kolesterol sentez edilmektedir. Kolesterol, ince bağırsaklarda (safra asitlerinde olduğu gibi) diyetle alınan yağ absorpsiyonunu sağlar, hücre zarları ve sinirlerin temel bileşenlerinden biridir ve böbrek üstü bezi korteksindeki steroid hormonları ile D vitamininin öncül maddesi olup, genç memelilerin gelişimi ve büyümesi için temel bir maddedir. Ayrıca kolesterolün karaciğerdeki yıkım ürünü olan safra tuzları yağların sindirimini gerçekleştirir (Demirci vd., 1996; Anar, 1998).

Süt yağının doğal bir bileşeni olan kolesterol bütün hayvan türlerinin sütlerinde bulunmaktadır. İnsanlarda artan kolesterol miktarı hiperkolesterolemiye yol açabilmekte ve bu da koroner kalp hastalığında risk faktörü kabul edilmektedir. Örneğin; plazmada kolesterolün artması dolaşım sisteminde atherosklerotik değişikliklerin oluşumunu hızlandırmaktadır (Akalin vd., 1997; Anderson ve Gilliland, 1999; Lin ve Chen, 2000; Juskiewicz ve Panfil-Kuncewicz 2003; Ahn vd., 2003). İnsan organizmasında kolesterol sentezi geri beslemeli (feedback) olarak kontrol edilmektedir. Buna ilaveten diyet kolesterolü alımındaki artış endojen kolesterol sentezini % 20 azaltmaktadır. Diyetle alınan kolesterol oranı insan vücudunda, intestinal absorpsiyonun düşük olması, endojen sentezin baskısı, sterol sentezinin artması ve dokularda biriktirilen kolesterolün artmasıyla kontrol edilmektedir. Bu nedenle çoğu insanda diyetle alınan kolesterolün etkisi pek fazla olmadığı belirtilmektedir. Besinlerle yüksek düzeyde kolesterol alımını takiben gönüllülerin yalnızca % 31' inin serum kolesterolünde artış gözlenmiştir. Buradan

çoğu insanın bir kontrol mekanizmasına sahip olduğu ve bu mekanizmanın serum kolesterolünü oldukça sabit bir düzeyde tutabildiği sonucu çıkarılabilir (Demirci vd., 1996).

Kalp hastalıklarının ortaya çıkmasında beslenmenin yanı sıra çok sayıda risk faktörü rol oynamaktadır. Şişmanlık, yüksek kalorili besin tüketimi, yüksek tansiyon, sigara içme, şeker hastalığı, genetik faktörler, vücut aktivitesinin azlığı, immunolojik olaylar, psikolojik durum, yaş, cinsiyet, meslek, stres, aşırı kahve içimi, çevre kirliliği, bazı ilaçlar v.b. gibi bir dizi geniş faktörlerin etkili olabileceği belirtilmektedir.

Bugün pek çok ülkede yapılan araştırmalarda, her yıl koroner kalp hastalıkları nedeniyle meydana gelen ölümlerin, kanserle meydana gelenlerle eşdeğer olduğu görölmüştür. Kalp damar hastalıklarının seyri izlendiğinde, bu hastalarda kan kolesterol seviyelerinin sürekli yüksek olması kolesterol molekülünün sorgulanmasına neden olmuştur. Kalp damar hastalıklarından hayatını kaybedenlerde ve kanda yüksek kolesterol saptanan kişilerde damar tıkanıklığı nedeniyle felçler olduğu gözlenmiştir. Bu gözlemden sonra tıp çevrelerinde kolesterolün kandaki seviyesinin mutlaka düşürülmesi gerektiği ileri sürölmüştür (Urkun, 1998).

Yapılan çalışmalarda kandaki kolesterol seviyesi ile diyetle alınan kolesterol miktarı arasında sıkı bir ilişki olduğu görölmüştür. Bundan sonra kolesterollü gıdalar tüketmeme yönünde bir eğilim başlamıştır. Bu amaçla çeşitli yöntemlerle gıdalardaki kolesterolün azaltılması konusunda çalışmalar yapılmaktadır. Yöntemlerden bazılarının uygulamada yarattıkları olumsuzluklar nedeni ile bu çalışmada biyolojik yolla kolesterol azaltılması üzerinde durulmuştur. Laktik asit bakterilerinin kolesterolü azaltma özellikleri incelenmiştir. İnsan vücudunda kolesterol emiliminin bağırsaklarda gerçekleşmesi nedeniyle özellikle insan gayta ve gastrik biyopsi örneklerinde izole edilen bakteriler seçilmiştir.

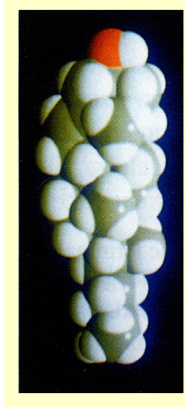
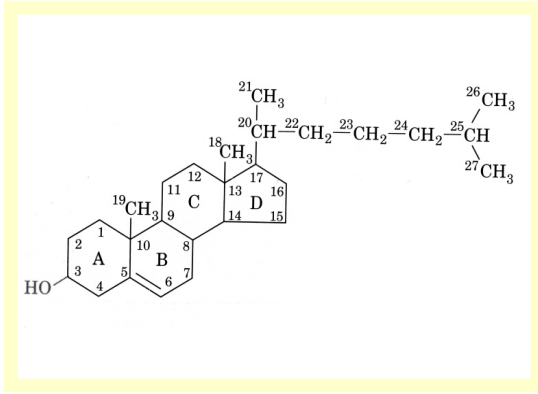
Süt ve fermente süt ürünlerinin kolesterol düşürücü etkilerinin bulunduğu bilinmektedir. Ancak bir süt ürünü olan tereyağının kolesterol içeriği yüksektir. Bu

nedenle hiperkolesterolemisi olan bireylerin diyetlerinden çıkartılmaktadır. Tereyağının yapımı sırasında kolesterolü azaltma özelliği yüksek bakteriler ile muamele edilmesi hem üründeki kolesterolün azaltılmasına hemde tereyağıyla beraber alınan bakterilerin insan bağırsak sisteminde de faaliyet göstererek serum kolesterolünün düşmesincede faydalı olacaktır. Bu nedenle bakterilerin seçilirken asit ve safra dayanıklılıklarıda önemli olmaktadır.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2. 1. Kolesterolün Yapısı

1815 yılında Fransız kimyacı M.E. Chevreul tarafından bulunan kolesterolün yapısının açıklanması ve biyosentez şekillerinin açıklanması günümüze kadar devam etmiştir. 20. yy başladığında kolesterol izole edilmiş ve kısmen tanımlanmıştır. Ancak yapısı hakkında yeterli bilgi elde edilememiştir. Bundan sonraki yüzyılda kolesterolün yapısı açıklanmış, biyosentez yolları bulunmuş ve kolesterol metabolizmasını düzenleyen mekanizma açıklanmıştır (Vance, 2000). Kolesterolün yapısı, karbonları sırayla numaralanmış olan dört adet birleşik halka (alfabenin ilk dört harfi ile gösterilirler) ve D halkasına tutunmuş 8 üyeli dallanmış hidrokarbon zincirinden oluşmuştur. Şekil 2.1.1’de kolesterolün kimyasal yapısı Şekil 2.1.2’ de ise kolesterolün üç boyutlu yapısı görülmektedir. Şekil 2.1.2’ de hidrojenler beyaz, karbonlar gri ve oksijen kırmızı gösterilmiştir (Voet vd., 1995).



Şekil 2.1.1. Kolesterolün Yapısı (Voet vd., 1995) Şekil 2.1.2.Kolesterolün Yapısı

Kolesterolün molekül ağırlığı 386.64 g, kapalı formülü cholest-5-n-3β-ol-C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O, erime noktası 149 °C’dir. Plazma membranları ve miyolin zarları özelliğindeki hücre membranlarında bulunur. Kolesterol bir dereceli doymamış bir değerli aromatik alkoldür. A, B, C, D olmak üzere dört farklı trans izomeri mevcuttur. Beyaz renkli, yağlı yapıda bir kristaldir. Yoğunluğu 1.067 olup, su içermeyen çözeltilerde kristallenir. Sulu çözeltilerde suyun bir kısmını alarak, emülsiyon oluşturur. Su,

asitler ve alkalilerde çözünmez, piridin, kloroform, benzol ve eterde kolayca çözünür. Kromatografik veya renk özelliklerinden yararlanılarak tespit edilebilir. Serbest formda veya yüksek yağ asitleri ile esterleşmiş olarak bulunur. Kolesterol, kozmetik ve ilaç endüstrisinde yüzey koruyucu materyal ve emülgatör olarak kullanılmaktadır (Urkun, 1998; Metin, 1998).

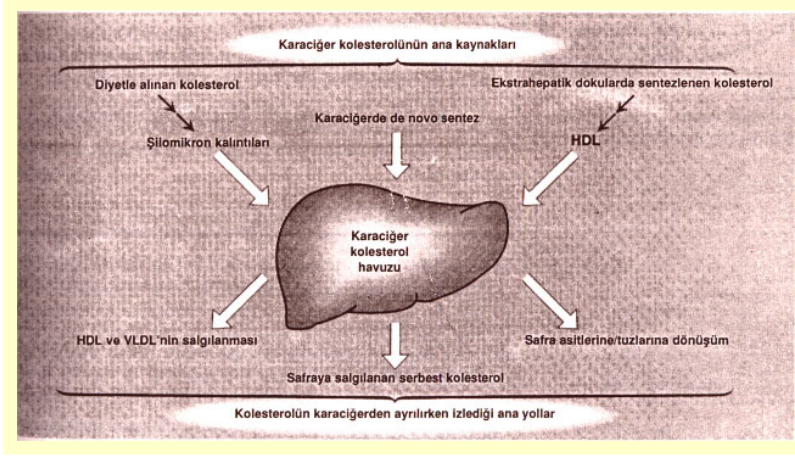
## 2. 2. İnsan Organizmasında Kolesterol

Yağların sabunlaşmayan kısımlarından olan steroller yüksek moleküllü alkoloitlerdir. Doğada hayvansal organizma ve yağlı tohumlarda serbest veya esterleşmiş halde bulunurlar. Hayvanlarda zoosterol, bitkilerde fitosterol adı verilir. Zoosterollerin en önemlisi kolesteroldür ve sütte de doğal olarak bulunur. Kolesterol hayvansal yağlarda serbest ve uzun zincirli yağ asitleri ile esterleşmiş haldedir.

İnsan vücudunda ağırlığın %0.32'si kolesteroldür (Urkun, 1998). Lipoproteinlerin plazmadaki kontrolünün önemli bir faktörü olan kolesterol başlıca iki kaynaktan sağlanır. Bunlardan birincisi diyetle alınan kolesterol (eksojen kolesterol), diğerede öncelikle karaciğerde ince bağırsaklarda üretilen kolesteroldür (endojen kolesterol). Karaciğer, adrenal korteks, deri, ince bağırsak, testis ve aort gibi dokularda kolesterol sentezi yapılabilir (Anar, 1998). Şekil 2. 2' de karaciğer kolesterolünün kaynakları ve kolesterolün karaciğerden ayrılma yolları görülmektedir.

Yiyeceklerle alınan kolesterol miktarı, vücutta sentezlenen miktarın %20'si kadardır. Gıdalarla alınan kolesterol ya serbest halde ya da yağ asitleri ile esterleşmiş haldedir. Esterleşmiş kolesterol ince bağırsak lümeninde pankreatik kolesterol esteraz enzimi tarafından hidroliz edilir, serbest kolesterol ve yağ asitlerine parçalanır. Serbest kolesterol ince bağırsak tarafından emilir. Vücutta sentezlenen kolesterol ile gıda ile alınan kolesterol arasında bir denge vardır. Bu denge organizma tarafından ayarlanır. Eğer gıda ile alınan kolesterol miktarı artarsa vücutta sentezlenen kolesterol miktarı azalır, denge korunur. Hasta kişilerde ise karaciğerin kontrol sistemi bozulmuştur. Kandaki kolesterol seviyesini, sadece diyet değil, aynı zamanda vücutta üretilen kolesterol de etkiler (Metin, 1998). Diyetle alınan doymuş yağlar ve kolesterol kan

kolesterol düzeyinin artmasına neden olur. Ulusal Kolesterol Eğitim Programı vücutta bulunacak kolesterolü şu şekilde sınıflandırmıştır (Çizelge 2.2.)(Kramer, 2002; Öner, 2004).



Şekil 2.2. Karaciğer kolesterolünün kaynakları ve kolesterolün karaciğerden ayrılma yolları (Tokullugil vd., 1997).

Çizelge 2. 2. Vücutta bulunacak kolesterol durumları (Kramer, 2002; Öner, 2004)

160-200 mg/dL Toplam Kolesterol	İstenen miktar
200-239 mg/dL Toplam Kolesterol	Şüpheli, yüksek
240 mg/dL-veya yukarısı Toplam Kolesterol	Yüksek
HDL(High Dansity Lipoprotein) seviyesi	40 mg/dL veya yukarı
LDL(Low Dansity Lipoprtoein) seviyesi	100 mg/dL veya aşağı olmalıdır

### 2. 3. Kolesterolün Kanda Taşınma İşlemi

Kolesterol kanda lipoproteinler vasıtası ile taşınır (Anar, 1998). Şekil 2.3.1.' de lipoproteinlerin genel yapısı görülmektedir (Voet vd., 1995).

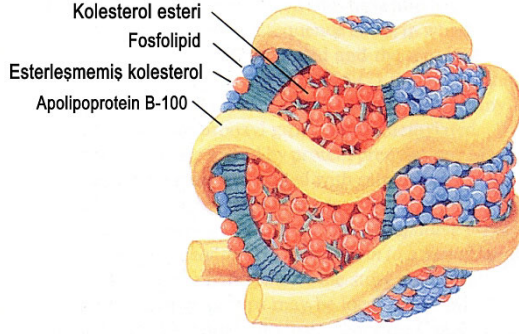
#### 2. 3. 1. Plazma Lipoproteinleri

Plazma lipoproteinleri apolipoproteinler olarak adlandırılan özgün proteinler ve lipidlerin moleküler kompleksleridir. Bu dinamik partiküllerin sentez, yıkım ve plazmadan uzaklaştırılması sabit bir denge durumundadır. Lipoprotein partikülleri şunlardır;

- Şilomikronlar (CM)

- Çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (VLDL)
- Düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL)
- Yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL)

Şekil 2.3.1.'de lipoproteinlerin genel yapısı görülmektedir (Voet vd.,1995).



Şekil 2.3.1. Lipoproteinlerin genel yapısı (Voet vd.,1995)

### 2. 3. 1. 1. Şilomikronlar (CM)

Şilomikronlar bağırsak mukoza hücrelerinde üretilir ve besinsel triasilgliserol, kolesterol ve kolesterol esterlerini (ayrıca bu hücrelerde yapılan ilave lipidleri) periferik dokulara taşırlar.

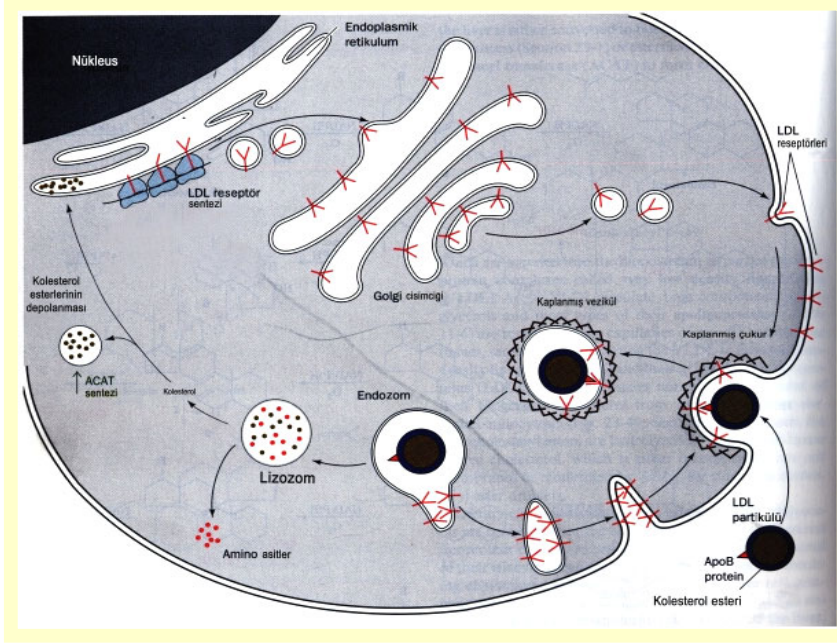
### 2. 3. 1. 2. Çok Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler (VLDL)

VLDL' ler karaciğerde üretilir. Bu lipoproteinler büyük çoğunlukla triasilgliserolden oluşmuştur. Fonksiyonları, bu lipidi karaciğerden periferik dokulara taşımaktır. Yağlı karaciğer, karaciğerin triasilgliserol sentezi ile VLDL salgılanması arasında bir dengesizlik olduğu durumlarda meydana gelir.

### 2. 3. 1. 3. Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler (LDL)

LDL partiküllerinin ana işlevi periferik dokulara kolesterol sağlamaktır. Bunu hem hücre yüzeyine temas ettiklerinde hücrelerin membranları üzerine serbest kolesterolü bırakarak hemde apolipoprotein B- 100' ü tanıyan hücre yüzey membranlarındaki

reseptörlere bağlanarak yaparlar (Tokullugil vd., 1997). LDL partiküllerinin alım ve yıkımının özeti Şekil 2.3.1.3.'de gösterilmiştir (Voet vd., 1995).



Şekil 2.3.1.3. LDL partiküllerinin alım ve yıkımı (Voet vd., 1995)

Şekil 2.3.1.3.'de görüldüğü gibi LDL reseptörleri hücre zarlarındaki çukurlara toplanmış olan negatif yüklü glikoprotein molekülleridir. Çukurun hücre iç tarafı çukurun şeklini koruyan kltrin (bir protein) ile kaplanmıştır. Bağlanmadan sonra LDL, endositoz yoluyla bozulmamış partiküller olarak hücre içine alınır. LDL içeren vezikül hızla kltrin kaplamasını kaybeder ve diğer benzer veziküllerle birleşir. Böylece, endozom olarak adlandırılan daha büyük veziküller oluşur. Endozom içeriğinin pH' sı düşer (endozomal ATPaz' ın proton pompalama aktivitesi). Bu durum LDL' in reseptöründen ayrılmasına olanak sağlar. Reseptörler daha sonra endozomun bir kenarına geçerler, oysa LDL' ler vezikülün lümeni içinde serbest kalırlar.

Reseptörler yeniden kullanıma girerler, oysa veziküldeki lipoproteinler lizozomal (hidrolitik) enzimler tarafından parçalanırlar. Bu parçalanma sonucu kolesterol, amino asitler, yağ asitleri ve fosfolipid açığa çıkar.



### **2. 3. 1. 4. Yüksek Yoğunluklu Lipoproteinler (HDL)**

Kan kolesterolünün yaklaşık üçte biri yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ile taşınır. Araştırmacıların bir kısmı HDL' nin kolesterolü arterlerden uzaklaştırıp karaciğere taşıdığını, bir kısmı da HDL'nin aşırı kolesterolü aterosklerotik plaklardan uzaklaştırdığını ve böylece plak oluşumunu engellediğini ileri sürmektedir. Bu nedenle HDL "iyi kolesterol" olarak bilinir (Anar, 1998).

### **2. 4. Diyetle Alınan Kolesterolün Vücut Üzerindeki Etkisi**

İnsan bağırsak sisteminde kolesterolün tamamen absorpsiyonu mümkün değildir. Absorpsiyon oranı diyetle alınan toplam kolesterol miktarı ve daha birçok faktöre bağlıdır. Yapılan çalışmalar diyet kolesterolü alımındaki artışın, plazma lipitleri üzerine önemli bir etkisinin bulunmadığı sonucunu ortaya çıkarmıştır. Ancak buna karşı görüşlerde bulunmaktadır. Örneğin; diyet kolesterolünün plazma kolesterolü seviyesindeki artışta diğer faktörlere ilaveten esas faktör olduğu öne sürülmektedir. Ayrıca bu faktörlerden besinlerle alınan yağın tipi yani doymuş ya da doymamış yağ asitleri içermesi önemlidir. Ancak bu, yağın kolesterol absorpsiyonunu önemli ölçüde etkilemez. Yapılan farklı çalışmalarda kolesterol alımının sınırlandırılmasının gereksiz olduğu, yalnızca hiperkolesterolemiye hassas kişilerin diyetlerine dikkat etmelerinin gereği vurgulanmıştır.

Koroner kalp hastalıklarının nedenleri arasında lipit hipotezi kabul edilmiştir. Ancak diyet kolesterolü alımının azaltılmasının plazma kolesterolünü düşürmeye ve böylece koroner kalp yetmezliği riskini azaltmaya önemli bir etkisinin bulunup bulunmadığı yönünde tartışmalar mevcuttur (Demirci vd., 1996).

### **2. 5. Kan Kolesterolü ve Kalp Damar Hastalıkları**

Yüksek kan kolesterol düzeyine sahip olan kişiler, yüksek atheroskleroz riski taşırlar. Atheroskleroz, orta ve büyük arterlerin iç yüzeylerinde kolesterol ve kolesterol esterlerinin ve hücre yıkım ürünlerinin biriktiği kronik bir hastalıktır. Hastalık ilerledikçe bu birikintiler, koroner arter hastalığına yol açacak şekilde kan

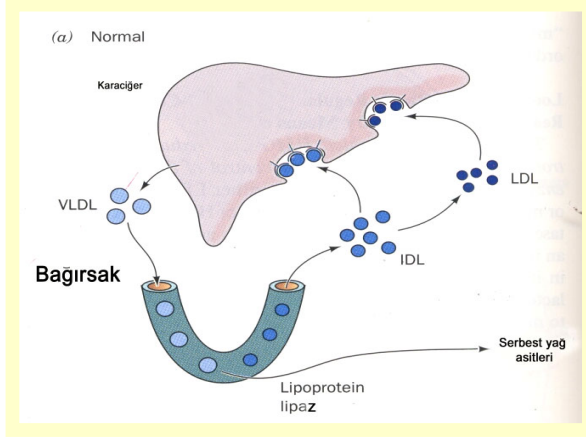
akımını azaltır ve hatta durdurur. Etkilenen arter tarafından kanlanması sağlanan hücreler oksijen ve besinlerden mahrum kalır ve hızla ölürlür. Kan akımındaki bu kesilme kalbin arterlerinden birinde olursa kalp krizi gelişir. Sonuçta, kalp kasının bir kısmı iş göremez olur ve ölümlerle sonuçlanabilir.

Kandaki toplam plazma kolesterolünün azalması kalp hastalıkları riskini azalttığı, A.B.D Lipit Research Clinic programında belirtilmiştir (Gilliland vd., 1985). Amerika'da her yıl 65 milyon kişide kalp ve damar hastalıkları tespit edilmekle ve bir milyon kişi bu hastalıktan hayatını kaybetmektedir (Mc Namara, 1991).

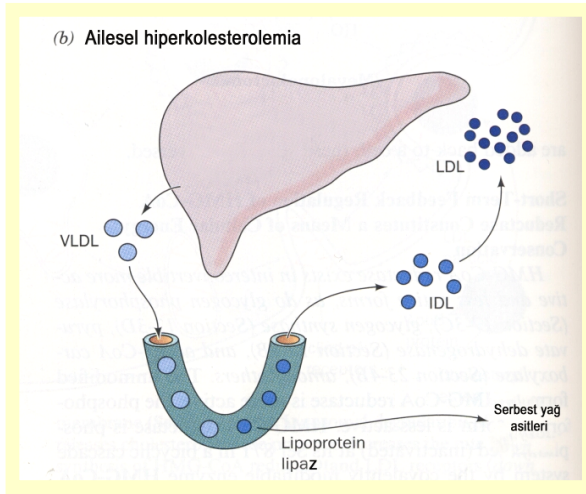
Kalp damar hastalığından ölüm sıklığı ve plazma kolesterol konsantrasyonu arasında sıkı bir ilişki vardır. Yüksek total plazma kolesterol düzeyi ile koroner arter hastalığı arasında bir korelasyon vardır, ancak kan LDL-kolesterol düzeyi ile kalp hastalığı arasında daha güçlü bir ilişki söz konusudur. Kan kolesterolünün yaklaşık olarak % 80' i LDL' de taşınır. Bunun aksine, yüksek HDL-kolesterol düzeyleri, kalp hastalığı riskini azaltır. Şişman ve hareketsiz kişiler daha yüksek LDL düzeylerine sahip olmaya meyilliyken, atletikler daha yüksek HDL düzeylerine sahiptirler. Genellikle menopoz öncesi kadınlar erkeklere göre daha yüksek HDL düzeylerine sahiptirler. Bu durum kısmen kadınlarda kalp hastalığı riskinin daha düşük olmasına sebep olur (Tokullugil vd., 1997). LDL' nin aşırı üretiminin ve / veya kullanımının sonucu olan yüksek kan kolesterolü yani hiperkolesterolemiye iki metabolik düzensizliğin neden olduğu bilinmektedir. Bunlardan birincisi kalıtsal faktörler ailesel hiperkolesterolemi, ikincisi ise yüksek kolesterol içeren diyet tüketimidir.

Ailesel hiperkolesterolemiye, fonksiyonel LDL reseptörlerinin eksikliğinin baskın olduğu bir genetik kusurdur. Şekil 2.5.1., Şekil 2.5.2. ve Şekil 2.5.3.' de LDL reseptörlerinin durumu görülmektedir (Voet vd., 1995). Karaciğer LDL reseptörleri plazma LDL' sinin üretimini ve alımını kontrol ederler.

Normal insanda VLDL karaciğerde saklanır ve kılcal damarların periferik dokularında IDL'ye dönüştürülür. Plazma IDL partiküllerinin yarısına yakını LDL reseptörlerine bağlanır ve karaciğer tarafından alınır. Kalan kısmı periferik dokularda LDL'ye dönüşür (Şekil 2.5.1)



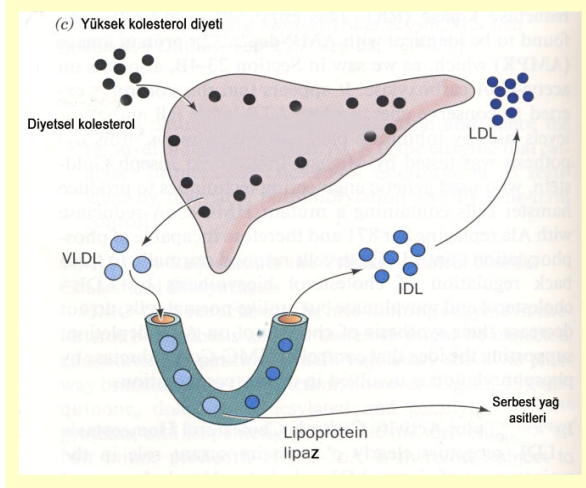
Şekil 2.5.1. Normal insan karaciğerinde LDL reseptörlerinin durumu



Şekil 2.5.2 Bireysel ve aileden gelen hiperkolesterolemi' de karaciğer LDL reseptörleri

Bireysel ve aileden gelen hiperkolesterolemi' de karaciğer LDL reseptörleri genetik kusur nedeniyle zayıflar ya da bulunmaz (Şekil 2.5.2).

Yüksek kolesterol içeren diyetle beslenen bireylerde, karaciğer kolesterolle dolar ve bu durumda LDL reseptörlerinin üretimini baskı altında tutar. Genetik veya diyet nedeniyle oluşan reseptör eksikliği plazma LDL seviyesini, LDL üretiminin artması ve LDL alımının azalması nedeniyle artırır (Şekil 2.5.3) (Voet vd., 1995).



Şekil 2.5.3 Yüksek kolesterol içeren diyetle beslenen bireylerde LDL reseptörlerinin durumu

## 2. 6. Fermente veya Fermente Olmamış Süt Mamüllerinin Kolesterol Konsantrasyonuna Etkisi

Yüksek kolesterolü kişilere önerilen doymuş yağ asitleri ve kolesterol oranı düşük diyet uygulamasının serum kolesterol düzeyini ancak % 3, 0 – 7, 4 arasında düşürdüğü belirlenmiştir. Bu düşük etkinliğin nedenlerinden biri vücutta önemli miktarda kolesterol üretilmesi ve diyetten gelen eksikliğin vücut tarafından karşılanmasıdır. Bugün için kolesterol tedavisinin standart araçları lipit oranını düşüren ilaçlardır. Ancak hastanın geri kalan yaşamında birtakım yan etkileri olan bu ilaçlara bağlı kalması rahatsız edici bir duygudur. Bu yüzden yüksek kolesterolün tedavisinde bireyin yeme alışkanlıklarında önemli bir değişiklik gerektirmeyen etkili bir gıda maddesinin daha uygun hatta ideal olduğu düşünülmektedir (Gönç vd.,

1996). Bugün için diyetle yer alan bazı süt ve fermente süt mamullerinin kolesterolü düşürmede büyük yarar sağladığı kabul edilmektedir. Değişik fermente süt mamullerinin kolesterol konusunda farklı etki gösterdiği ve bunun üretimlerinde kullanılan bakteri suşlarından kaynaklandığı ileri sürülmüştür (St-Onge vd., 2000 ).

### **2. 6. 1. Süt Tüketiminin Kolesterol Düşürücü Etkisi**

1970' li yıllardan bu yana insanlar ve deneysel hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalarda süt, yağsız süt ve çeşitli süt mamullerinin kolesterolü düşürücü yönde bir etki gösterdiği belirlenmiştir (Gönç vd, 1996). Sütün kolesterol konsantrasyonu üzerine etkisi Afrika' daki Maasai yerlileri üzerinde incelenmiştir. Araştırma süresince burada yaşayan insanlar hayvansal ürünü kan ve süt ile beraber tüketmişlerdir. Araştırmaya başladıktan 4 hafta sonra gruplarda toplam kolesterol konsantrasyonunun belirgin bir şekilde düştüğü görülmüştür. Böylece sütün içindeki bir faktörün kolesterol konsantrasyonunu düşürdüğü fazla miktarda süt tüketimi ile de kolesterol konsantrasyonunun daha yüksek oranda azaldığı sonucuna varılmıştır. Süt kolesterol sentezinin bir inhibitörü olarak kabul edilmiştir (St-Onge vd., 2000 ).

Steinmetz vd. Amerikan Kalp Merkezi tavsiyeleri ile bireylere uygun gelen diyetlere göre süt ile yağsız süt etkisini mukayese etmişlerdir. Her birey günde 660 ml sütü 6 hafta boyunca tüketmişlerdir. Deneme 10–16 hafta kadar sürmüştür. Yeteri kadar kan örneği 3. ve 6. haftalarda alınmış toplam kolesterol, LDL, HDL kolesterol ve triasilgliserol konsantrasyonlarına bakılmıştır. Süt ile yağsız süt mukayese edildiğinde 6 hafta boyunca yağsız süt tüketenlerin toplam kolesterolünde önemli bir azalma görülmüştür. Her iki diyetle daha düşük HDL kolesterolü oluşturmuştur (St-Onge vd., 2000 ).

Golay vd., (1990) tarafından 11 erkeğin toplam kolesterol konsantrasyonu 7, 01 mmol / L olarak temel alınmış, standart yağsız süt ile bağımsızlık kazanmış ineklerden elde edilen yağsız süt karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada toplam kolesterol ve LDL kolesterol konsantrasyonlarında bağımsızlığı olan ineklerden elde edilen yağsız süt 0, 3 – 0, 5 L / g oranında 8 hafta kontrol altında bir beslenme ile beraber tüketildiğinde

belirgin bir azalma olduğu görülmüştür. Sharpe vd. 30 birey üzerinde, 5 periyotta, 38 hafta süresince bir çalışma yapmışlardır. Bireylere, çalışmanın sonuna kadar uygun bir diyetle beslenmeleri ve birbirlerine uygun yağ almaları gerektiği belirtilmiştir. Sonuçlar bağıışıklığı arttırılmış ineklerden elde edilen sütün, normal yağsız süte göre toplam kolesterol ve LDL kolesterolündeki belirgin azalmanın sorumlusu olduğunu göstermiştir. Bu durum bağıışıklık kazanmış ineklerden elde edilen sütün tüketiminin kolesterol konsantrasyonuna etkisinin, safra asitlerini arttıran ve kolesterol salgılayan gastrointestinal değişikliklerden kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır. Safra asitleri döngüsündeki bir azalma, mutlaka plazma kolesterol konsantrasyonunu düşürecek, çünkü kolesterol, safra asitleri sentezinde kullanılmaktadır. Bütün çalışmalarda farklı araçların kolesterol düşürücü etkilere neden olduğu söylenmiş fakat sütün magnezyum, riboflavin, orotik asit, IgG, bilinmeyen inhibitör faktörler veya gastrointestinal flora gibi hangi bileşenlerin bu hipokolesterolemik etkinin sebebi olduğu belirtilmemiştir (St-Onge vd., 2000 ).

## **2. 6. 2. Fermente Süt Ürünlerinin Kolesterol Konsantrasyonu Üzerine Etkisinin Hayvanlar Üzerinde Yapılan Çalışmalarla İncelenmesi**

Sharpe vd. (1994) bağıışıklık kazanmış ineklerden elde edilen sütün gastrointestinal florada hareket ederken gösterdikleri etkiyi incelemişlerdir. Gastrointestinal floranın kolesterol konsantrasyonunun dağılımını etkilemesi durumunda plazma kolesterol konsantrasyonunda oluşan değişikliklerde fermente süt ürünlerinin tüketilmesinin önemine dikkat çekmişlerdir.

Birçok araştırmacı, pastörize sütün, yoğurdun ve diğfer fermente sütlerin kolesterol konsantrasyonuna etkisini hayvan deneyleri ile karşılaştırmışlardır. Beena ve Prasad (1997) tarafından yapılmış çalışmada, standart yoğurt ile bifiduslu yoğurdun farelerde serum kolesterol konsantrasyonuna etkisi incelenmiştir. Farelere verilen yoğurtlar, yağsız süttozu, kondense peynir altı suyu veya hidrolize olmuş laktoz içeren kondense peynir altı suyu ile zenginleştirilmişlerdir. Fareler 30 gün boyunca kolesterolce yüksek diyetle birlikte yoğurt ile beslenmişlerdir. Bütün yoğurtlar belirgin şekilde toplam kolesterolü düşürmüş, ancak bu durum hidrolize olmuş laktoz

içeren, kondense peynir altı suyu ile takviye edilmiş yoğurtlarda daha etkili olmuştur. Bifiduslu yoğurt ve yağsız süt tozu ile beslenen grupta HDL kolesterol konsantrasyonlarında artış görülmüştür. Bifiduslu yoğurtla beslenen bütün gruplarda, LDL kolesterol konsantrasyonu verilen tam yağlı süte göre, %21-27 oranında daha düşük olduğu tesbit edilmiştir.

Başka bir çalışmada fareler su, yağsız süt ya da *S. thermophilus* bakterisi inokule edilmiş süt ile 29 gün boyunca beslenmişlerdir. Plazma kolesterol konsantrasyonu termofiluslu grupta su ya da yağsız süt verilen gruba göre belirgin bir şekilde düşük bulunmuştur. Yağsız sütün plazma kolesterol konsantrasyonuna etkisi bulunmamaktadır. Ancak *S. thermophilus*'un fermantasyonu sırasında üretilen oratat metabolitlerinin hipokolesterolemiye sebep olduğunu açıklanmıştır (St-Onge vd., 2000 ).

Laktik asit bakterilerinin hipokolesterolemik özelliklerini belirlemek için çalışmalar yapılmıştır. Nakajima vd. (1992) vizkozite yapan laktakoklarla üretilen (ropy) fermente sütün etkisini farelere yüksek kolesterollü diyet vererek serum kolesterol konsantrasyonlarını araştırmışlardır. Yağsız süt % 5' lik viskozite yapan ya da yapmayan *L. lactis* subsp. *cremoris* suşlarından biriyle inokule edilmiş, kontrol olarak laktik asitle pH 4.7'ye ayarlanmış süt kullanılmıştır. Fareler % 10 oranında viskozite yapan ve yapmayan *L. cremoris* ile fermente olmuş süt yada asitli süt ile 7 gün boyunca yüksek kolesterol içeren diyetle beslenmişlerdir. Bu süre sonunda toplam kolesterol konsantrasyonu belirgin bir şekilde düşük bulunurken, HDL kolesterolünün toplam kolesterole oranı viskozite yapan fermente sütte asitlendirilmiş gruba göre daha yüksek bulunmuştur. Ancak HDL kolesterol ve triasilgliserol konsantrasyonları gruplar arasında belirgin bir fark tesbit edilmemiştir (St-Onge vd., 2000 ).

Çeşitli hayvan denemelerinde fermente süt ürünlerinin kolesterol düşürücü etkileri olduğu görülmüştür. Sonuçların çoğu hipokolesterolemik durumdan bakterilerin sorumlu olabileceğini göstermiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda da tek bir

bakteri çeşidine göre birkaç bakteri kombinasyonunun kullanılmasının kolesterol mekanizmasına daha büyük etkisi olduğu belirtilmiştir (St-Onge vd., 2000).

## 2. 7. Gıdalardaki Kolesterolün Azaltılması

Diyet kolesterolünün hiperkolesterolemiye yol açabildiğinin ve koroner kalp yetmezliği riskini arttırdığının anlaşılması, bazı gıdaların tüketilmesini engellemiş ve tüketicilerin düşük kolesterollü ve kolesterolü azaltılmış gıdalara yönelmelerine neden olmuştur. Kolesterol esas olarak hayvansal gıdalarda, özellikle plazma membranlarında, lipoproteinlerde ve yağlarda yer alan bir maddedir. En fazla kolesterol ise, yumurta, beyin, kemik iliği, böbrek, karaciğer ve tereyağında bulunmaktadır (Çizelge 2.7).

Çizelge 2.7. Bazı gıdaların kolesterol içerikleri ( Demirci vd., 1996 )

GIDA	TÜRÜ	Yağ Oranı (g / 100 g )	Kolesterol Oranı (mg / 100 g)
Anne Sütü		4.0	25
İnek Sütü		3.8	12.3
Yağsız Süt		0.1	3
Krema		31.7	109
Yoğurt		3.8	12.2
Peynir	Brie	27.9	100
	Camambert	22.3	62
	Çedar	32.3	100
	Mavi Peynir	29.8	88
	Emmental	29.7	92
	Taze Peynir	31.5	103
	Gouda	29.2	114
	Parmesan	25.8	68
	Kuark	5.1	17
Yumurta	Bütün	14.4	396
	Sarı	31.9	1260
Tereyağı		83.2	240
Don yağı		96.5	100
Domuz yağı		99.7	86
Dana yağı	Yalnız kas	0.8	70
	Karaciğer	4.1	360
	Böbrek	6.4	380
Sığır Eti	Yalnız kas	1.9	60
Domuz Eti	Yalnız kas	1.9	65
	Karaciğer	5.7	340



Gıdalarda bulunan kolesterolün azaltılmasında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.

- 1- Biyolojik yolla kolesterolün azaltılması
- 2- Kimyasal yolla kolesterolün azaltılması
  - 2.1. Katı - Sıvı Ekstraksiyonu
  - 2.2. Kompleks oluşturma
3. Fiziksel Yolla Kolesterolün Azaltılması
  - 3.1. Distilasyon ve Kristalizasyon
  - 3.2. Süperkritik Sıvı Ekstraksiyonu

### **2. 7. 1. Biyolojik Yolla Kolesterolün Azaltılması**

Gıdalardaki kolesterolün biyolojik yolla azaltılmasında, enzim ve mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Doğada *Nocardia* ve *Rhodococcus* gibi kolesterolü parçalayan çok sayıda bakteri türü mevcuttur. Bu ve benzeri bakteriler, kolesterolü enzimleri aracılığı ile modifiye etmektedirler. Bu enzimlerin başlıcaları kolesterol oksidaz ve redüktazlardır. Hücre membranına bağlı olarak bulunan kolesterol oksidazlar, *Nocardia erythropolis*, *Nocardia rhodochrous*, *Rhodococcus equi* ve *Streptomyces* türlerinden izole edilmiştir. Kolesterolü parçalayan diğer bakteriler, *Str. violascens*, *Brevibacterium sterolicum*, *Streptoverticillum cholsterolicum* ve *Rhodococcus equi*'dir.

Bakterilerin gıdalardaki kolesterolü indirmek için kullanılmaları bazı problemleri de beraberinde getirmiştir. İlk olarak akla tüketicilerin bakterilerin kullanılmasını şüphe ile karşılayabilecekleri gelmektedir. Ayrıca *Rhodococcus equi* gibi bazı türlerin önemli patojen olduğu tespit edilmiştir. Bu durumda ise kolesterol redüktaz enzimi genlerinin tanımlanarak, peynir üretiminde starter kültür olarak kullanılan laktik asit bakterilerine transfer edilmesi önerilmektedir. Diğer bir problem ise, biyokonversiyon sonucu zararlı kolesterol yan ürünlerinin ortaya çıkmasıdır. Kolesterolün oksitlenmesi ise daha önemli bir problemi oluşturmaktadır. Çünkü okside olmuş kolesterol toksik bir özellik göstermektedir (Demirci vd., 1996 ).

Juskiewicz ve Panfil-Kuncewicz (2003) %4 ve %8 yağlı sütlere yoğurt ve yoğurt benzeri ürünlerde starter olarak kullanılan termofilik bakterileri inoküle etmiş ve bu bakterilerin sütteki kolesterolü azaltma özelliklerini incelemişlerdir. Farklı kültür kombinasyonlarının kullanıldığı bu çalışmada *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus* ve *Lactobacillus delbruecki* spp. *bulgaricus* içeren %4 yağlı sütlerde %22.2 oranında kolesterolde azalma gözlenmiştir.

## **2. 7. 2. Kimyasal Yolla Kolesterolün Azaltılması**

### **2. 7. 2. 1. Katı - Sıvı Ekstraksiyonu**

Kolesterol sıvı gıdalardan aktif kömür, gözenekli cam, seramik, plastik silikagel gibi absorbentler ile ekstraksiyon yoluyla uzaklaştırılabilmektedir. Tereyağı üzerinde yapılan çalışmalarda tereyağı 70-90 °C'ye eritildikten sonra tanelenmiş veya püskürtülmüş karbon (yaklaşık olarak ağırlıkça 5:1 yağ:adsorband oranı) veya aktif karbon (8:1 adsorbanda yağın ağırlıkça oranı) ilave edilir. Sıvı yağ, adsorbandla dolu bir kolon içerisinden geçirilmek suretiyle bir süre adsorband ile temas ettirilir. Renk ve aroma maddelerinin yanı sıra kolesterol karbon partiküllerine bağlanarak sütten ayrılır. Saf karbon materyallerinin yerine plastik, seramik veya cam poruslara bağlanmış olanlar da kullanılabilir. İşlemden sonra aroma maddeleri ve  $\beta$ -karoten tereyağının aromasını ve rengini tekrar oluşturmak için kolesterolü %90'dan fazlası ayrılmış tereyağına katkı maddesi olarak katılır. Hoche firması bu yöntem ile elde edilen kolesterolü azaltılmış tereyağını piyasaya sürmüştür. Bu tereyağının adı hala tartışılmaktadır. Fakat yasal olarak diyet tereyağı adı altında satılmaktadır (Urkun, 1998).

### **2. 7. 2. 2. Kompleks Oluşturma**

Sütten kolesterolü ekstrakte etmek için Avustralya Sütçülük Enstitüsünde geliştirilen ve SIDOAK adı verilen metot diğer yöntemlerden daha ucuz ve etkindir. Yalnızca geleneksel sütçülük ekipmanları yeterlidir. Bu yöntem kolesterolle karşı fiziksel çekiciliği olan  $\beta$ -siklodekstrin (  $\beta$ -SD ) ile kolesterolün ekstrakte edilmesi üzerine

dayandırılmıştır.  $\beta$ -SD kolesterol ile çözünmez bir yapı oluşturur. Bu kompleks santrifügasyon veya filtrasyon işlemi ile uzaklaştırılabilir. Bu şekilde elde edilen kolesterolü azaltılmış sütten üretilen tereyağı ve peynir geleneksel yöntem ile yapılanlardan ayırt edilemez. Bu yöntem ile sütün kolesterolünden başka esansiyel yağ asitleri, yağda çözünen vitaminler gibi diğer bileşenleri uzaklaştırılmaz. Ayrıca bu yöntem ile mikrobiyel kontaminasyon da minimum düzeydedir. (Oakenfull vd., 1991; Seçkin ve Metin, 2003) .

Vollbrecht  $\beta$ -siklodekstrinin kolesterol için yüksek seçiciliğe sahip olduğu, yumurta sarısından kolesterolün uzaklaştırılması çalışmalarında işaret etmiştir.  $\beta$ -siklodekstrin, (  $\beta$ -SD ) toksik olmaması, yenebilme niteliği, higroskopik olmaması, kimyasal stabilitesi ve kolay ayrılması gibi avantajlara sahiptir. Böylece gıdalardan kolesterolün uzaklaştırılmasında uygun özelliğe sahiptir (Yen vd., 2000). Ayrıca  $\beta$ -SD' nin kolesterol ile stabil bir kompleks yaptığı (cholest-5-ene-3-  $\beta$ -ol) ve bu kompleksin suda az çözüldüğü bilinmektedir (Manohar vd., 1998)

### **2. 7. 3. Fiziksel Yolla Kolesterolün Azaltılması**

#### **2. 7. 3. 1. Distilasyon ve Kristalizasyon**

Kolesterolün buharda çözünebilir olması nedeni ile yağın buharla muamelesi kolesterolün büyük bir kısmını uzaklaştırabilmektedir. Bu işlemle balık yağı ve susuz tereyağının kolesterolü % 95 azaltılabilmektedir. Bu amaçla uygulanan işlemlerden distilasyon (short path distilasyon ) ve kristalizasyon (melt crytalization) işlemlerinde yağ fraksiyonlarına ayrılmaktadır. Kristalizasyon işleminde yağ, sıvılaştırılmış fazdan farklı bileşenleri ayırmak için değişik sıcaklık derecelerine soğutularak kristalize edilir. Süt yağı, farklı fiziksel özelliklere (erime noktası gibi ) sahip çeşitli trigliseritlerin bir karışımı olduğu için farklı kimyasal kompozisyonlara sahip fraksiyonlara ve farklı kolesterol düzeylerine ayrılması mümkündür (Demirci vd., 1996).

### 2. 7. 3. 2. Süperkritik Sıvı Ekstraksiyonu

Gıda endüstrisinde son zamanlarda kullanılan bir teknik olup yoğunluğu yüksek, viskozitesi düşük yüksek sıcaklık ve yüksek basınç altında yüzey gerilimi azaltılmış bir gazla (genellikle karbondioksit ) , gıdayı muamele etme işlemidir (Demirci vd., 1996).

Maddenin katı, sıvı ve gaz halinde bulunduğu bilinmektedir. Ancak gazlar kritik sıcaklıkların üstünde ısıtılır ve basınç uygulanırsa “süperkritik faz” adı verilen 4. bir faza geçerler. Bir maddenin kritik sıcaklığı (  $T_c$  ), o sıcaklığın üstünde ne kadar basınç uygulanırsa uygulansın sıvılaştırılmayacağı sıcaklıktır. Bu sıcaklıktaki basınçta kritik basınçtır (  $P_c$  ).  $P_c$ - $T_c$ ' nin üstündeki bölgede bulunan süperkritik akışkanların sıvı- gaz arası özellikleri vardır. Sıvıya benzer yoğunlukları ve bir sıvı çözücü gibi fonksiyonları vardır. Bu akışkanların en önemli özellikleri basınç ve sıcaklık ile değişen yoğunluklarıdır. Bir P basıncında sıcaklık artarsa veya bir T sıcaklığında basınç düşerse yoğunluk azalır. Bu özelliği ile ilgili olarak sıcaklık ve yoğunluk değiştirilerek fraksiyonlama yapmak mümkün olmaktadır (Pekyardımcı, 1991).

Süperkritik sıvı ekstraksiyonu uygulamalarında  $CO_2$ , pahalı olmaması, suya yakın derecede bol bulunabilmesi, toksik olmaması, yanıcı ve korozif olmaması ve düşük kritik sıcaklığı nedeni ile tercih edilmektedir (Bradley, 1989).

Süperkritik  $CO_2$  uygulaması ile tereyağındaki kolesterol seviyesi % 90 oranında azaltılmaktadır (Smith, 1993 ).

Mohamed vd. (2000) tereyağından kolesterolün azaltılması için süperkritik etan ekstraksiyonu kullanmışlar ve tereyağının süperkritik etanda süperkritik  $CO_2$ 'ye göre daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Bu çözünürlüğün yüksek olması daha az çözücü kullanılmasına olanak sağlayabilmektedir.

## 2. 8. Laktik Asit Bakterileri ile Serum Kolesterol Düzeyinin Düşürülmesi

Bazı laktik asit bakterileri gelişmeleri sırasında kolesterolü ince bağırsaklarda tutma yeteneğine sahiptir. İnce bağırsak, insanlarda serum kolesterol konsantrasyonunun kontrolünde potansiyel bir yardım sağlamaktadır, çünkü ince bağırsak kolesterol absorpsiyonunun yapıldığı ilk yerdir (Noh vd., 1997 ).

Laktik asit bakterilerinden *L. acidophilus* cinsi genellikle yoğurt gibi fermente sütlerde ve asidofiluslu sütlerde probiyotik olarak sağlık açısından yararlı etkileri bulunması nedeniyle kullanılmaktadır (Usman vd., 1999 ). *L. acidophilus* içeren süt ürünlerinin tüketilmesi insan ve hayvanlarda serum kolesterol konsantrasyonunun kontrolüne yardım etmektedir (Buck vd., 1994 ). Günlük alınan besinde bulunan kolesterolü ince bağırsakta vücuda emilimi gerçekleşmeden bağlanması bakteriyel hücreler tarafından gerçekleştirilmektedir (Usman vd., 1999).

Yapılan çalışmalarda safra ve kolesterol içeren besiyerinde geliştirilen *L. acidophilus*'un bazı suşlarının anaerobik ortamda kolesterolü indirgediği görülmüştür (Gilliland vd., 1985, Buck vd., 1994 ). Kolesterolü asimile etme yeteneği bakterilerde farklılıklar göstermektedir. Laboratuvar koşullarında gelişme sırasında kolesterolü asimile edemeyen bir bakteri, domuzlarda yüksek kolesterol diyeti ile beslenmede serum kolesterolü üzerine etki etmemektedir (Noh vd., 1997 ).

Hosono ve Tono-oka (1995) fermente süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin kolesterolü azaltma özelliklerini incelemişlerdir. Araştırmada *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Leuconoctoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* türlerine ait suşlar kullanılmış ve bunlar arasında *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* R-43 suşunun %33.91 oranında kolesterolü bağladığı belirtilmiştir.

Pereira ve Gibson. (2002) 11 ticari probiyotik ve insan kaynaklı 9 farklı laktik asit bakterisi ve bifidobakterin kolesterolü asimile etme özelliklerini karşılaştırmışlardır. Öncelikli olarak insan mide ve bağırsak sistemine dayanıklılıklarını belirlemek

amacıyla asit ve safra toleranslarına bakılmış daha sonra kolesterolü asimile etme özellikleri incelenmiştir. Sonuçlarda *Lactobacillus casei* Shirota da daha belirgin olmakla beraber %0.4 safrada daha iyi asimilasyon gözlenmiştir. İnsan fecesinden izole edilen *Lactobacillus brevis* NR1C1684 ve *Enterococcus faecalis* 'in her iki safra oranında da diğerlerine oranla 1.5 kat daha fazla kolesterolü asimile ettiği belirlenmiştir. Benzer çalışmalar insan kaynaklı *Lactobacillus casei* türleri için de yapılmıştır. Bakterilerin safra tuzu dekonjugasyonları ve besiyerindeki kolesterolü uzaklaştırma özellikleri incelenmiştir (Brashears vd., 1999).

Usman ve Hosono (1999) 28 *Lactobacillus gasseri*'nin safra toleransı, sodyum taurokolat dekonjugasyonu ve kolesterolü bağlama özelliklerini incelemiştir. Sodyum taurokolat insan ince bağırsak sisteminde bulunan bir safra tuzudur. Çalışmada *Lactobacillus gasseri* türlerinin kolesterolü bağlama özelliğinin bulunduğu fakat suş düzeyinde oransal farklılıklar olduğunu belirtmişlerdir.

Grill vd. (2000) *Lactobacillus amylovorus* ve *Bifidobacterium breve*'in kolesterole etkisini incelemiştir. Safra tuzu içermeyen ortamda her iki bakteri de kolesterolü asimile edememişken taurokolik asit içeren ortamda sırasıyla %81 ve %69 oranında asimilasyon meydana gelmiştir. Ayrıca safra içeren ortamda ise bu oranlar sırasıyla %77 ile %68'dir. Bu sonuçlar kolesterol asimilasyonu için ortamda safra bulunması gerektiğini göstermektedir. Benzer çalışmalar laktobasillerin yanı sıra laktokoklar üzerinde de yapılmıştır. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* N7'nin %97.3 oranında kolesterolü azalttığı belirlenmiştir. İnsan mide-bağırsak sistemindeki şartlara dayanıklı laktokokların fermente süt ürünlerinde ve peynir yapımında starter olarak kullanılması yeni probiyotik gıdaların geliştirilmesine olanak sağlamaktadır (Kimoto vd., 2002).

Taranto vd. (1998) İsviçre Albino farelerini yüksek kolesterol içeren diyetle besleyerek hiperkolesterolemi oluşturup daha sonra içme sularına *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 (günde  $10^4$  hücre) verilen farelerde 7 gün sonra toplam kolesterol oranlarında belirgin bir düşüş olduğunu gözlemlemiştir.

Kolesterolün sıvı besiyeri içerisinde asimile edilmesini inceleyen çalışmaların çoğunda ortam koşulları insan bağırsak sisteminin koşullarına uygun olacak şekilde oluşturulmaktadır. Bu amaçla Man Rogasa Sharp (MRS) sıvı besiyerine safra tuzu ilave edilmekte, 37 °C'de anaerobik şartlarda inkübasyon gerçekleştirilmektedir (Brashears vd., 1998; Usman vd., 1999; Kimoto vd., 2002).

Bir çok araştırmacı laktik asit bakterilerinin hipokolesterolemik hareket mekanizmalarını açıklamayı denemiştir (Gilliland vd., 1985; Buck vd., 1994; Pigeon vd., 2002). Mikroorganizmaların besiyeri içerisinde kolesterolü uzaklaştırma mekanizmaları çok açık değildir.

De Smet vd. yaptıkları çalışmada serum kolesterol seviyesinin düşmesinde laktobasillerin safra tuzu hidrolaz aktivitelerinin rol oynayabileceğini önermişlerdir (Ahn ve Kwak 1999; Ahn, 2003).

Safra tuzu hidrolazı genellikle *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bacteroides* ve *Bifidobacterium* bakterilerinin bağırsak kökenli suşlarında bulunan hücre içi bir enzimdir (Corzo vd., 1999). Safra tuzu hidrolazı konjuge safra asitlerini hidrolize ederek serbest amino asit (taurin ya da glisin) ve konjuge olmamış safra asiti molekülüne katalizler (Bateup vd., 1995; Tanaka vd., 1999; Corzo vd., 1999). Memelilerde, bağırsak mikroflorasına bağlı olan safra tuzu hidrolizi, safra tuzu metabolizmasının bir parçasıdır. Hayvanlarda yapılan deneyler safra tuzu dekonjugasyonunun safra tuzu salgısını arttırdığını göstermektedir (Tanaka vd.,1999).

İnsanlarda ve diğer memelilerde kolesterol atımı feces ile olmaktadır. Kolesterol karaciğerde oluşturulan safra tuzlarının ön maddesidir ve mide-bağırsak sistemini bir sonraki salgılanma için safra kesesinde konjuge olmuş safra tuzları olarak depolanır. İnsanlarda ince bağırsağa günde 750 ile 1250 mg. arasında kolesterol ile 5500 ile 35500 mg arasında konjuge safra tuzu boşaltılmaktadır. Konjuge safra tuzları ince bağırsağa diyetel yağların, kolesterolün, hidrofobik vitaminlerin ve diğer yağda çözünen bileşiklerin emilimine yardım etmek amacıyla salgılanır. Konjuge safra tuzları ince bağırsakta emilerek tekrar karaciğere geri döner. Safra tuzlarının az bir kısmı da (250-400 mg) emilmez ve serbest safra tuzları olarak feces ile atılır. Serbest

safr tuzlarının çözünürlüğü ve bağırsak lümeninden emilimleri daha azdır. Böylece safr tuzlarının dekonjugasyonu, bağırsak-karaciğer sisteminden ayrılanları yerine yeni safr asitlerinin oluşumunu artırarak ya da bağırsak lümeninde ilerlerken kolesterolün emilimini azaltarak serum kolesterol seviyesini azaltabilmektedir.

Laktik asit bakterilerinin hipokolesterolemik hareketlerini açıklayan diğ er mekanizmalardan birisi de; gelişmeleri sırasında hücreler tarafından kolesterolün asimile edilmesidir (Gilliland vd., 1985; Buck vd., 1994; Pigeon vd., 2002;). Benzer gözlemler *Bifidobacterium longum* için de belirtilmiştir (Dambekodi vd., 1998). Noh vd. (1997) *Lactobacillus acidophilus*'un gelişme sırasında besiyerindeki kolesterolü hücre membranının içine aldığı nı açıklamışlardır. Bu araştırmacılar dekonjuge safr asitlerinin çözünürlüğünü korumaya yeterli olan pH 6.0'da gelişme sırasında da kolesterol miselleri ve konjuge safr tuzları ilave edilmiş besiyerinden kolesterolün hala azaldığını gözlemlemişlerdir (Brashears vd., 1998; Noh vd., 1998).

Tahri vd. (1996) bifidobakter türleri tarafından kolesterolün besiyerinden azaltılmasının hem bakteriyel asimilasyon hem de dekonjuge safr tuzları ile çökmeye bağı lı olduğunu belirtmişlerdir.

Araştırmacılar laktobasillerin dışında da kolesterolü azaltma özelliğine sahip mikroorganizmaları araştırmışlardır. Psomas vd. (2003) bebek fecesinden ve feta peynirinden izole edilmiş 8 maya türünün kolesterolü asimile etme özelliklerini incelemişlerdir. İzole ettikleri *Saccharomyces cerevisiae* türlerinin 72 saat süresince 37 °C'de inkübasyon sonrası %90'ın üzerinde kolesterolü hücrelerinin içine aldıklarını belirlemişlerdir.

Laktik asit bakterilerinin probiyotik aktivite gösterebilmesi için insan mide ve bağırsak sisteminin salgılarına dayanıklı olmaları gerekmektedir. Bu amaçla asit ve safr toleransı olan suşların seçilmesi gerekmektedir. Taranto vd. (1996) yaptıkları bir çalışmada bu koşullara dayanıklı olan *Enterococcus faecium*'un kolesterolü azaltma özelliğini incelemişler ve %12 ile %56 oranında kolesterolü azaltıldığını belirlemişlerdir.



### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3. 1. Materyal**

34 bireyin dışkı örneklerinden izole edilen ve biyokimyasal testler ile (laktobasiller için glikozdan gaz oluşturma, arjininden amonyak oluşturma, 15 °C ve 45 °C'de gelişme, karbonhidrat testleri; enterekoklar için 10 °C ve 45 °C'de gelişme, pH 9.6'da gelişme, %6.5 NaCl'de üreme, %0.1 metilen mavisini indirgeme, şeker testleri) tanımlamaları yapılmış olan 96 adet laktobasil ve 33 adet enterekokun (Başyığıt, 2004) kolesterolü azaltma özellikleri incelenmiştir.

İzolatların suş numaralarının verilmesinde izolasyon kaynağı, hastanın yaşı ve sayısı dikkate alınmıştır. Hastalardan izole edilen suşlar için izolasyon materyali gayta ise A harfi ile, gastrik biyopsi ise B harfi ile gösterilmiştir. Yaş grupları ise hasta 40 yaşın altında ise A harfi ile, 40-55 yaş arasında ise B harfi ile, 55 yaşından büyükse C harfi ile simgelenmiştir. Bu harflerden sonra gelen sayı, hasta sayısını ifade etmektedir. En son rakamlar ise suş sayısıdır. Örneğin BC16-17 nolu suş gastrik biyopsiden izole edilmiş, 55 yaşın üzerindeki 16. bireyden sağlanmıştır.

Kontrol grubunda ise sadece gayta örneği alındığı için yaş grubuna ve hasta sayısına göre kodlama yapılmıştır. Kontrol grubundan alınan izolatlar K harfi ile simgelenmiştir. Bu şekilde yapılan tanımlamanın daha sonra sonuçların değerlendirilmesinde kolaylık sağlayacağı düşünülmüştür (Başyığıt, 2004).

#### **3. 2. Metot**

##### **3. 2. 1. Saf Kültürlerin Muhafaza Edilmesi**

Saf kültürlerin muhafaza edilmesinde %10'luk Crossley Milk Medium (Oxoid) kullanılmıştır. Crossley Milk Medium besiyeri 3'er mL'lik hacimler halinde tüplere dağıtılmış, üzerine sıvı parafin eklenerek 121 °C'de 5 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Daha sonra Man Rogasa Sharp (MRS-Merck) sıvı besiyerinde

aktifleştirilmiş kültürlerden tüplere %1 oranında inoküle edilerek 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Besiyeri rengi maviden yeşile döndüğü zaman inkübasyona son verilerek, karıştırılan kültürler aseptik koşullarda eppendorf tüplerine alınmış ve -80 °C'de muhafaza edilmiştir (Çakır, 1996; Manero ve Blanch, 1999; Başyigit, 2004;).

### 3. 2. 2. Kültürlerin Aktifleştirilmesi

-80 °C'de muhafaza edilen kültürler kullanılmadan önce 3'er mL steril MRS sıvı besiyerini içeren tüpler içinde 37 °C'de %1 oranında aşılama yapılarak iki kez aktifleştirilmiştir.

### 3. 2. 3. Sıvı Besiyerinin Hazırlanması

MRS-THİO sıvı besiyeri deneme öncesi MRS sıvı besiyerine %0.2 sodyum tioglikolat (Sigma) ve %0.3 safra tuzu (oxgall-Sigma) ilave edildikten sonra besiyeri tüplere 10'ar mL dağıtılmıştır. Tüpler 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmişlerdir.

MRS-THİO sıvı besiyerinin bileşimi:

Pepton	10.0 g
Maya ekstraktı	4.0 g
Et ekstraktı	8.0 g
D-glikoz	20.0 g
Sodyum asetat	5.0 g
di-potasyum hidrojen fosfat	2.0 g
Magnezyum sülfat	0.2 g
Manganez sülfat	0.04 g
Tween 80	1 mL
di-amonyum hidrojen sitrat	2.0 g
Sodyum tioglikolat	2 g
Destile su	1000 mL

### 3. 2. 4. Suda Çözünür Kolesterolün Hazırlanması

Suda çözünür kolesterolün stok çözeltisi polyoxyethanyl-cholesterylsebacate'i (Sigma) 20mg/mL oranında destile suda çözerek hazırlanmıştır. Çözelti 0.45µm membran filtreden steril test tüplerine aktarılmış ve 5 °C'de depolanmıştır. Stok çözelti gerektiği oranda steril destile su ile ayarlanıp sıvı besiyerine ilave edilmiştir (Noh vd.,1997)

### 3. 2. 5. Bakteriler Tarafından Azalan Kolesterolün Ölçümü

%0.2 sodyum thioglikolat, %0.3 safra tuzu ve 150mg/L oranında kolesterol içeren MRS-THİO sıvı besiyerine 18 saatlik taze kültürden %1 oranında aşılınmıştır. 24 saat süresince 37 °C'de anaerobik şartlarda inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonrası hücreler 10 dakika 12.000×g' de 1 °C'de santrifüj edilmiştir. Aynı miktarda destile su pelet üzerine ilave edilerek tekrar suspansiyon haline getirilmiştir. Destile su ile çözülmüş hücreler ve o süpernatanttaki kolesterol miktarını belirlemek için Rudel ve Morris tarafından tarif edilen *o* – phthalaldehyde metodu kullanılmıştır (Gilliland vd., 1985). Bütün işlemler çift paralelli olarak yapılmıştır ve ayrıca inoküle edilmemiş steril sıvı besiyeri de analiz edilmiştir. Her bir örnekten 0.5 mL temiz bir test tüpüne alınmış ve üzerine önce 3 mL %95'lik etanol sonra 2 mL %50'lik potasyum hidroksit ilave edilmiştir. Her bir maddesinin ilavesinden sonra tüpler karıştırılmıştır. Tüpler 10 dakika 60 °C'lik su banyosuna tutulmuş ve soğuyunca üzerlerine 5 mL hekzan ilave edilmiştir. Tüp karıştırıcıda 20 saniye süre ile 5 kez karıştırılmış ve üzerine 3 mL destile su ilave edilmiş, karıştırma işlemi tekrarlanmıştır. Tüpler 15 dakika oda sıcaklığında faz ayrımı için bekletilmiştir. Daha sonra 2.5 mL hekzan tabakası temiz bir test tüpüne alınmıştır. Her bir tüpteki hekzan 60°C'de azot gazı altında evapore edilmiş ve üzerlerine 4 mL *o*–phthalaldehyde çözeltisi ilave edilmiştir. *o*-phthalaldehyde (Sigma) çözeltisi, mililitresinde 0.5 mg *o*-phthalaldehyde olacak asetik asitte hazırlanmıştır. Tüpler 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve 2 mL konsanre sülfirik asit yavaşça tüpün kenarından ilave edilmiş ve tüp karıştırıcıda daha önce tarif edildiği gibi

karıştırılmıştır. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 550 nm’de kontrole karşı Shimadzu UV-1601 model spektrofotometrede okunmuştur.

Absorbans değerleri kolesterol miktarını belirlemek amacıyla standart kurve ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar  $\mu\text{g/mL}$  olarak belirtilmiştir. Aynı işlemler 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 $\mu\text{g}$  kolesterol içeren örneklerde de uygulanarak standart kurve çizilmiştir (Gilliland vd., 1985).

Kolesterolü azaltma yüzdesi aşağıdaki formülden hesaplanmıştır:

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

A=yüzde kolesterolü azaltma oranı

B=hücreleri içeren kısımda kolesterol miktarı ( $\mu\text{g}$ )

C=hücreleri içermeyen kısımdaki kolesterol miktarı ( $\mu\text{g}$ ) (Usman vd., 1999)

### 3. 2. 6. Kültürlerin Asit Toleransı

Kültürlerin asit toleransı Pereira ve Gibson (2002)’de belirtilen yöntemle analiz edilmiştir. Sterilize edildikten sonra pH’si 2’ye ayarlanan steril MRS sıvı besiyeri aseptik koşullarda steril tüplere 10’ar mL olacak şekilde dağıtılmıştır. MRS sıvı besiyerinde 18 saatte geliştirilen taze kültürlerin pH’leri ölçülmüş ve %10 oranında pH’si 2’ye ayarlanmış MRS sıvı besiyerine inokülasyon yapılmıştır. Bu kültürler 37  $^{\circ}\text{C}$ ’de inküle edilmiş ve inkübasyonun 0., 60. ve 120. dakikalarında 1’er mL alınarak, 9 mL steril fizyolojik tuzlu su ile  $10^{-6}$ ’ya kadar seri dilüsyonlar hazırlanmış ve  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-1}$  dilüsyonlarından MRS agara damla kültür yöntemiyle ekim yapılmıştır. 37  $^{\circ}\text{C}$ ’de 48 saatlik inkübasyondan sonra MRS agar üzerine gelişen koloniler sayılmıştır.

### 3. 2. 7. Kültürlerin Safra Tuzuna Dayanıklılık Testi

%0.3 safra tuzu içeren ve içermeyen MRS-THİO sıvı besiyerine 18 saatlik taze kültürden %1 oranında inoküle edilmiştir. 37  $^{\circ}\text{C}$ ’de 6 saat boyunca inkübe edilmiş ve

başlangıçtan itibaren 0. 3. 6. saatlerde spektrofotometrede 620 nm dalga boyunda optik yoğunluklarındaki değişim tespit edilmiştir (Walker ve Gilliland, 1993). Ayrıca 6 saatlik inkübasyon süresince 0., 3. ve 6. saatlerde kültürlerden 1'er mL alınarak  $10^{-6}$ 'ya kadar seri dilüsyonları hazırlanmış ve  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$  ve  $10^{-1}$  dilüsyonlardan MRS agara damla kültür yöntemiyle ekim yapılmıştır.  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 48 saatlik inkübasyondan sonra MRS agar üzerinde gelişen koloniler sayılmıştır (Prasad vd., 1999; Erkkilä ve Petäjä, 2000; Xanthopoulos vd., 2000; Başyigit, 2004).

### **3. 2. 8. Kültürlerin Safra Tuzlarını Dekonjuge Etme Özelliklerinin Belirlenmesi**

Kültürlerin safra tuzlarını dekonjuge etme özelliklerinin belirlenmesinde safra tuzu içeren MRS agarların hazırlanması için taurokolik asitin (TCA) ve glikokolik asitin (GCA) sodyum tuzları (Sigma) 1 mM olacak şekilde MRS agara ayrı ayrı ilave edilmiştir.  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra besiyerleri steril petri kutularına dökülmüş, bir gece bekletilmiştir. Bütün petrilere 18 saatlik taze kültürlerden 10  $\mu\text{L}$  olacak şekilde damla kültür yöntemi ile ekim yapılmıştır.  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 72 saat süresince anaerobik olarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında opak tanecikli beyaz kolonilerin etraflarında zon oluşturma ve oluşturmama özelliklerine göre değerlendirilmişlerdir (Ahn vd., 2003).

### **3. 2. 9. Kültürlerin Kremadaki Kolesterolü Azaltma Özelliklerinin Belirlenmesi**

#### **3. 2. 9. 1. Kültürlerin Hazırlanması**

MRS sıvı besiyerinde iki kez aktifleştirilen 18 saatlik taze kültürden %2 oranında %15 yağlı kremaya inoküle edilmiş ve kültürler  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat anaerobik olarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kültürler  $12000\times g$ 'de santrifüj edilmiş ve kültürler tarafından kullanılan kolesterol miktarı Fletouris vd. (1998) tarafından tarif edilen metoda göre gaz kromatografisinde (GC) yapılmıştır.

### 3. 2. 9. 2. Kolesterol Standardının Hazırlanması

Stok kolesterol çözeltisinin hazırlanması için 20mg kolesterol standardı (Sigma) 10mL hekzan (Riedel-de Haën) içersinde çözündürülmüştür (2mg/mL). Çalışma sırasında bu stok solüsyondan 10-80µg/mL arasındaki oranlarda dilüsyonlar yapılmıştır.

### 3. 2. 9. 3. Gaz Kromatografisi Çalışma Şartları

Kolon:Phenomenex ZB 1;

15m x 0.32mm i. d. 1 µ f. t.;

Fırın programı: 285<sup>0</sup>C izotermal;

Enjektör: 300<sup>0</sup>C;

Dedektör: 300<sup>0</sup>C FID;

Kuru hava: 400mL/dak;

Hidrojen: 40mL/dak;

Taşıyıcı Gaz: Helyum 2mL/dak;

Enjeksiyon hacmi: 1µL.

### 3. 2. 9. 4. Örnek Hazırlama

Örnek hazırlama tüplerine 0.2g krema hassas bir şekilde tartılmıştır. Üzerine 5mL 0.5M metanolik KOH çözeltisi ilave edilmiştir. Tüplerin ağızları kapatıldıktan sonra 15 saniye süresince tüp karıştırıcıda içerik karıştırılmıştır. 80<sup>0</sup>C'deki su banyosunda her 5 dakikada bir 10 saniye karıştırarak 15 dakika bekletilmiştir. Su banyosundan çıktıktan sonra soğutulmuş ve üzerine 1mL destile su ve 5 mL hekzan ilave edilmiştir. İçerik 1 dakika süresince tüp karıştırıcıda karıştırılmış daha sonra 1 dakika 2000x g' de santrifüj edilmiştir. Üst faz GC analizinde kullanılmıştır.

### 3. 3. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler SAS Paket programı kullanılarak yapılmıştır (SAS 0.7,1998).

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

##### 4. 1. Bakteriler Tarafından MSR-THİO Sıvı Besiyerinde Azalan Kolesterolün Ölçümü

96 adet laktobasil ve 33 adet enterokokun, MRS-THİO sıvı besiyerine % 1 oranında aşılıp 37<sup>0</sup>C’de 24 saatlik anaerobik inkübasyon süresi sonunda 3.2.5’ te belirtilen yöntemle, süpernatant, pelet ve inoküle edilmemiş kontrol örneklerinde kolesterol tayini yapılmıştır. Bakteriler tarafından azaltılan kolesterol miktarı laktobasillerde %0.49 ile % 58.17 arasında, enterokoklarda ise %4.69 ile %52.24 arasında değişmektedir. Kültürlerin kolesterolü azaltma miktarları arasında büyük farklılıklar bulunmaktadır ( $p<0.0001$ ). 96 adet laktobasilden 1 adedi *L. acidophilus*, 14 adedi *L. fermentum*, 6 adedi *L. plantarum*, 20 adedi *L. agilis*, 8 adedi *L. murinus*, 1 adedi *L. johnsonii*, 3 adedi *L. rhamnosus*, 4 adedi *L. intestinalis*, 10 adedi *L. casei*, 1 adedi *L. bavaricus*, 8 adedi *L. maltaromicus* ve 1 adedi de *L. paracasei*’dir. Çizelge 4.1. *L. acidophilus* bakterisinin süpernatant, pelet ve kontroldeki kolesterol oranları ( $\mu\text{g/ml}$ ), % azalan kolesterol miktarı, 24 saatlik inkübasyon sonrası pH ve absorbans değerleri görülmektedir. Kolesterol asimilasyonu ile ilgili çalışmalar *L. acidophilus* bakterisinin farklı suşları üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu bakterinin genellikle kolesterol asimilasyon oranı yüksektir (Lin ve Chen, 2000; Buck ve Gilliland, 1994; Gilliland ve Walker, 1990; Gilliland vd., 1985). Ancak Çizelge 4.1.’de de görüldüğü gibi 1 adet *L. acidophilus* suşunun kolesterol asimilasyon oranının düşük olduğu gözlenmektedir. Bu sonuçta kolesterol asimilasyon oranının *L. acidophilus* bakterilerinde suş düzeyinde değişen bir özellik olduğunu göstermektedir. Çizelgelerdeki;

%A. K., %Azalan Kolesterol

S: Süpernatanttaki kolesterol miktarı( $\mu\text{g/ml}$ )

P: Peletteki kolesterol miktarı( $\mu\text{g/ml}$ )

K: İnoküle edilmemiş kontroldaki kolesterol miktarı( $\mu\text{g/ml}$ )

Abs: 24 saatlik inkübasyon sonrası kültürlerin gösterdiği absorbans değerlerine karşılık gelmektedir.

Lin ve Chen (2000) kolesterolün sıvı besiyerinden *L.acidophilus* bakterisinin farklı suşları tarafından kolesterolün sıvı besiyerinden azaltılma özelliklerini incelemişler ve 6 farklı suşun %20 ile %57 arasında kolesterolü azalttığını gözlemlemişlerdir.

Çizelge 4.1. *L.acidophilus* bakterisinin süpernatant, pelet ve kontroldeki kolesterol oranları( $\mu\text{g/ml}$ ), % azalan kolesterol miktarı, 24 saatlik inkübasyon sonrası pH ve absorpsiyon değerleri

Laktik asit bakterisi	S	P	K	%A.K.	pH	Abs.
<i>L.acidophilus</i> AB5-18	142.78 $\pm$ 2.57	15.0	143.49	0.49	5.23	0.686

%A. K. %Azalan Kolesterol

S: Süpernatanttaki kolesterol miktarı( $\mu\text{g/ml}$ )

P: Peletteki kolesterol miktarı( $\mu\text{g/ml}$ )

K: İnokule edilmemiş kontroldaki kolesterol miktarı( $\mu\text{g/ml}$ )

Abs: 24 saatlik inkübasyon sonrası kültürlerin gösterdiği absorpsiyon değerleri

Yapılan çalışmalarda özellikle insan serum kolesterol düzeyini belirgin düzeyde azalttığı belirlenen *Lactobacillus acidophilus* bakterisi üzerinde yoğunlaşmıştır ve bu bakterinin farklı suşlarının kolesterolü azaltma özellikleri farklı araştırmacılar tarafından incelenmiştir (Gilliland ve Walker, 1990; Walker ve Gilliland, 1993; Buck ve Gilliland, 1994; Noh vd., 1997; Anderson ve Gilliland, 1999; Lin ve Chen, 2000). Üzerinde durulan diğer önemli konu ise bakterilerin kolesterol azaltma mekanizmalarının belirlenmesidir. Bu mekanizma içinde farklı görüşler mevcuttur. Bazı araştırmacılar kolesterolün hücreler tarafında asimile edildiğini (Noh vd., 1997), bazıları sıvı besiyerinde gelişme sırasında düşen pH'ya bağlı olarak safra tuzları ile birlikte kolesterolün çökeldiğini (Klaver ve van der Meer, 1993), bazı araştırmacılar ise her iki olayında gerçekleştiğini savunmuşlardır (Tahri vd., 1996).

Brashears ve Gilliland (1997) *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus casei*'ye ait bazı suşların MRS sıvı besiyerinde gelişme sırasında kolesterolü azaltma oranlarına pH'nın etkisini araştırmışlardır. Kültür koleksiyonlarında bulunan *Lactobacillus acidophilus* L1, *Lactobacillus acidophilus* 43121, *Lactobacillus casei* N19 ve *Lactobacillus casei* E5'in pH kontrollü (pH 6.0) ve pH kontrolsüz ortamda kolesterolü azaltma oranlarını incelemişlerdir. Kolesterolün MRS sıvı besiyerinden uzaklaşma oranında kültürler arasında farklılıklar bulunmuştur. *Lactobacillus*



*acidophilus* L1 kültürünün pH kontrollü ve pH kontrolsüz ortamda da gelişme sırasında kolesterolü azaltma oranlarında belirgin bir farklılık bulunmamıştır. *Lactobacillus acidophilus* 43121 kültürünün pH kontrollü ortamda kolesterolü azaltma oranında bir düşüş gözlenirse de önemli bulunmamıştır. Fakat *Lactobacillus casei* N19 ve E5'te pH kontrollü ortamda kolesterolü azaltma oranlarında belirgin bir düşüş gözlenmiştir. Bu sonuçlar *Lactobacillus casei*'nin kolesterolü besiyerinden azaltma özelliğinin sıvı besiyerinde gelişme sırasında pH'nın düşüşüne bağlı olarak safra tuzları ile birlikte kolesterolün çökmesine bağlanmıştır. Farklı kültürler üzerinde yapılan bu çalışmalar her kültürün farklı bir mekanizma ile kolesterolü azalttığını göstermektedir. Klaver ve Vander Meer (1993) *Lactobacillus acidophilus* tarafından besiyerinden kolesterolün uzaklaştırılmasını safra tuzu dekonjugasyonu sonucu kolesterol misellerinin bozulmasına ve mikroorganizmaların besiyerinde gelişmeleri sırasında üretilen asit sonucu düşen pH sonucu serbest safra tuzları ile kolesterolün çökmesine bağlamıştır. *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus casei* gelişme sırasında safra tuzu hidrolaz enzimi üreterek safra tuzlarını dekonjuge etmektedir (Brashears vd., 1997; Corzo vd., 1999). Besiyerinin pH'si düşerse dekonjuge safra asiti olan kolik asitin çözünürlüğü de azalır. Kolik asit pH 5'ten düşük olduğu zamanlarda genellikle çözünmez. Bakteriyel gelişme sırasında pH'nın düşmesi ile kolik asit sıvı besiyerinde çökler ve kolesterol misellerinde bozulma yaparak onun çökmesine neden olur. (Brashears vd., 1997).

Çizelge 4.2.'de *L.fermentum* bakterilerinin süpernatant, pelet ve kontroldeki kolesterol oranları( $\mu\text{g/ml}$ ), % azalan kolesterol miktarı, 24 saatlik inkübasyon sonrası pH ve absorbans değerleri görülmektedir. Besiyerinden kolesterolü azaltma oranları *L.fermentum* bakterisinin farklı suşlarında da değişiklikler göstermektedir. 14 adet *L.fermentum* suşunun 7 adeti %25 nin üzerinde kolesterol indirirken 7 tanesi %25 nin altında kalmıştır. Çizelge 4.2.'den de görüldüğü gibi *L.fermentum* var. *cellobiosus* AC3-11 %5.02 ile kolesterol azalma yüzdesi en düşük, *L.fermentum* BK9-38 ise % 46.10 ile kolesterol azalma yüzdesi en yüksek olan *L.fermentum* suşudur. Bu sonuçlar kolesterolün sıvı besiyerinden azaltılma oranının *L.fermentum* bakterilerinde de suş düzeyinde değişen bir özellik olduğunu göstermektedir. Suşlar arasında meydana gelen bu değişim istatistik açıdan önemli bulunmuştur ( $p < 0.0001$ ).

Çizelge 4.2. *L.fermentum* bakterilerinin süpernatant, pelet ve kontroldeki kolesterol oranları ( $\mu\text{g/ml}$ ), % azalan kolesterol miktarı, 24 saatlik inkübasyon sonrası pH ve absorbands değerleri

Laktik asit bakterisi	S	P	K	%A. K.	pH	Abs.
<i>L. fermentum</i> BK9-38	88.33 $\pm$ 6.79	65.10	163.89	46.10	5.14	0.945
<i>L. fermentum</i> AA13-55	102.78 $\pm$ 11.00	53.8	167.22	38.54	4.73	1.227
<i>L. fermentum</i> AB19-93	143.89 $\pm$ 4.71	60.13	205.84	30.10	5.13	0.764
<i>L. fermentum</i> AK6-24	130.56 $\pm$ 12.57	46.1	180.75	27.77	5.07	1.452
<i>L. fermentum</i> AB19-94	106.67 $\pm$ 3.93	30.65	143.49	25.66	5.15	0.750
<i>L. fermentum</i> AB7-32	125.50 $\pm$ 7.86	49.4	168.55	25.54	5.04	0.561
<i>L. fermentum</i> AC18-82	153.89 $\pm$ 4.71	61.05	205.84	25.24	4.85	1.555
<i>L. fermentum</i> AC21-103	126.67 $\pm$ 2.36	56.1	168.55	24.85	4.20	2.232
<i>L. fermentum</i> AC18-87	144.45 $\pm$ 8.64	60.5	189.70	23.85	5.26	0.699
<i>L. fermentum</i> AA4-8	128.33 $\pm$ 0.64	24.93	163.89	21.70	5.02	0.689
<i>L. fermentum</i> AB19-95	150.56 $\pm$ 14.14	43.8	189.70	20.63	5.01	1.311
<i>L. fermentum</i> AB7-33	163.34 $\pm$ 2.36	32.78	196.30	16.79	5.19	0.540
<i>L. fermentum</i> BK13-56	102.78 $\pm$ 8.39	18.3	121.67	15.53	5.16	0.773
<i>L.fermentum</i> var. <i>cellobiosus</i> AC3-11	171.67 $\pm$ 9.43	16.64	180.75	5.02	5.48	0.163

Çizelge 4.3.'de *L. plantarum* bakterilerinin süpernatant, pelet ve kontroldeki kolesterol oranları ( $\mu\text{g/ml}$ ), % azalan kolesterol miktarı, 24 saatlik inkübasyon sonrası pH ve absorbands değerleri görülmektedir. Besiyerinden kolesterolü azaltma oranları *L. plantarum* bakterisinin farklı suşlarında da değişiklikler göstermektedir. Çizelge 4.3.'den de görüldüğü gibi *L. plantarum* BK9-40 %9.63 ile kolesterol azalma yüzdesi en düşük, *L. plantarum* BC12-50 ise % 38.53 ile kolesterol azalma yüzdesi en yüksek olan, *L. plantarum* suşudur. Bu sonuçlar kolesterolün sıvı besiyerinden azaltılma oranının, *L. plantarum* bakterilerinde de suş düzeyinde değişen bir özellik olduğunu göstermektedir ( $p<0.0001$ ). Hosono ve Tono-oka (1995), farklı türdeki laktik asit bakterilerinin kolesterolü bağlama özelliklerini liyofilize hücrelere 1 mL kolesterol-etanol solusyonu ilave edip 37<sup>0</sup> C'de 1 saatlik inkübasyon sonrası hücrelerin kolesterolü azaltma özelliklerini incelemişler ve *L. plantarum* 39'un %18.54, *L. plantarum* 04' ün %15.58 ve *L. plantarum* 27'nin de %14.05 oranında kolesterolü azalığını belirlemişlerdir.

Çizelge 4.3. *L. plantarum* bakterilerinin süpernatant, pelet ve kontroldeki kolesterol oranları ( $\mu\text{g/ml}$ ), % azalan kolesterol miktarı, 24 saatlik inkübasyon sonrası pH ve absorban değerleri

Laktik asit bakterisi	S	P	K	%A. K.	pH	Abs.
<i>L. plantarum</i> BC12-50	111.11 $\pm$ 16.50	57.2	180.75	38.53	5.06	1.233
<i>L. plantarum</i> AC3-27	119.45 $\pm$ 1.57	69.4	189.70	37.03	4.23	2.157
<i>L. plantarum</i> BC12-50	121.67 $\pm$ 26.71	60.55	189.70	35.86	5.09	1.260
<i>L. plantarum</i> AK4-120	144.44 $\pm$ 7.07	36.6	180.75	20.09	5.08	1.010
<i>L. plantarum</i> AK3-10	170.00 $\pm$ 7.07	35.5	205.84	17.41	5.16	0.697
<i>L. plantarum</i> BK9-40	151.11 $\pm$ 16.50	20.8	167.22	9.63	5.14	1.060

Çizelge 4.4.'de *L. agilis* bakterilerinin süpernatant, pelet ve kontroldeki kolesterol oranları ( $\mu\text{g/ml}$ ), % azalan kolesterol miktarı, 24 saatlik inkübasyon sonrası pH ve absorban değerleri görülmektedir. 20 adet *L. agilis* bakterisinin farklı suşlarında da kolesterol indirgemesi bakımından değişiklikler izlenmektedir. Çizelge 4.4.'ten de görüldüğü gibi *L. agilis* AK4-16 %10.94 ile kolesterol azalma yüzdesi en düşük, *L. agilis* BK10-47 ise % 56.55 ile kolesterol azalma yüzdesi en yüksek olan *L. agilis* suşudur. *L. agilis* BK10-47, *L. agilis* AB7-35, *L. agilis* AC3-10 bakterilerinin kremadaki kolesterolü azaltma miktarları da incelenmiştir. Kremada 24 saatlik inkübasyon sonrası pH *L. agilis* BK10-47'de 5.02, *L. agilis* AB7-35'te 4.18, *L. agilis* AC3-10'da ise 4.26 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.5.'de *L. murinus* bakterilerinin süpernatant, pelet ve kontroldeki kolesterol oranları ( $\mu\text{g/ml}$ ), % azalan kolesterol miktarı, 24 saatlik inkübasyon sonrası pH ve absorban değerleri görülmektedir. Besiyerinden kolesterolü azaltma oranları *L. murinus* bakterisinin farklı suşlarında da değişiklikler göstermektedir. Çizelge 4.5.'ten de görüldüğü gibi *L. murinus* BK9-39 %11.78 ile kolesterol azalma yüzdesi en düşük, *L. murinus* BB16-75 ise % 51.22 ile kolesterol azalma yüzdesi en yüksek olan *L. murinus* suşudur. *L. murinus* BB16-75 kremadan kolesterolü azaltma testi için seçilmiştir. Çizelge 4.5'te absorban değeri en düşük ve pH değeri en yüksek olan bakteri olduğu görülmektedir. Bu durum pH ile kolesterol asimilasyonu arasında bir ilişki olmadığını göstermektedir ( $p>0.05$ ).

Çizelge 4.4 *L. agilis* bakterilerinin süpernatant, pelet ve kontroldeki kolesterol oranları ( $\mu\text{g/ml}$ ), % azalan kolesterol miktarı, 24 saatlik inkübasyon sonrası pH ve absorbens değerleri

Laktik asit bakterisi	S	P	K	%A. K.	pH	Abs.
<b><i>L. agilis</i> BK10-47</b>	<b>89.44±3.93</b>	<b>99.4</b>	<b>205.84</b>	<b>56.55</b>	<b>5.02</b>	<b>1.256</b>
<b><i>L. agilis</i> AB7-35</b>	<b>63.89±4.71</b>	<b>81.6</b>	<b>143.49</b>	<b>55.47</b>	<b>4.18</b>	<b>2.251</b>
<b><i>L. agilis</i> AC3-10</b>	<b>82.78±6.89</b>	<b>70.90</b>	<b>163.89</b>	<b>49.49</b>	<b>4.26</b>	<b>2.223</b>
<i>L. agilis</i> AB6-25	77.23±9.43	67.15	143.49	46.18	4.41	2.081
<i>L. agilis</i> BK9-42	95.00±12.57	65.8	168.55	43.64	5.13	1.059
<i>L. agilis</i> BC18-80	107.22±6.87	92.7	189.70	43.48	5.09	0.919
<i>L. agilis</i> AA17-74	107.23±23.57	78.7	189.70	43.47	4.98	0.963
<i>L. agilis</i> AC12-47	95.55±13.36	62.78	167.22	42.86	4.13	2.205
<i>L. agilis</i> BK8-34	97.22±3.14	60.5	168.55	42.32	4.25	2.075
<i>L. agilis</i> AK4-11	88.34± 4.71	66.05	143.49	38.43	4.24	2.157
<i>L. agilis</i> AC18-86	118.89±18.87	66.05	189.70	37.33	4.22	2.214
<i>L. agilis</i> BK11-50	85.00±9.43	36.1	121.67	30.14	5.09	1.078
<i>L. agilis</i> BK11-51	147.22±6.89	68.98	205.84	28.48	5.11	1.045
<i>L. agilis</i> AA1-2	150.56±58.14	52.75	205.84	26.86	5.18	0.756
<i>L. agilis</i> AC10-42	145.56±13.36	42.7	180.75	19.47	5.02	1.377
<i>L. agilis</i> AA17-73	136.67±11.79	42.98	168.55	18.91	5.10	0.743
<i>L. agilis</i> AC21-102	153.89±11.00	45.1	189.70	18.88	5.16	0.862
<i>L. agilis</i> AC18-88	149.45±4.71	49.4	180.75	17.32	5.21	0.695
<i>L. agilis</i> AK4-13	143.33±8.64	29.12	168.55	14.96	4.86	1.143
<i>L. agilis</i> AK4-16	183.33±19.64	22.51	205.84	10.94	4.98	1.354

Çizelge 4.5. *L. murinus* bakterilerinin süpernatant, pelet ve kontroldeki kolesterol oranları ( $\mu\text{g/ml}$ ), % azalan kolesterol miktarı, 24 saatlik inkübasyon sonrası pH ve absorbens değerleri

Laktik asit bakterisi	S	P	K	%A. K.	pH	Abs.
<b><i>L. murinus</i> BB16-75</b>	<b>70.00±7.07</b>	<b>63.67</b>	<b>143.49</b>	<b>51.22</b>	<b>5.24</b>	<b>0.482</b>
<i>L. murinus</i> AB20-961	122.22±7.07	53.8	168.55	27.49	4.23	2.181
<i>L. murinus</i> BK10-44	122.22±19.64	51.6	168.55	27.49	5.14	0.774
<i>L. murinus</i> AB20-99	121.67±9.24	47.2	163.89	25.76	5.02	1.032
<i>L. murinus</i> AK4-121	153.33±29.36	53.67	196.30	21.89	5.10	1.268
<i>L. murinus</i> AC8-38	115.56±3.93	30.5	143.49	19.46	5.03	1.360
<i>L. murinus</i> AC3-13	170.56±8.46	26.11	196.30	13.11	4.30	2.157
<i>L. murinus</i> BK9-39	159.45±20.43	37.2	180.75	11.78	5.19	1.050

Çizelge 4.6. *L. johnsonii* bakterisinin süpernatant, pelet ve kontroldeki kolesterol oranları( $\mu\text{g/ml}$ ), % azalan kolesterol miktarı, 24 saatlik inkübasyon sonrası pH ve absorbens değerleri

Laktik asit bakterisi	S	P	K	%A. K.	pH	Abs.
<i>L. johnsonii</i> AK7-28	147.22 $\pm$ 29.86	22.5	167.22	11.96	4.43	2.005

Çizelge 4.7. *L. rhamnosus* bakterilerinin süpernatant, pelet ve kontroldeki kolesterol oranları ( $\mu\text{g/ml}$ ), % azalan kolesterol miktarı, 24 saatlik inkübasyon sonrası pH ve absorbens değerleri

Laktik asit bakterisi	S	P	K	%A. K.	pH	Abs.
<i>L. rhamnosus</i> AB20-100	89.44 $\pm$ 5.35	74.4	163.89	45.43	5.02	0.698
<i>L. rhamnosus</i> AK6-27	108.33 $\pm$ 12.57	51.6	168.55	35.73	5.03	0.905
<i>L. rhamnosus</i> AK4-18	116.11 $\pm$ 14.33	46.1	163.89	29.15	5.03	1.199

Çizelge 4.8. *L. intestinalis* bakterilerinin süpernatant, pelet ve kontroldeki kolesterol oranları ( $\mu\text{g/ml}$ ), % azalan kolesterol miktarı, 24 saatlik inkübasyon sonrası pH ve absorbens değerleri

Laktik asit bakterisi	S	P	K	%A. K.	pH	Abs.
<b><i>L. intestinalis</i> AC18-85</b>	<b>60.56<math>\pm</math>11.00</b>	<b>77.2</b>	<b>143.49</b>	<b>57.79</b>	<b>4.49</b>	<b>1.964</b>
<i>L. intestinalis</i> AK5-22	83.89 $\pm$ 4.78	68.3	163.89	48.81	4.41	2.005
<i>L. intestinalis</i> AA14-60	156.67 $\pm$ 8.64	29.36	196.30	20.19	5.19	0.760
<i>L. intestinalis</i> BB16-661	161.67 $\pm$ 25.14	34.89	196.30	17.64	4.29	2.205

Çizelge 4.6'da *L. johnsonii* bakterisinin Çizelge 4.7.'de *L. rhamnosus* bakterilerinin, Çizelge 4.8'de ise *L. intestinalis* bakterilerinin süpernatant, pelet ve kontroldeki kolesterol oranları ( $\mu\text{g/ml}$ ), % azalan kolesterol miktarı, 24 saatlik inkübasyon sonrası pH ve absorbens değerleri görülmektedir. *L. johnsonii* tek bir suş olup kolesterolü % 11.96 oranında indirgediği tesbit edilmiştir. *L. rhamnosus* bakterilerinin 3 farklı suşu test edilmiş ve bunların %29.15 ile %45.43 arasında kolesterol indirgedikleri bulunmuştur. Çizelge 4.8'de görülen *L. intestinalis* bakterileri ise %17.64-57.79 arasında kolesterol indirgemıştır. *L. intestinalis* AC18-85 bakterisi kremada kolesterol indirgenmesi denenmek üzere seçilmiştir.

Çizelge 4.9. *L.casei* bakterilerinin süpernatant, pelet ve kontroldeki kolesterol oranları ( $\mu\text{g/ml}$ ), % azalan kolesterol miktarı, 24 saatlik inkübasyon sonrası pH ve absorban değerleri

Laktik asit bakterisi	S	P	K	%A. K.	pH	Abs.
<b><i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> BK10-48</b>	<b>86.11±4.89</b>	<b>115.00</b>	<b>205.84</b>	<b>58.17</b>	<b>4.23</b>	<b>1.279</b>
<b><i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> AB16-65</b>	<b>98.33±7.45</b>	<b>93.85</b>	<b>205.84</b>	<b>52.23</b>	<b>4.15</b>	<b>2.260</b>
<i>L.casei</i> BK13-54	122.78±23.57	69.4	205.84	40.35	5.08	1.249
<i>L. casei</i> AC10-40	103.89±6.29	60.56	168.55	38.36	4.18	2.114
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> AA13-53	96.11±4.71	46.1	143.49	33.02	5.24	0.468
<i>L.casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> AK7-29	143.89±7.89	61.65	205.84	30.10	4.76	1.872
<i>L.casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> BC18-81	131.12±0.79	55.0	180.75	27.46	4.29	2.107
<i>L. casei</i> AB7-31	134.95±5.50	46.65	180.75	25.34	5.14	0.845
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> AC10-39	108.89±16.50	35.0	143.49	24.11	5.11	1.081
<i>L.casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> AB6-21	165.00±4.82	35.0	180.75	8.71	5.24	0.645

10 adet *L. casei* bakterisinin farklı suşları % 8.71-58.17 arasında kolesterol indirgemıştır. *L. casei* suşları arasında en fazla kolesterol indirgeyen *L. casei* subsp.*casei* AB 16-65suşu ile *L. casei* BK10-48 suşlarının pH gelişimlerinin oldukça asidik olduğu Çizelge 4.9.'dan görülmektedir. Brashears vd. (1998) tarafından yapılan çalışmada *L. casei* pH kontrollü ve kontrolsüz ortamda kolesterol indirgemesi incelenmiş kontrollü ortamda (pH 6.0) kolesterolü azaltmanın çok az veya hiç olmadığını ancak pH kontrolsüz ortamda (pH 4.2) kolesterolün %36.3-60.6 arasında indirgendğini belirtmişlerdir. Ayrıca *L. acidophilus* bakterisinin kontrollü ve kontrolsüz pH ortamında birbirine yakın oranda kolesterolü indirgediğini belirtmişlerdir. Bu durumu *L. acidophilus* ile *L. casei* bakterilerinin kolesterol indirgeme mekanizmalarının farklı olduğu şeklinde açıklamışlardır.

Çizelge 4.10. *L.bavaricus* bakterisinin süpernatant, pelet ve kontroldeki kolesterol oranları ( $\mu\text{g/ml}$ ), % azalan kolesterol miktarı, 24 saatlik inkübasyon sonrası pH ve absorbands değerleri

Laktik asit bakterisi	S	P	K	%A. K.	pH	Abs.
<i>L.bavaricus</i> AB5-20	142.77 $\pm$ 7.86	49.4	189.70	24.74	5.23	0.666

Çizelge 4.10' da *L.bavaricus* bakterisinin tek bir suşu olduğu ve % 24.74 oranında kolesterol indirgediği görülmektedir. Çizelge 4.11'de ise *L.maltaromicus* bakterisinin 8 suşu görülmektedir. *L.maltaromicus* bakterisi sütü bozan ve süte malt aroması veren mikroorganizmadır. Ancak kolesterol indirgeme oranları oldukça yüksek olup %26.50-50.44 arasında değiştiği tablodan görülmektedir. Bu bakterinin kremada ve süt ürünlerinde kolesterol indirgeme özellikleri üzerinde çalışmalar devam edecektir.

Çizelge 4.11. *L. maltaromicus* bakterilerinin süpernatant, pelet ve kontroldeki kolesterol oranları ( $\mu\text{g/ml}$ ), % azalan kolesterol miktarı, 24 saatlik inkübasyon sonrası pH ve absorbands değerleri

Laktik asit bakterisi	S	P	K	%A. K.	pH	Abs.
<b><i>L. maltaromicus</i> A21-101</b>	<b>71.12<math>\pm</math>0.79</b>	<b>67.2</b>	<b>143.49</b>	<b>50.44</b>	<b>4.21</b>	<b>2.214</b>
<b><i>L. maltaromicus</i> AC3-16</b>	<b>102.23<math>\pm</math>16.57</b>	<b>125.00</b>	<b>205.84</b>	<b>50.34</b>	<b>4.17</b>	<b>2.301</b>
<i>L. maltaromicus</i> AA13-59	97.78 $\pm$ 7.07	98.25	180.75	45.90	4.63	2.075
<i>L. maltaromicus</i> AB20-96	114.95 $\pm$ 3.149	70.32	196.30	41.44	4.19	2.214
<i>L. maltaromicus</i> AC10-43	116.67 $\pm$ 10.21	63.89	196.30	40.57	4.44	2.147
<i>L. maltaromicus</i> AC21-1031	101.11 $\pm$ 8.64	52.67	167.22	39.53	4.15	2.165
<i>L. maltaromicus</i> AB20-97	124.45 $\pm$ 0.79	69.4	189.70	34.40	5.26	0.965
<i>L. maltaromicus</i> AK1-4	123.89 $\pm$ 1.57	56.1	168.55	26.50	5.12	0.785

Çizelge 4.12. *L. paracasei* bakterisinin süpernatant, pelet ve kontroldeki kolesterol oranları ( $\mu\text{g/ml}$ ), % azalan kolesterol miktarı, 24 saatlik inkübasyon sonrası pH ve absorbands değerleri

Laktik asit bakterisi	S	P	K	%A. K.	pH	Abs.
<i>L. paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> AK4-20	130.56 $\pm$ 9.43	68.77	189.70	31.18	5.17	0.864

Çizelge 4.13. Tanımlanamayan bakterilerin süpernatant, pelet ve kontroldeki kolesterol oranları ( $\mu\text{g/ml}$ ), % azalan kolesterol miktarı, 24 saatlik inkübasyon sonrası pH ve absorban değerleri

Laktik asit bakterisi	S	P	K	%A. K.	pH	Abs.
<b>AK4-19</b>	<b>99.45±26.71</b>	<b>90.12</b>	<b>205.84</b>	<b>51.69</b>	<b>4.30</b>	<b>2.241</b>
AK2-7	93.33±8.64	81.6	180.75	48.37	5.13	1.050
AC3-14	93.89±1.57	69.77	168.55	44.30	4.15	2.280
AK4-21	110.56±7.86	64.56	189.70	41.72	5.15	1.075
AB7-30	118.89±14.93	65.0	196.30	39.43	4.37	2.000
AA17-72	108.33±9.78	62.7	168.55	35.73	5.00	0.935
AC12-46	122.22±10.21	67.2	189.63	35.55	5.09	1.262
BK8-35	106.11±8.39	46.94	163.89	35.26	5.25	0.618
AB7-33	126.12±20.42	66.05	189.70	33.52	5.02	1.226
A21-105	145.00±3.14	53.25	205.84	29.56	5.19	0.676
AB16-77	86.11±8.19	55.51	121.67	29.23	4.11	2.157
AA2-3	146.11±23.57	60.23	205.84	29.02	5.30	0.520
AA13-56	143.34±24.36	54.65	196.30	26.98	5.23	0.702
AB16-67	143.33±7.07	38.3	180.75	20.70	5.26	0.800
AK2-8	157.78±10.21	44.4	189.70	16.83	5.20	0.491
BK8-36	161.11±7.07	38.7	189.70	15.07	5.23	0.635
AB5-17	153.89±12.57	26.99	180.75	14.86	5.08	1.150
AB16-68	128.89±5.50	20.5	143.49	10.17	4.54	1.612
AA13-51	184.45±11.79	29.44	196.30	6.04	5.13	0.710

Çizelge 4.12' de *L. paracasei* spp. *paracasei* AK4-20 bakterisinin kolesterol indirgeme oranı % 31.18 olduğu görülmektedir. Çizelge 4.13'te ise tanımlaması tam yapılamayan bakteriler oluşturmaktadır. Fenotipik özellikleri ile tanısı tam konamadığı için bu mikroorganizmaların genotipik tanımlarının yapılması gerekmektedir. Bunlar arasında AK4-19 bakterisinin kolesterol indirgeme oranı % 50 nin üzerinde olduğu için denemede kullanılmıştır. Ancak bu bakterinin kremada kolesterol indirgeme oranı % 40.93 olduğu ve sıvı besiyerindeki indirgemeye göre daha düşük olduğu görülmektedir.



Çizelge 4.14. Enterokok bakterilerin süpernatant, pelet ve kontroldeki kolesterol oranları ( $\mu\text{g/ml}$ ), % azalan kolesterol miktarı, 24 saatlik inkübasyon sonrası pH ve absorpsiyon değerleri

Laktik asit bakterisi	S	P	K	%A. K.	pH	Abs.
<b><i>E. faecalis</i> BC21-104</b>	<b>90.56±25.14</b>	<b>89.65</b>	<b>189.63</b>	<b>52.24</b>	<b>5.30</b>	<b>0.485</b>
<b>AC12-48</b>	<b>94.44±35.36</b>	<b>83.8</b>	<b>189.63</b>	<b>50.20</b>	<b>4.32</b>	<b>2.223</b>
<b><i>E. malodaratus</i> BK9-43</b>	<b>96.11±4.71</b>	<b>92.15</b>	<b>189.63</b>	<b>49.32</b>	<b>4.47</b>	<b>2.214</b>
<i>E. saccharolyticus</i> BK10-45	105.56±38.50	71.6	189.63	44.33	4.90	1.473
<i>E. saccharolyticus</i> AB6-24	93.89±25.14	70.5	168.55	44.30	5.10	1.080
<i>E. saccharolyticus</i> AC18-83	76.11±4.87	58.3	134.65	43.48	5.24	0.615
<i>E. saccharolyticus</i> AB6-22	79.44±5.69	47.5	134.65	41.00	5.09	1.012
BK11-49	79.44±6.89	50.89	134.65	41.00	4.86	0.839
<i>E. cecorum</i> AC3-15	115.56±7.07	60.56	189.63	39.06	4.65	1.806
<i>E. cecorum</i> AK4-180	121.67±22.00	58.34	189.70	35.86	5.03	0.892
<i>E. saccharolyticus</i> AK7-31	128.89±22.78	69.4	189.70	32.06	5.05	1.161
<i>E. malodaratus</i> BA15-62	92.78±12.24	36.1	134.65	31.10	5.03	0.783
<i>E. saccharolyticus</i> AK1-5	132.23±13.36	57.2	189.63	30.27	5.08	0.863
<i>E. saccharolyticus</i> AK6-25	134.44±7.07	65.7	189.63	29.10	5.01	0.748
<i>E. saccharolyticus</i> AC21-106	96.11±6.23	46.1	134.65	28.62	4.89	1.179
AC3-9	98.33±5.79	26.90	134.65	26.97	5.38	0.329
<i>E. saccharolyticus</i> BK12-52	139.45±9.43	68.3	189.63	26.46	4.57	1.724
<i>E. saccharolyticus</i> BK13-53	142.23±14.93	59.87	189.63	25.00	5.04	1.084
<i>E. faecalis</i> BB16-76	143.33±7.07	43.85	189.63	24.42	5.34	0.073
<i>E. saccharolyticus</i> BA17-70	144.45±8.64	57.2	189.63	23.83	5.06	0.947
<i>E. saccharolyticus</i> AK1-3	92.78±5.48	28.3	121.67	23.74	4.31	2.157
BB19-90	148.34±17.28	46.6	189.63	21.77	4.35	1.860
<i>E. faecalis</i> AB4-6	106.11±5.69	13.8	134.65	21.20	5.09	0.673
<i>E. saccharolyticus</i> BK10-46	145.00±6.29	34.4	180.75	19.78	5.04	1.060
<i>E. saccharolyticus</i> AB6-23	110.56±15.76	45.25	134.65	17.89	5.15	0.812
<i>E. saccharolyticus</i> BC18-78	112.78±3.67	18.3	134.65	16.24	5.06	1.234
<i>E. cecorum</i> AB7-29	112.78±4.87	37.2	134.65	16.24	4.56	0.690
<i>E. saccharolyticus</i> AB16-66	160.00±13.36	46.56	189.63	15.63	5.05	1.301
<i>E. faecalis</i> BB6-26	113.89±16.78	29.4	134.65	15.42	4.42	2.280
<i>E. saccharolyticus</i> BA15-63	116.11±15.45	12.7	134.65	13.77	5.06	1.349
<i>E. saccharolyticus</i> AA14-58	120.56±5.78	27.2	134.65	10.46	5.07	1.323
<i>E. saccharolyticus</i> BA17-71	121.67±4.69	23.8	134.65	9.64	5.01	1.310
<i>E. malodaratus</i> AK7-32	128.33±22.56	18.2	134.65	4.69	5.09	0.896

Çizelge 4.14'te. Enterokok bakterilerin kolesterol indirgeme oranları görülmektedir. *E. malodaratus* BK9-43, AC12-48, *E. faecalis* BC21-104 bakterileri % 50 ve civarında kolesterol asimilasyonu gösterdiği için kremada kolesterol indirgeme özelliğinin belirlenmesi için seçilmişlerdir. *E. malodaratus* BK9-43, AC12-48,

bakterilerinin pH' sı 4.47-4.32 iken *E. faecalis* BC21-104'ün pH değeri 5.30 olduğu tesbit edilmiştir. Kolesterol indirgeme mekanizmaları arasında tartışılan konulardan bir tanesi olan pH 5.5'un altında safra asitlerinin dekonjugasyonu ile kolesterol çökmesidir. Bu grup mikroorganizmalar arasında pH farklılığına rağmen yüksek oranda kolesterol indirgenmesinin mümkün olabileceğini göstermektedir.

Hosono ve Tono-oka (1995) laktik asit bakterilerinin farklı türleri ve suşlarının besiyerinden kolesterolü azaltmasındaki farklılıkların hücre duvarı peptidoglukanlarının kimyasal ve yapısal farklılıklarından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Peptidoglukanlar, bakteriyel hücre duvar yapısını oluşturan bileşenlerdendir ve suşlar arasında temel benzerlikleri olsada farklılıklar göstermektedirler. Bu konu ile ilgili çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Kültürlerin her birinin kolesterol azaltma oranları belirlendikten sonra %50 ve üzerinde kolesterolü azaltma özelliği bulunan laktobasil ve enterokoklar seçilmiş ve bunların asit ve safra toleransı incelenmiştir. Ayrıca bu kültürlerin safra tuzlarını besiyeri üzerinde dekonjuge etme özellikleri incelenmiştir. Bu kültürler *L. agilis* AC3-10, *L. agilis* AB7-35, *L. agilis* BK10-47, *L. maltaromicus* AC3-16, *L. maltaromicus* A21-101, *L. casei subsp. casei* AB16-65, *L. casei subsp. casei* BK10-48, *L. murinus* BB16-75, *L. intestinalis* AC18-85, *E. malodaratus* BK9-43, *E. faecalis* BC21-104, AK4-19, AC12-48'dir.

#### **4. 2. Kültürlerin Asit Toleransı**

İnsan ve hayvan bağırsak sisteminde bulunan laktik asit bakterilerinin ve bifidobakterilerin sağlık üzerine olumlu etkileri birçok çalışmada ortaya konmuştur. Bu bakteriler ile yapılan fermente süt ürünlerinin tüketiminin serum kolesterol seviyesini azalttığı yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Hipokolesterolemik etki mekanizmaları hakkında birbirinden farklı hipotezler bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi hidroksimetilglutaril koenzim A redüktazın inhibisyonu yolu ile olduğu şeklindedir. Diğeri ise Gilliland vd. (1985) tarafından *Lactobacillus acidophilus* bakterisinin direkt kolesterolü asimile etmesi yönündedir. Bir kısım araştırmacı ise ne laktobasillerin ne de bifidobakterlerin kolesterolü asimile edemediğini ancak safra

tuzları ile bir çökme meydana geldiğinden kolesterolün indirgenliğini ileri sürmüşlerdir. (Klaver ve van der Meer (1993). Bu bilgiler ışığında kolesterol asimilasyonunun sadece ürün üzerinde meydana gelen azalma olması yeterli görülmeyip kandaki sistem içinde gıdadan gelen kolesterolün adsorbsiyonunu azaltmak hedeflenmiştir. Bu amaçla bakterilerin kolesterol asimilasyonlarının yanı sıra safra tuzlarına dirençlilik ve asit toleransları incelenmiştir. Bakterilerin bağırsakta faaliyet gösterebilmeleri için midenin asit ortamından etkilenmeyip canlılıklarını devam ettirmeleri gerekmektedir. Bu nedenle kültürlerin asit toleranslarının belirlenmesi gerekmektedir.

Kolesterolü azaltma oranları belirlenen kültürlerden %50 ve üzerinde kolesterolü azaltma özelliği bulunan kültürler seçilmiş ve bunların asit ortama dirençlilikleri incelenmiştir. Ancak kolesterol asimilasyonu ile asit toleransı arasında bir ilişki bulunamamıştır ( $P > 0.005$ )

Çizelge 4.2.1.'de MRS sıvı besiyerinde iki kez aktiveştiriliş olan 18 saatlik taze kültürlerin pH değerleri görülmektedir. Çizelgede görüldüğü gibi pH değerleri 3.77–4.50 arasında değişmiştir.

Çizelge 4.2.1. Kültürlerin pH değerleri

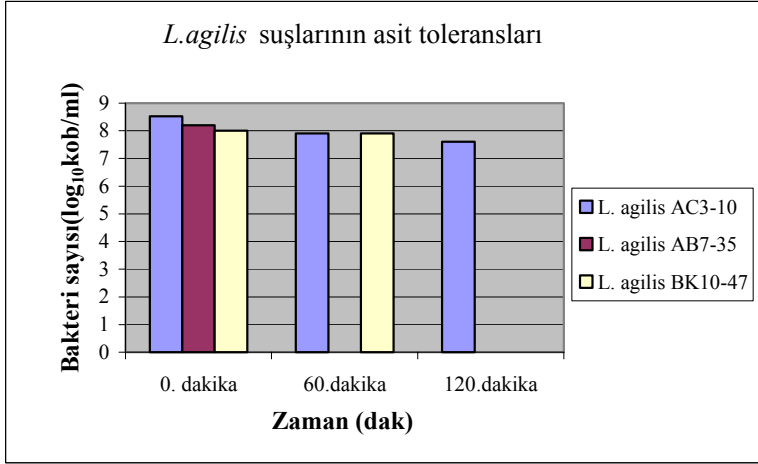
Kültürler	pH değerleri
<i>L. agilis</i> BK10-47	4.50
<i>E. faecalis</i> BC21-104	4.48
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> BK10-48	4.40
AC12-48	4.40
<i>L. intestinalis</i> AC18-85	4.39
<i>E. malodaratus</i> BK9-43	4.37
AK4-19	4.19
<i>L. murinus</i> BB16-75	4.18
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> AB16-65	3.87
<i>L. agilis</i> AC3-10	3.83
<i>L. maltaromicus</i> AC3-16	3.83
<i>L. maltaromicus</i> A21-101	3.82
<i>L. agilis</i> AB7-35	3.77

Çizelge 4.2.2.'de kültürlerin pH 2'ye ayarlanmış MRS sıvı besiyerinde 0. 60. ve 120. dakikalarda yapılan sayım sonuçları görülmektedir. *L. agilis* AC3-10 120 dakika süresince canlılığını sürdürürken *L. agilis* BK10-47 120.dakikada, *L. agilis* AB7-35 60.dakikada canlılıklarını yitirmiştir. *L. casei* subsp. *casei* AB16-65 120.dakikada *L. casei* subsp. *casei* BK10-48 ise 60.dakikada canlılığını yitirmiştir. *L. murinus* BB16-75, *L. intestinalis* AC18-85, *E. malodaratus* BK9-43, 120 dakika boyunca canlılıklarını sürdürmüşlerdir Aside dayanım özelliğinin suştan suşa farklılık gösterdiği Çizelge 4.2.2 ve Şekil 4.2.1 ve Şekil 4.2.2'de görülmektedir Vinderola ve Reinheimer (2003) pH 3'de 3 saat sonunda *L.casei* bakterilerinin 2.7-5.9 logaritmik birim azaldığını belirlemiştir. Bender ve Marquis (1987) yaptıkları çalışmada *L.casei* bakterisinin asite en fazla dayanıklı bakteri olduğunu ve pH 1,5 asitlikte canlılıklarını sürdürebildiğini belirtmişlerdir.

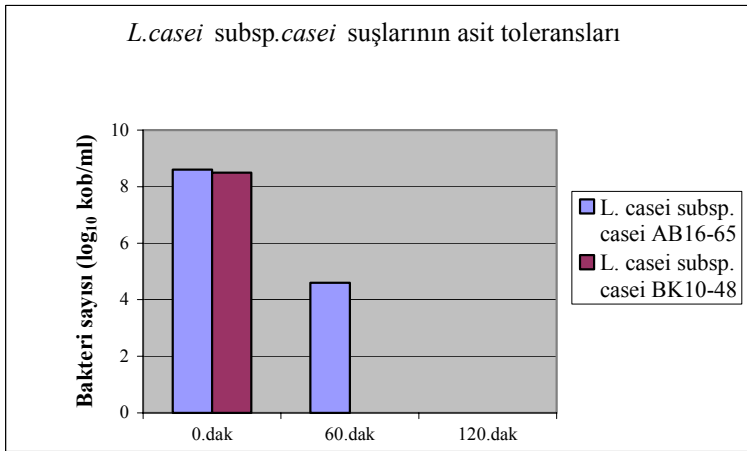
Çizelge 4.2.2. Bakterilerin pH 2 besiyerinde gelişme durumları (log<sub>10</sub>kob/ml)

Kültürler	0. dakika	60.dakika	120.dakika
<i>L. agilis</i> AC3-10	8.5692±0.242	7.9065±0.132	7.6679±0.044**
<i>L. agilis</i> AB7-35	8.2268±0.477	0	0*
<i>L. agilis</i> BK10-47	8.0117±0.297	7.9208±0.601**	0
<i>L. maltaromicus</i> AC3-16	8.1729±0.464	0	0*
<i>L. maltaromicus</i> A21-101	8.8055±0.056	0	0*
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> AB16-65	8.6249±0.144	4.6021±0.254**	0
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> BK10-48	8.5880±0.092	0	0*
<i>L. murinus</i> BB16-75	7.9327±0.042	7.5904±0.066	7.4710±0.103***
<i>L. intestinalis</i> AC18-85	8.6505±0.069	8.5373±0.197	7.8767±0.174**
<i>E. malodaratus</i> BK9-43	8.4582±0.276	3.9294±0.779	3.8239±0.704**
<i>E. faecalis</i> BC21-104	7.3513±0.125	0	0*
AK4-19	7.9173±0.117	7.7457±0.046	7.6276±0.036***
AC12-48	7.8412±0.106	0	0*

İstatistik açıdan \* p< 0.001, \*\* p< 0.05, \*\*\* p> 0.05



Şekil 4.2.1. *L. agilis* suşlarının asit toleransları



Şekil 4.2.2. *L. casei* subsp. *casei* suşlarının asit toleransları

Ağız yolu ile alınan bakterilerin bağırsağa ulaşmadan önce ağız boşluğundaki enzimlere daha sonra da 90 dakika süresince midenin asit ortamına (pH 1.5-pH 3.0) dayanıklı olmaları gerekmektedir. Chou ve Weimer (1999) *Lactobacillus acidophilus*'un 7 farklı suşunun pH 3.5'te 90 dakika süre ile canlılığını sürdürdüğünü MRS agar üzerinde yaptıkları sayımlar sonucu belirlemişlerdir. Lin ve Chen (2000), inceledikleri farklı *Lactobacillus acidophilus* suşlarının pH 2' de hemen hemen çoğunun canlılığını sürdüremediğini fakat pH 3'te bütün kültürlerin canlılığını sürdürebildiğini belirtmişlerdir.

Pereira ve Gibson (2002), ticari probiyotikler ve insan fecesinden izole edilen bakterilerin asit toleranslarını karşılaştırmışlardır. *L. fermentum* KC5b (izolasyon kaynağı: insan fecesi), *L. delbrueckii* JCM 1002 (kaynağı: Danone fermente süt içeceği) ve *Lactobacillus acidophilus johnsonii*' nin (kaynağı: Nestle fermente süt içeceği) pH 2'de 2 saat canlılıklarını srdrebilirlikleri ile asite en toleranslı suşlar olarak belirlemişlerdir. Ayrıca bunlar arasında *L casei* 60.dakika, *E. faecalis* 120 dakika, *L.casei* Shiota'nın ise 45 dakika pH 2'de canlılıklarını sürdürebildiklerini belirlemişlerdir.

### 4. 3. Kültürlerin Safra Toleransı

İnsan mide-bağırsak sistemine giren bakteriler midenin asit ortamından geçtikten sonra bağırsakta safra asitleri ve tuzları ile karşılaşırlar. Bu bakterilerin safra tuzu toleransları bu anlamda önemli olmaktadır. İncelenen 96 adet laktik asit bakterilerinden ve 33 adet enterekok bakterisinden kolesterol asimilasyonu yüksek olan suşlar arasından seçilen 13 adet mikroorganizmanın 3.2.3. belirtildiği şekilde optik yoğunluktaki değişim ve sayım yöntemleri kullanılarak safra tuzuna dayanım testleri yapılmıştır. Elde edilen verilere göre 12 adet mikroorganizma da sayının arttığı 1 tanesinde ise gelişme olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar asit koşullara dayanım testi ile kıyaslandığında aralarında bir ilişki olmadığı ( $p > 0.05$ ) tesbit edilmiştir. Ayrıca safra toleransı ile kolesterolün besiyerinden azaltılması karşılaştıırıldığında da önemli bir ilişki olmadığı belirlenmiştir ( $p > 0.05$ ).

Çizelge 4.3.1' de kültürlerin %0.3 safra tuzu içeren ve içermeyen MRS-THİO sıvı besiyerindeki 0.saat 3.saat ve 6.saatlerdeki safra toleransı absorbans değerleri, izelge 4.3.2' de MRS agar üzerinde gelişen kolonilerin sayım sonuçları görülmektedir. Safra içeren ve içermeyen besiyelerindeki 6. saatteki sayım sonuçları DUNCAN testi yapılarak önem derecesine göre harflerle tabloda gösterilmiştir. Safra tuzu içeren MRS-THİO besiyerinde 6 saat süresince bakteri gelişimleri arasındaki farklılık istatistik açıdan önemli bulunurken ( $p < 0.0001$ ) safra içermeyen MRS-THİO sıvı besiyerinde önemsiz ( $p > 0.05$ ) bulunmuştur. *L. agilis* AC3-10 suşu safra tuzunu en fazla tolere ederken, *L. agilis* BK10-47 suşu ise en az tolerans

gösteren bakteri olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.3.1 ve 4.3.2' de görüldüğü üzere safra tuzuna dayanıklılık açısından suşlar arasında farklılıklar bulunmaktadır. Gilliland ve Walker (1990) 12 adet *L. acidophilus* bakterisinin safra toleransını incelemiş kültürler arasında safra toleransı bakımından önemli farklılıklar tesbit etmiştir. Usman ve Hosono (1999) yaptıkları çalışmada *L. gasseri* bakterisinin suşları arasında safra tuzları toleransı bakımından farklılıklar olduğunu belirtmişlerdir.

Çizelge 4.3.1. Kültürlerin 0., 3., 6., saatlerde safra içeren ve içermeyen besiyerlerindeki absorbans değerleri

Kültürler	Absorbans (0.saat)		Absorbans (3.saat)		Absorbans (6.saat)	
	Safra içeren	Safra içermeyen	Safra içeren	Safra içermeyen	Safra içeren	Safra içermeyen
<i>L. agilis</i> AC3-10	0.014	0.053	0.238	0.348	1.030	1.880
<i>L. maltaromicus</i> AC3-16	0.066	0.032	0.180	0.159	1.001	1.510
<i>L. agilis</i> AB7-35	0.024	0.038	0.205	0.234	0.970	1.803
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> AB16-65	0.045	0.059	0.123	0.257	0.814	1.787
<i>L. murinus</i> BB16-75	0.001	0.036	0.078	0.216	0.168	1.349
<i>L. intestinalis</i> AC18-85	0.026	0.029	0.151	0.253	0.940	1.838
<i>L. maltaromicus</i> A21-101	0.074	0.055	0.220	0.328	1.129	1.796
AK4-19	0.052	0.042	0.087	0.297	0.447	1.699
<i>L. agilis</i> BK10-47	0.000	0.047	0.011	0.266	0.000	1.397
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> BK10-48	0.029	0.037	0.144	0.148	0.550	0.713
<i>E. malodaratus</i> BK9-43	0.031	0.030	0.060	0.203	0.302	1.331
AC12-48	0.030	0.011	0.036	0.072	0.279	0.786
<i>E. faecalis</i> BC21-104	0.005	0.001	0.019	0.027	0.049	0.188

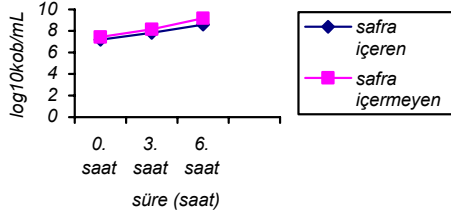
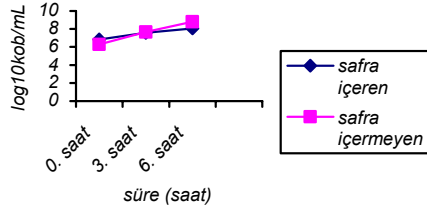
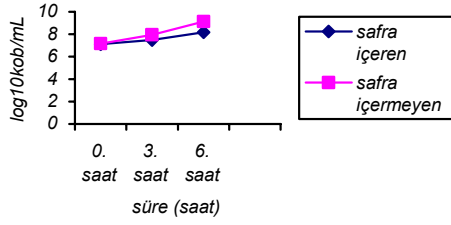
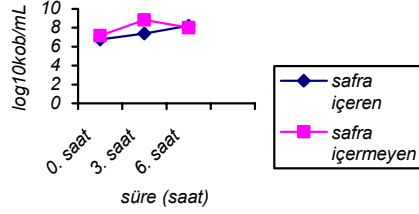
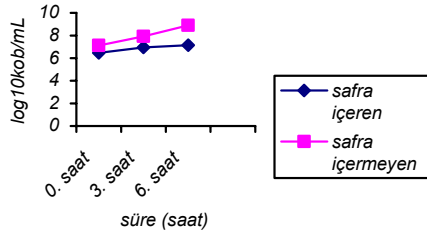
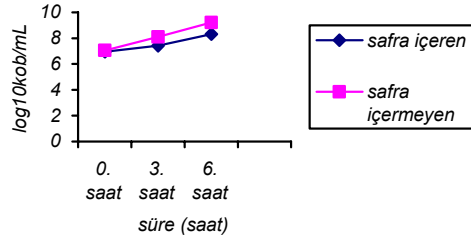
Çizelge 4.3.1 ve 4.3.1' de belirtildiği gibi safra tuzunun bulunduğu besiyerinde safra tuzu içermeyen besiyerine göre daha düşük gelişim izlenmiştir. Kültürlerin safra tuzu içeren besiyerinde gelişme hızlarındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli olmasada ( $p>0.05$ ) safra toleransları arasındaki farklılıklar önemli bulunmuştur ( $p<0.0001$ ). Perreira ve Gibson (2002) *L. casei* shirota ve *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 safra asitlerine %0.4 safırlı ortamda safırsız ortama göre daha düşük gelişme gösterdiğini belirtmiştir. Aynı araştırmacılar *L. delbrueckii* JCM1002, *Enterococcus gallinarum* ve *L. fermentum*'un F53 ve KC5B suşlarının gelişme hızında farklılıklar istatistiksel açıdan önemli olmasada safra asitlerine duyarlı bulmuşlardır.

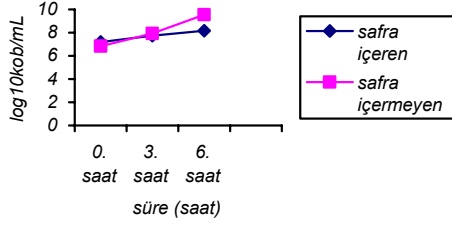
Çizelge 4.3.2 Kültürlerin 0., 3., 6., saatlerde safra içeren ve içermeyen besiyerlerindeki sayım sonuçları

Kültürler	log <sub>10</sub> kob/mL (0.saat)		log <sub>10</sub> kob/mL (3.saat)		log <sub>10</sub> kob/mL (6.saat)	
	Safra içeren	Safra içermeyen	Safra içeren	Safra içermeyen	Safra içeren	Safra içermeyen
<i>L. agilis</i> AC3-10	7.1903	7.4232	7.8129	8.1614	8.6021 <sup>a</sup>	9.1903 <sup>a</sup>
<i>L. maltaromicus</i> AC3-16	6.8451	6.3010	7.5623	7.6767	8.0607 <sup>a</sup>	8.8129 <sup>a</sup>
<i>L. agilis</i> AB7-35	7.1303	7.1614	7.4771	7.9542	8.1761 <sup>a</sup>	9.1461 <sup>a</sup>
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> AB16-65	6.7404	7.1614	7.3892	8.8420	8.2175 <sup>a</sup>	8.000 <sup>a</sup>
<i>L. murinus</i> BB16-75	6.4548	7.1303	6.9542	7.9294	7.1461 <sup>ab</sup>	8.9031 <sup>a</sup>
<i>L. intestinalis</i> AC18-85	6.9542	7.0607	7.4232	8.0969	8.3222 <sup>a</sup>	9.2175 <sup>a</sup>
<i>L. maltaromicus</i> A21-101	7.1903	6.8451	7.7404	7.9294	8.1761 <sup>a</sup>	9.5563 <sup>a</sup>
AK4-19	7.3979	7.0969	8.000	7.3979	7.9542 <sup>a</sup>	8.8751 <sup>a</sup>
<i>L. agilis</i> BK10-47	0.000	6.8451	0.000	7.8451	0.000 <sup>c</sup>	8.9294 <sup>a</sup>
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> BK10-48	6.4508	6.5436	7.1202	7.1456	7.9423 <sup>a</sup>	7.9956 <sup>a</sup>
<i>E. malodaratus</i> BK9-43	6.7404	6.8129	6.8129	7.4771	8.0792 <sup>a</sup>	8.4771 <sup>a</sup>
AC12-48	6.3010	6.2788	6.6021	7.1614	7.8751 <sup>ab</sup>	8.1761 <sup>a</sup>
<i>E. faecalis</i> BC21-104	5.7404	5.9294	6.0792	6.3617	6.000 <sup>b</sup>	7.6021 <sup>a</sup>

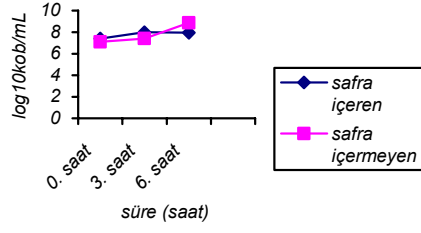
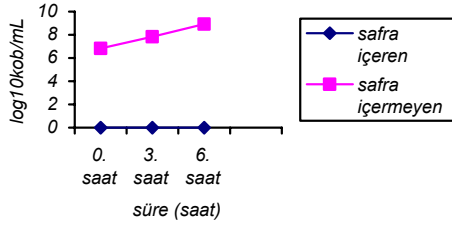
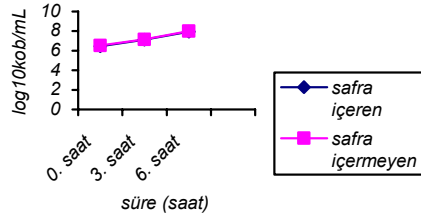
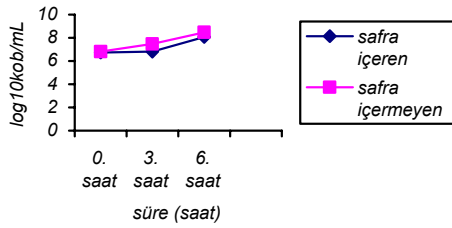
Şekil 4.3.1’de *L. agilis* AC3-10, Şekil 4.3.2’de *L. maltaromicus* AC3-16, Şekil 4.3.3’te *L. agilis* AB7-35, Şekil 4.3.4’te *L. casei* subsp. *casei* AB16-65, Şekil 4.3.5’te *L. murinus* BB16-75, Şekil 4.3.6’da *L. intestinalis* AC18-85, Şekil 4.3.7’de *L. maltaromicus* A21-101, Şekil 4.3.8’de AK4-19, Şekil 4.3.9.’da *L. agilis* BK10-47, Şekil 4.3.10’da *L. casei* subsp. *casei* BK10-48, Şekil 4.3.11’de *E. malodaratus* BK9-43, Şekil 4.3.12’de AC12-48, Şekil 4.3.13’te *E. faecalis* BC21-104 bakterilerinin 6 saat süresince safra içeren ve içermeyen ortamlardaki gelişme kurveleri görülmektedir.



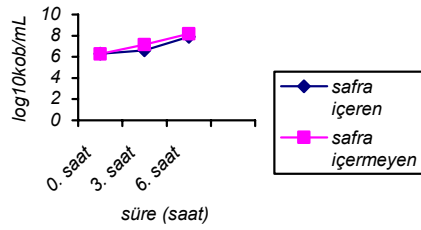
Şekil 4.3.1. *L. agilis* AC3-10Şekil 4.3.2. *L. maltaromicus* AC3-16Şekil 4.3.3. *L. agilis* AB7-35Şekil 4.3.4. *L. casei* subsp. *casei* AB16-65Şekil 4.3.5. *L. murinus* BB16-75Şekil 4.3.6. *L. intestinalis* AC18-85

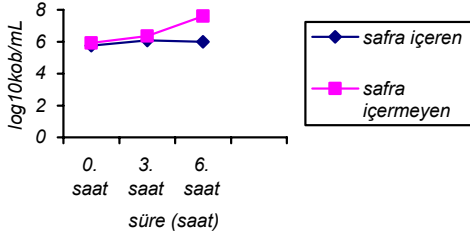
Şekil 4.3.7. *L. maltaromicus* A21-101

Şekil 4.3.8. AK4-19

Şekil 4.3.9. *L. agilis* BK10-47Şekil 4.3.10. *L. casei* subsp. *casei* BK10-48Şekil 4.3.11. *E. malodoratus* BK9-43

Şekil 4.3.12. AC12-48



Şekil 4.3.13. *E. faecalis* BC21-104

Tahri vd. (1997) değişik bifidobakter türlerinin safra tuzları ve değişik pH'lerdeki kolesterol asimilasyonunu incelemişler ve *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 suşunun kolesterolü %51 oranında asimile edebileceğini belirlemişlerdir.

**Açıklama [S1]:** Kolesterolle yaz.

Taranto vd. (1996) *Enterococcus faecium*'un kolesterolü azaltma, safraya dirençlilik ve safra tuzlarını dekonjuge etme özelliklerini inceledikleri çalışmada çoğu test edilen türün %0,3 oranında ki safra tuzuna dirençli olduğunu belirlemişlerdir.

#### 4. 4. Kültürlerin Safra Tuzlarını Dekonjuge Etme Özelliklerinin Belirlenmesi

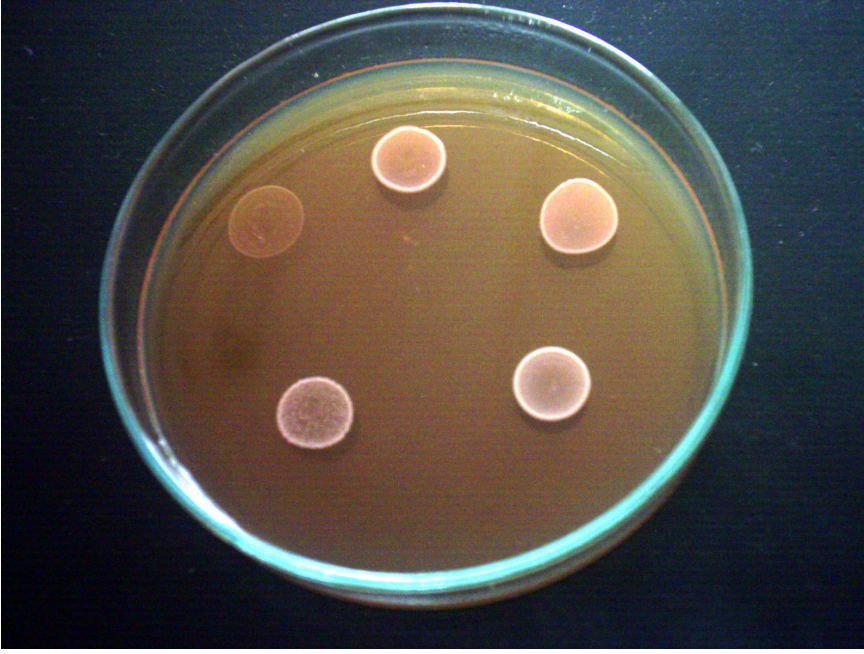
Dekonjuge safra asitleri bağırsak florası ile sekonder safra asitlerine dönüştüğü ve bunun da bağırsak kanseri riskini arttırdığı bilinmektedir. Bu nedenle bakteriler tarafından safra asitlerinin dekonjugasyonu serum kolesterol düzeyini düşürsede kanser riskini arttırdığı için istenen bir özellik değildir. Bu durumun tesbiti için probiyotik kültür seçiminde safra tuzu hidrolazının negatif olması gerekir (Sanders, 2000; Bongaerts vd., 2000).

Kültürlerin safra tuzlarını dekonjuge etme özellikleri 3.2.8' de belirtildiği gibi yapılmıştır. 72 saat inkübasyon sonrasında petri üzerinde opak görünüş meydana geldiği ancak zon oluşmadığı görülmüştür. Kültürlerin safra tuzu dekonjugasyonu opak görünüşün yanı sıra zon oluşumunu da gerektirir. Zon oluşumunun görülmemesi incelediğimiz suşların safra tuzlarını dekonjuge etmediği yönünde bir sonuca götürsede, dekonjugasyonun tesbiti için gerekli diğer analizlerin yapılması gereklidir. Çalışmanın daha sonraki aşamalarında bu analizlerin yapılması planlanmaktadır. İstatistiksel olarak kolesterol asimilasyonu, safra toleransı ve safra

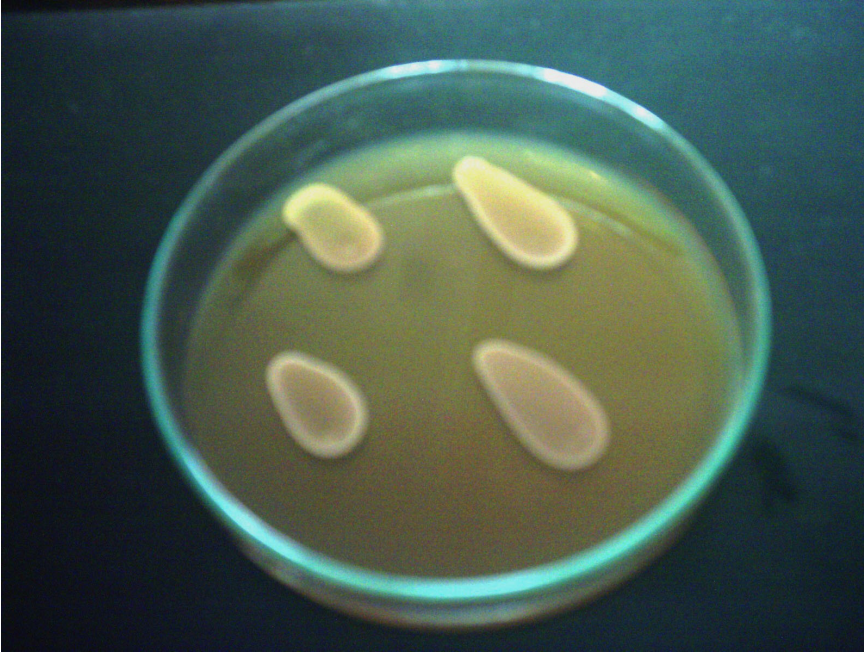
tuzlarının dekonjugasyonu karşılaştırıldığında aralarında önemli bir ilişki olmadığı belirlenmiştir ( $p>0.05$ ). Şekil 4.4.1 ve Şekil 4.4.2’de taurokolik asitin (TCA) sodyum tuzunu içeren, Şekil 4.4.3 ve Şekil 4.4.4.’ te glikokolik asitin (GCA) sodyum tuzunu içeren MRS agar üzerinde gelişen bakterilere ait koloniler görülmektedir.

Birçok araştırmacı *Lactobacillus acidophilus*’un safra asitlerini dekonjuge etme özelliklerini incelemişlerdir (Walker vd.,1993;Usman vd.,1999). Safra asitlerinin dekonjugasyonu serum kolesterol konsantrasyonunun kontrolünde önemlidir çünkü dekonjuge safra asitleri gerek çözünürlük gerekse lipidlerin absorpsiyonunda konjuge safra asitleri kadar fonksiyona sahip değildirler. Chikai vd. bağırsak mikroorganizmaları ile inoküle edilmiş farelerin fecesinde safra asit atımının yüksek olduğunu ve bu safra asitlerinin dekonjuge formda olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca Chikai vd. diyetel liflere veya bakteriye bağlı olan serbest safra asitlerinde safra asit salgısını arttırdığını belirtmiştir. Bu hareket karaciğerdeki kolesterol sentez mekanizmasını dolayısıyla safra asit oluşumunu düzenlemekte ve bu da serum kolesterol konsantrasyonunu düşürebilmektedir (Walker vd.1993).

Birçok araştırmacı safra tuzları dekojugasyonu ve pH ilişkisi üzerinde çalışmış, pH düştüğü zaman kolesterol misellerinin yapısında değişme meydana gelerek serbest safra tuzları ile kolesterolde çökme oluştuğunu belirtmişlerdir. Kolesterolün dekonjuge safra ile birlikte çökmesi in vitro ortamda oluşsa da in vivo da ince bağırsakta pH nın nötrden daha yüksek olması nedeniyle gerçekleşmediği belirtilmiştir (Walker ve Gilliland 1993, Tahri vd., 1996, Brashears vd 1998,).

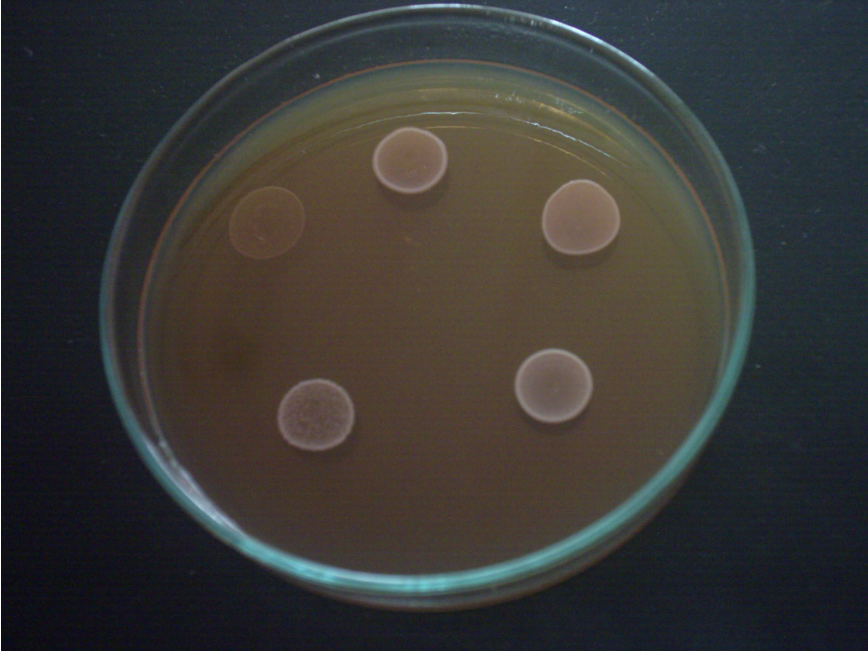


Şekil 4.4.1. Taurokolik asitin (TCA) sodyum tuzunu içeren MRS agar üzerinde gelişen koloniler



Şekil 4.4.2. Taurokolik asitin (TCA) sodyum tuzunu içeren MRS agar üzerinde gelişen koloniler





Şekil 4.4.3. Glikolik asitin (TCA) sodyum tuzunu içeren MRS agar üzerinde gelişen koloniler



Şekil 4.4.4. Glikolik asitin (TCA) sodyum tuzunu içeren MRS agar üzerinde gelişen koloniler

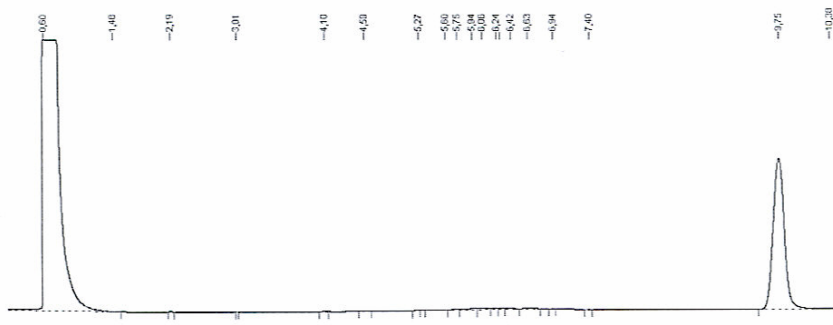
#### 4. 5. Kùltürlerin Kremada Kolesterol Azaltması

Kolesterol sterollerin ana maddesi olup yağ globüllerinin membranında yer alır. Süt ürünlerinde kolesterol miktarı yağ içeriği ile yakından ilişkilidir. Babuchowski sütteki ortalama kolesterol içeriğini 13mg/100ml, Jensen ise sütteki ortalama kolesterol içeriğini 308-606 mg/100g yağ olarak belirtmiştir (Juskiewicz ve Panfil-Kuncewicz, 2003). Yağdaki kolesterol içeriği mevsimlere göre de değışiklik göstermektedir. Bindal ve Jain inek sütlerinden yapılan sade yağın kolesterol içeriğinin ilkbaharda 465.5mg/100g yazın ise 428.4mg/100g olarak belirlemişlerdir (Precht, 2001). % 15 yağ içeren kremada kolesterol miktarı ve denemede kullanılan kùltürlerin kolesterol asimilasyonu 3.2.9.1 de belirtildiği şekilde GC kullanılarak yapılmıştır. Şekil 4.5.1. Kolesterol standardına ait kromatogram ve Şekil 4.5.2. *L. agilis* AC3-10 bakterisinin kremadaki inkübasyonu sonrasında kremadaki kolesterol miktarını gösteren kromatogramdır. 24 saat inkübasyon sonunda kolesterol azaltma miktarları ve gelişen pH değerleri Çizelge 4.5.1.'de verilmiştir. Çizelge de görüldüğü üzere pH 3.76-4.38 arasında değışmiştir. En fazla kolesterol indirgeyen mikroorganizma *L. maltaromicus* AC3-16 ile *L. maltaromicus* A21-101'dir. En düşük indirgeme ise *L. casei* subsp. *casei* BK10-48 ve *E. malodaratus* BK9-43 bakterilerinde tesbit edilmiştir. Kremada asit gelişimi ile kolesterol indirgemesi arasında bir ilişki bulunamamıştır (p>0.05).

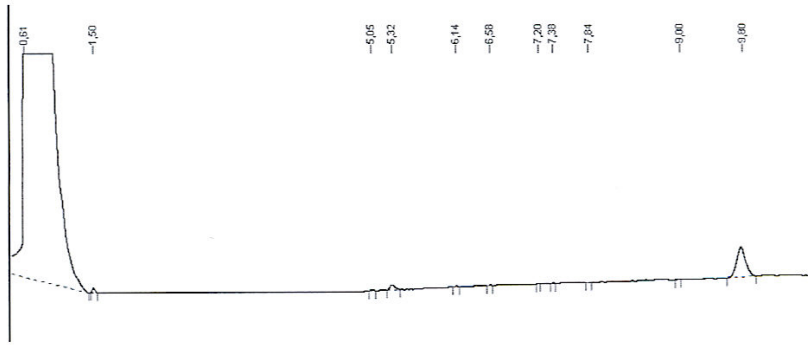
Çizelge 4.5.1. Bakterilerin %15 yağlı kremada kolesterolü azaltma miktarları ve pH değerleri

Laktik Asit Bakterisi	Kolesterol miktarı (mg/100g)	pH değerleri	% kolesterol azalma miktarı
KONTROL	470.363±0.2832	6.40	
<b><i>L. maltaromicus</i> AC3-16</b>	<b>189.186±0.3221</b>	<b>3.76</b>	<b>59.78</b>
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> BK10-48	373.375±0.01	4.36	20.62
<i>L. murinus</i> BB16-75	256.538±0.148	4.05	45.46
<i>E. faecalis</i> BC21-104	264.788±0.2449	4.38	43.71
<i>L. agilis</i> AC3-10	265.825±0.1058	3.99	43.49
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> AB16-65	270.838±0.0414	3.84	42.42
AK4-19	277.850±0.0864	3.85	40.93
<i>L. intestinalis</i> AC18-85	275.662±0.2109	4.00	41.40
<b><i>L. maltaromicus</i> A21-101</b>	<b>189.800±0.0467</b>	<b>4.36</b>	<b>59.65</b>
<i>L. agilis</i> AB7-35	317.388±0.1394	3.81	32.52
AC12-48	318.250±0.2498	4.06	32.34
<i>E. malodaratus</i> BK9-43	368.975±0.2968	4.18	21.56
<i>L. agilis</i> BK10-47	272.525±0.0571	4.03	42.06

Bu konuda yapılan çalışmalarda genellikle hayvan denemeleri mevcut olup ürün üzerinde yapılmış çalışma bulunmamaktadır. Akalın vd. (1997) farelerde yaptıkları çalışmada normal yoğurt ve asidofiluslu yoğurdun, toplam serum kolesterolü, triasilgliserol ve lipoprotein konsantrasyonlarına etkisini incelemişlerdir. Bunlar fareleri yiyeceklerine ilave olarak su (kontrol grubu), yoğurt (yoğurt grubu) ya da asidofiluslu yoğurt (AY grubu) ile 56 gün boyunca beslenmişlerdir. *L. acidophilus*' un *L. bulgaricus*' a göre fare bağırsak sisteminde daha uzun süre canlı kaldığını böylece asidofiluslu yoğurdun, yoğurda göre serum kolesterol konsantrasyonunu düşürmede daha etkili olduğunu göstermiştir. Yapılan başka bir çalışmada *S. salivarius* ssp. *thermophilus*, *L. delbruecki* ssp. *bulgaricus*, *L. acidophilus* süşunun tavşanlar üzerindeki etkilerine bakılmış 60 gün içinde kolesterol seviyelerinde % 14.33 mg azalma meydana geldiği tesbit edilmiştir. (Juskiewicz ve Panfil-Kunciewicz, 2003)



Şekil 4.5.1. Kolesterol standardına ait kromatogram



Şekil 4.5.2. *L. agilis* AC3-10 bakterisinin kremadaki inkübasyonu sonrasında kremadaki kolesterol miktarını gösteren kromatogram



## 5. SONUÇ

Kalp damar hastalıkları ile beslenme arasındaki ilişki ortaya konulduktan sonra kolesterolü azaltılmış gıdalara talep artmıştır. Bu bağlamda çeşitli yöntemlerle gıdalardan kolesterolün azaltılması ile ilgili çalışmalar yapılmaya başlamıştır. Yapılan çalışmalar kimyasal ve fiziksel metodlar kullanılarak yapılmış, ancak biyolojik yolla kolesterol azaltılması yönünde bir çalışma rastlanmamıştır. Kimyasal olarak  $\beta$ -siklodekstrin uygulaması ile kolesterol azaltılması yönünde birçok çalışma bulunmaktadır. Ancak  $\beta$ -siklodekstrin pahalı bir madde olduğu için ürüne ek maliyet getirecektir. Fiziksel metodlarla yapılan uygulamalarda ise ürün aromasında kayıp meydana geldiği için tercih edilmemektedir. Biyolojik yolla kolesterol azaltılması ek bir maliyet getirmediği gibi ürünün tat, koku ve tekstürü üzerine olumlu etkisi olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada probiyotik olma özellikleri önceden belirlenmiş bakterilerin kolesterolü azaltma özellikleri incelenmiştir. Bundan sonra kolesterol azaltma özelliği olan suşların üretimde kullanılma olanakları araştırılacaktır. Kremada yüksek oranda kolesterol indirgeyen kültürler *L.maltaramicus*'un iki suşudur. Bu kültür süt starter bakterileri içinde yer almamaktadır, ancak yapılacak çalışmalarla bu bakterilerin kullanılabilme olanakları araştırılacaktır.

**KAYNAKLAR**

- Ahn, J., Kwak, H. S., 1999. Optimizing Cholesterol Removal in Cream Using  $\beta$ -Cyclodextrin and Response Surface Methodology. *Journal of Food Science*, 64(4), 629-632.
- Ahn, Y. T., Kim, G. B., Lim, K. S., Baek, Y. J., Kim, H. U., 2003. Deconjugation of Bile Salts by *Lactobacillus acidophilus* isolates. *International Dairy Journal*, 13, 303-311.
- Akalın, A. S., Gönç, S., Düzel, S., 1997. Influence of Yogurt and Acidophilus Yogurt on Serum Cholesterol Levels in Mice. *J. Dairy Sci.*,80, 2721-2725.
- Anar, Ş., 1998. Kolesterol Nedir? Dünya Gıda Dergisi, Eylül.
- Anderson, J. W., Gilliland, S. E., 1999. Effect of Fermented Milk (Yogurt) Containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on Serum Cholesterol in Hypercholesterolemic Humans. *Journal of the American College of Nutrition*, 18(1), 43-50.
- Başığit, G., 2004. Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Olarak Kullanılma Özellikleri. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi (Yayınlanmamış), Isparta.
- Bateup, J. M., McConnell, M. A., Jenkinson, H. F., Tannock, G. W., 1995. Comparison of *Lactobacillus* Strains with Respect to Bile Salt Hydrolase Activity, Colonization of the Gastrointestinal Tract, and Growth Rate of the Murine Host. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3), 1147-1149.
- Beena, A., Prasad, V., 1997. Effect of Yogurt and Bifidus Yogurt Fortified with Skim Milk Powder, Condensed Whey and Lactose- Hydrolysed Condensed Whey on Serum Cholesterol and Triacylglycerol Levels in Rats. *Journal of Dairy Research*, 64,453-457.

- Bender, G. R., Marquis R. E. 1987. Membrane ATPases and Acid Tolerance of *Actinomyces viscosus* and *Lactobacillus casei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (9), 2124-2128.
- Bongaerts, G. P. A., Severijnen, R. S. V. M., Tangerman, A., Verrips, A., Tolboom, J. M., 2000. Bile Acid Deconjugation by *Lactobacilli* and Its Effects in Patients with a Short Small Bowel. *Journal of Gastroenterology*, 35, 801-804.
- Bradley, R. L., 1989. Removing Cholesterol from Milkfat Using Supercritical Carbon Dioxide, Department of Food Science, University of Wisconsin, Madison.
- Brashears, M. M., Gilliland, S. E., 1997. Influence of pH During Growth on Removal of Cholesterol from MRS Broth by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. Oklahoma State University Research Report.
- Brashears, M. M., Gilliland, S. E., Buck, L. M., 1998. Bile Salt Deconjugation and Cholesterol Removal from Media by *Lactobacillus casei*. *J. Dairy Sci.*, 81, 2103-2110.
- Buck, L. M., Gilliland, S. E., 1994. Comparison of Freshly Isolated Strains of *Lactobacillus acidophilus* of Human Intestinal Origin for Ability to Assimilate Cholesterol During Growth. *J. Dairy Sci.*, 77, 2925-2933.
- Chou, L. S., Weimer, B., 1999. Isolation and Characterization of Acid- and Bile-Tolerant Isolates from Strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.*, 82, 23-31.
- Corzo, G., Gilliland, S. E., 1999. Bile Salt Hydrolase Activity of Three Strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.*, 82, 472-480.

- Corzo, G., Gilliland, S. E., 1999. Measurement of Bile Salt Hydrolase Activity from *Lactobacillus acidophilus* Based on Disappearance of Conjugated Bile Salts. J. Dairy Sci., 82, 466-471.
- Çakır, İ., 1996. Et Tavuklarının K rbarsak Florasında Yer Alan Laktobasillerin Proteolitik Aktiviteleri ve Organik Asit Oluşturma Yeteneklerinin Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi (Yayınlanmamış), Ankara.
- Dambekodi, P. C., Gilliland, S. E., 1998. Incorporation of Cholesterol into the Membrane of *Bifidobacterium longum*. J. Dairy Sci., 81, 1818-1824.
- Demirci, M., G ldaş, M., Başoğlu, F., 1996. Gıdalardan Kolesterol Azaltılabilir Mi? Gıda Dergisi, 21(3), 149-152.
- Fleutouris, D. J., Botsoglou, N. A., Psomas, I. E., Mantis, A. I., 1998. Rapid Determination of Cholesterol in Milk and Milk Products by Direct Saponification and Capillary Gas Chromatography. J. Dairy Sci., 81: 2833-2840.
- Gilliland, S. E., 1985. Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. Applied and Environmental Microbiology, 49(2), 377-381.
- Gilliland, S. E., Walker, D. K., 1990. Factors to Consider When Selecting a Culture of *Lactobacillus Acidophilus* as a Dietary Adjunct to Produce a Hypocholesterolemic Effects in Humans. Journal of Dairy Science, 73, 905-911.
- Golay, A., Ferrara, J. M., Felber, J. P., Schneider, H., 1990. Cholesterol-lowering Effect of Skim Milk from Immunized Cows in Hypercholesterolemic Patients. Am. J.Clin. Nutr., 52, 1014-1019.

- Gönç, S., Akalın, A. S., Kılıç, S., 1996. Fermente Süt Mamülleri ve Kolesterol Arasındaki İlişkiye Ait Bir Değerlendirme. *Gıda Dergisi*, 21(2), 89-94.
- Grill, J. P., Cayuela, C., Antoine, J. M. Schneider, F., 2000. Effects of *Lactobacillus amylovorus* and *Bifidobacterium breve* on Cholesterol. *Letters in Applied Microbiology*, 31, 154-156.
- Erkkilä, S., Petäjä, E., 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science*, 55,297-300.
- Hosono, A., Tono-oka, T., 1995. Binding of Cholesterol with Lactic Acid Bacterial Cells. *Milchwissenschaft*, 50(10), 556-560.
- Juskiewicz, M., Panfil-Kuncewicz, H. 2003. Reduction of Cholesterol Content in Milk with Dairy Thermophilic Cultures Application. *Milchwissenschaft*,58(7/8), 370-373.
- Kimoto, H. Ohmomo, S., Okamoto, T., 2002. Cholesterol Removal from Media by Lactococci. *J. Dairy Sci.*, 85, 3182-3188.
- Klaver, F. A., Van Der Meer, R., 1993. The Assumed Assimilation of Cholesterol by Lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is Due to Their Bile Salt-Deconjugating Activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4), 1120-1124.
- Kramer, J.R., 2002. [http://www.heartcenteronline.com/myheartdr/co.../artprn\\_rev.tm?title=&ARTID=3](http://www.heartcenteronline.com/myheartdr/co.../artprn_rev.tm?title=&ARTID=3)
- Lin, M. Y., Chen, T. W., 2000. Reduction of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* in Culture Broth. *Journal of Food and Drug Analysis*, 8(2), 97-102.

- Manero, A., Blanch, R. A., 1999. Identification of *Enterococcus* spp. with a Biochemical Key. Applied and Environmental Microbiology, 65 (10),4425-4430.
- Manohar, B., Basappa, C., Rao, D. N., Divakar, S., 1998. Response Surface Studies on Cholesterol Reduction in Egg Yolk Using  $\beta$ -Cyclodextrin. Z. Lebensm. Unters. Forsch. A., 206, 189-192.
- McNamara, D. J., 1991. American Meat Science Association, 44th Reciprocal Meat Conference proceedings, Diet and Health Issues, 44, 147-152.
- Metin, M., 1998. Süt Teknolojisi Sütün Bileşimi ve İşlenmesi. E. Ü. Mühendislik Fakültesi Yayınları No:33, 793s. Isparta.
- Mohamed, R. S., Saldaña, M. D. A., Socantaype, F. H., Kieckbusch, T. G., 2000. Reduction in the Cholesterol Content of Butter Oil Using Supercritical Ethane Extraction and Adsorption on Alumina. Journal of Supercritical Fluids, 16, 225-233.
- Nakajima, H., Suzuki, Y., Hirota, T., 1992. Cholesterol-lowering Activity of Ropy Fermented Milk. J. Food Sci., 57, 1327-1329.
- Noh, D. O., Kim, S. H., Gilliland, S. E., 1997. Incorporation of Cholesterol into the Cellular Membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. J. Dairy Sci., 80, 3107-3113.
- Oakenfull, D. G., Pearce, R. J., Sidhu, G. S., 1991. Low Cholesterol Dairy Products. The Australian Journal of Dairy Technology, 46(2), 110-112.
- Öner, Z., 2004. Süt ve Süt Ürünler ile Alınan Kolesterol ve Kolesterol Sentezi. Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 8(1), 38-40.

- Pekyardımcı, Ş., 1991. Süperkritik Akışkanlar Teknolojisi. Gıda Dergisi, 16(6), 407-411.
- Pereira, D. I. A., Gibson, G. R., 2002. Cholesterol Assimilation by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Isolated from the Human Gut. Applied and Environmental Microbiology, 68(9),4689-4693.
- Pigeon, R. M., Cuesta, E. P., Gilliland, S. E.,2002. Binding of Free Bile Acids by Cells of Yogurt Starter Culture Bacteria. J. Dairy Sci., 85,2705-2710.
- Prasad, J., Gill, H., Smart, J., Gopal, P. K., 1999. Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotic. Int. Dairy Journal, 8, 993-1002.
- Precht, D., 2001. Cholesterol Content in European Bovine Milk Fats. Nahrung/Food, 45 (1), 2-8.
- Psomas, E. I., Fletouris, D. J., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetaki, N., 2003. Assimilation of Cholesterol by Yeast Strains Isolated from Infant Feces and Feta Cheese. J. Dairy Sci., 86, 3416-3422.
- Sanders, M. E., 2000. Consideration for Use of Probiotic Bacteria to Modulate Human Health. Journal of Nutrition, 130, 384-390.
- Seçkin, A. K., Metin, M., 2003. Kimyasal Yolla Sütten Kolesterolün Uzaklaştırılması. Gıda Mühendisliği Dergisi, Mayıs, Yıl:7, Sayı:14, 36-40.
- Sharpe, S. J., Gamble, G. D., Sharpe, D. N., 1994. Cholesterol-lowering and Blood Pressure Effects of Immune Milk. Am. J.Clin. Nutr., 59, 929-934.
- Smith, J., 1993. Technology of Reduced-Additive Foods. Blackie Academic&Professional.

- St-Onge, M. P., Farnworth, E. R., Jones, P. J. H., 2000. Consumption of Fermented and Nonfermented Dairy Products: Effects on Cholesterol Concentration and Metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71, 674-681.
- Tahri, K., Grill, J.P., Schneider, F., 1996. Bifidobacteria Strain Behavior Toward Cholesterol: Coprecipitation with Bile Salts and Assimilation. *Current Microbiology*, 33,187-193.
- Tahri, K., Grill, J.P., Schneider, F., 1997. Involvement of Trihydroxyconjugated Bile Salts in Cholesterol Assimilation by Bifidobacteria. *Current Microbiology*, 34, 79-84.
- Tanaka, H., Doesburg, T., Iwasaki, T., Merau, I., 1999. Screening of Lactic Acid Bacteria for Bile Salt Hydrolase Activity. *Journal of Dairy Science*, 82, 2530-2535.
- Taranto, M. P., Gonzalez De Llano, D., Ronriguez, A., Ruiz Holgado, A. P., Valdez, G. F., 1996. Bile Tolerance and Cholesterol Reduction by *Enterococcus faecium*, a Candidate Microorganism for the Use as a Dietary Adjunct in Milk Products. *Milchwissenschaft*, 51(7), 383-385.
- Taranto, M. P., Medici, M., Perdigon, G., Ruiz Holgado., A. P., Valdez, G. F., 1998. Evidence for Hypocholesterolemic Effect of *Lactobacillus reuteri* in Hypercholesterolemic Mice. *J. Dairy Sci.*,81, 2336-2340.
- Tokullugil, A., Dirican, M., Ulukaya, E., 1997. *Biyokimya*. 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul.
- Urkun, T., 1998. Kolesterolu Azaltılmış Tereyağı ve Bazı Özelliklerinin Araştırılması. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Süt Teknolojisi Anabilim Dalı, Doktora Tezi (Yayınlanmamış), İzmir.



- Usman, Hosono, A., 1999. Bile Tolerance, Taurocholate Deconjugation, and Binding of Cholesterol by *Lactobacillus gasseri* Strains. *J. Dairy Sci.*, 82, 243-248.
- Usman, Hosono, A., 1999. Viability of *Lactobacillus gasseri* and Its Cholesterol-Binding and Antimutagenic Activities During Subsequent Refrigerated Storage in Nonfermented Milk. *J. Dairy Sci.*, 82, 2536-2542.
- Vance, D. E., Van den Bosch, H., 2000. Cholesterol in the Year 2000. *Biochimica et Biophysica Acta* 1529, 1-8.
- Vinderola, C. G., Reinheimer, J. A., 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria a comparative 'in vitro' study of probiotic characteristic and biological barrier resistance. *Food Research International*. 36, 895-904.
- Voet, D., Voet, J. G., 1995. *Biochemistry*. John Wiley and Sons. America, 1361s.
- Walker, D. K., Gilliland, S. E., 1993. Relationships Among Bile Tolerance, Bile Salt Deconjugation, and Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.*, 76, 956-961.
- Xanthopoulos, V., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N., 2000. Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant feces as dietary adjuncts. *Food Microbiology*, 17, 205-215.
- Yen, G. C., Chen, C. J., 2000. Effects of Fractionation and the Refining Process of Lard on Cholesterol Removal by  $\beta$ -Cyclodextrin. *Journal of Food Science*, 65(4), 622-624.
- Yen, G. C., Tsi, L. J., 1995. Cholesterol Removal from a Lard-water Mixture with  $\beta$ -Cyclodextrin. *Journal of Food Science*, 60(3), 561-564.

**ÖZGEÇMİŞ**

Adı-Soyadı : Hatice ALOĞLU  
Doğum Yeri : Vize  
Doğum Tarihi : 05/05/1979  
Medeni Hali : Evli

***Eğitim ve Akademik Durumu***

Lise : 1994-1997  
Lisans : 1997-2001

Yabancı Dil : İngilizce

İş Deneyimi :

2001-2005 Araştırma Görevlisi (S.D.Ü. Ziraat Fakültesi, Gıda Müh. Bölümü)

