

***LACTOBACILLUS* VE *BIFIDOBACTERIUM* CİNSİ BAKTERİLERİN  
BETA-GLUKOZİDAZ ENZİM AKTİVİTESİ VE İZOFLAVON  
HİDROLİZİ**

**Berat ÇINAR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HAZİRAN 2012  
ANKARA**

Berat ÇINAR tarafından hazırlanan “*LACTOBACILLUS VE BIFIDOBACTERIUM* CİNSİ BAKTERİLERİN BETA GLUKOZİDAZ ENZİM AKTİVİTESİ VE İZOFLAVON HİDROLİZİ” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ .....  
Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

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

Prof. Dr. Yavuz BEYATLI .....  
Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ .....  
Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Miraç YILMAZ .....  
Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı

Tarih: 19 /06/ 2012

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

Prof. Dr. Bilal TOKLU .....  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## **TEZ BİLDİRİMİ**

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

Berat ÇINAR

**LACTOBACILLUS VE BIFIDOBACTERIUM CİNSİ BAKTERİLERİN  
BETA-GLUKOZİDAZ ENZİM AKTİVİTESİ VE İZOFLAVON  
HİDROLİZİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Berat ÇINAR**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HAZİRAN 2012**

**ÖZET**

Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan insan, gıda ve hayvan kaynaklı olmak üzere 39 adet *Lactobacillus* cinsine ait ve yenidoğan gaitasından izole edilmiş olan 3 adet *Bifidobacterium* cinsine ait toplam 42 adet bakteri kullanılmıştır. p-nitrofenil-β-D glikopiranozit (p-NPG) substrat olarak kullanılarak, kültürlerin β-glukozidaz enzim aktiviteleri belirlenmiştir. *Lactobacillus* cinsine ait kültürlerden *Lactobacillus rhamnosus* BAZ78 (4,500±0,002 U/mg), *Lactobacillus rhamnosus* SMP6-5 (2,670±0,001 U/mg), *Lactobacillus casei* LB65 (3,000±0,001 U/mg) ve *Lactobacillus casei* LE4 (2,000±0,001 U/mg) suşlarının, *Bifidobacterium* cinsine ait kültürlerden de *Bifidobacterium breve* A28 (2,670±0,000 U/mg) ve *Bifidobacterium longum* BASO15 (2,330±0,000 U/mg) suşlarının en yüksek spesifik enzim aktivitesi yeteneğine sahip oldukları belirlenmiştir. Yüksek spesifik β-glukozidaz enzim aktivitesi gösterdiği belirlenen kültürlerde farklı pH, sıcaklık, tampon ve besiortamlarının enzim aktivitesi üzerinde etkisinin belirlenmesi ile, optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Kültürlerin pH 7,5'te en yüksek (*Lactobacillus rhamnosus* BAZ78, 4,500±0,002 U/mg), pH 4,0'da en düşük (*Bifidobacterium breve* A28, 0,750±0,000 U/mg) spesifik enzim aktivitesi

yeteneğine sahip oldukları gözlenmiştir. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek için, p-nitrofenil-β-D-glukopiranozit (p-NPG) içeren karışım 30°C, 37°C, 40°C, 50°C ve 60°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Kültürlerin inkübasyon sıcaklıklarına yakın değerlerde yüksek enzim aktivitesi gösterdikleri tespit edilmiştir. Suşların farklı besiortamlarında geliştirilmesi durumunda, en yüksek enzim aktivitesini %2 fruktoz içeren besiortamında *Lactobacillus casei* LB65 (6,800±0,001 U/mg) suşu gösterirken, en düşük enzim aktivitesini %2 sellobiyoz içeren besiortamında *Lactobacillus casei* LB65 (0,460±0,002 U/mg) suşunun gösterdiği tespit edilmiştir. *Bifidobacterium* cinsi bakteriler de ise en yüksek spesifik enzim aktivitesi TPY besiortamında (*Bifidobacterium breve* A28, 2,670±0,000 U/mg) belirlenirken, en düşük spesifik enzim aktivitesi MMRSC besiortamında (*Bifidobacterium longum* BASO15, 0,720±0,001 U/mg) tespit edilmiştir. Potansiyel probiyotik suşlar olarak düşünülen kültürlerin, mide-bağırsak sistemindeki olumsuz koşullarda (asit, safra tuzları) canlılığını koruyarak, yüksek β-glukozidaz aktivite gösterebilme yeteneklerini belirlemiştir. Yapay mide suyunda, pH 7,0’da *Lactobacillus casei* LB65 suşu 2,200±0,05 U/mg ile en yüksek, *Lactobacillus rhamnosus* BAZ78 suşu ise 0,630±0,000 U/mg ile pH 2,0’da en düşük spesifik enzim aktivitesine sahip oldukları belirlenmiştir. pH 8,0’de 1,280±0,003 U/mg ile *Bifidobacterium breve* A28 suşu yapay bağırsak sıvısında en yüksek β-glukozidaz spesifik enzim aktivitesi, pH 5,5’te 0,510±0,008 U/mg ile *Lactobacillus casei* LE4 suşu en düşük spesifik enzim aktivitesi göstermiştir. β-glukozidaz aktivite gösterdikleri tespit edilen bakteri kültürleri içerisinde, en yüksek enzim aktivite yeteneği gösteren *Lactobacillus rhamnosus* BAZ78 suşunun, sahip olduğu enzimin saflık derecesini belirlemek için kısmi saflaştırma işlemi elektroforetik olarak gerçekleştirilmiştir. Yüksek enzim aktivitesine sahip *Lactobacillus casei* LB65 ve *Lactobacillus rhamnosus* BAZ78 suşlarının izoflavonların glukozit (daidzin, genistin) formunu aglikon (daidzein, genistein) formlarına hidroliz edemedikleri ise yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile tespit edilmiştir. Suşların izoflavonları hidroliz etme yeteneğinde sahip olmadıkları tespit edilmiştir.

**Bilim Kodu** : 203.1.023

**Anahtar Kelimeler** : *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*,  $\beta$ -glukozidaz, izoflavon

**Sayfa Adedi** : 104

**Tez Yöneticisi** : Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ

**BETA-GLYCOSIDASE ENZYME ACTIVITIES OF  
LACTOBACILLUS AND BIFIDOBACTERIUM GENUS AND  
HYDROLYSIS OF ISOFLAVONE**

**(M.Sc. Thesis)**

**Berat ÇINAR**

**GAZİ UNIVERSITY  
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

**JUNE 2012**

**ABSTRACT**

In this study, human-being, nutritional and animal originated 39 pieces *Lactobacillus* and isolated from new-born faeces 3 *Bifidobacterium*, a total of 42 bacterias that are available in the culture collection of Biotechnology Laboratory of Faculty of Science in Gazi University are used. By using p-nitro phenyl- $\beta$ -D glikopiranozit (p-NPG) as a substrate,  $\beta$ -glycosidase enzyme activities of the cultures were identified. It is registered that animal-originated *Lactobacillus rhamnosus* BAZ78 (4,500 $\pm$ 0,002 U/mg), belonging to *Lactobacillus* family, nutritional *Lactobacillus rhamnosus* SMP6-5 (2,670 $\pm$ 0,001 U/mg), human-being originated *Lactobacillus casei* LB65 (3,000 $\pm$ 0,001 U/mg) and *Lactobacillus casei* LE4 (2,000 $\pm$ 0,001 U/mg) strains, on the other hand *Bifidobacterium breve* A28 (2,670 $\pm$ 0,000 U/mg) and *Bifidobacterium longum* BASO15 (2,330 $\pm$ 0,000 U/mg) strains belonging to the *Bifidobacterium* family have the highest specific enzyme activity capabilities. Optimization studies were carried out on the cultures that showing a high  $\beta$ -glycosidase enzyme activity, identifying that different pH, temperature, buffer, and nutritional environment have an effect on the enzyme activity. It is observed that, cultures at pH 7.5 have the highest (*Lactobacillus rhamnosus* BAZ78, 4,500 $\pm$ 0,002 U/mg), and at

pH 4.0 have the minimum (*Bifidobacterium breve* A28,  $0,750\pm 0,000$  U/mg) specific enzyme activity capability. To determine the effect of temperature on enzyme activity, p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopiranozit (p-NPG) mixtures are incubated at a temperature of 30° C, 37° C, 40° C, 50° C and 60°. It is seen that, cultures which are close to the incubation temperatures, records a high enzyme activity. In the case of strains are grown up in different nutritional environment, while strain *Lactobacillus casei* LB65 ( $6,800\pm 0,001$  U/mg), in the 2% fructose containing nutritional environment shows the highest enzyme activity, strain *Lactobacillus casei* LB65 ( $0,460\pm 0,002$  U/mg) in the 2% cellobiose containing nutritional environment shows the lowest enzyme activity. On the other hand, while the highest specific enzyme activity in *Bifidobacteriums* are registered in the TPY nutritional environment (*Bifidobacterium breve* A28,  $2,670\pm 0,000$  U/mg), the lowest specific enzyme activity is registered in the MMRSC nutritional environment (*Bifidobacterium longum* BASO15,  $0,720\pm 0,001$  U/mg). It is determined that, cultures considered as a potential probiotic strains, under adverse conditions in the gastro-intestinal system (acid, bile salts) showed high  $\beta$ -glucosidase activity, while preserving the viability. In the artificial gastric juice, cultures of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* showed the highest (*Lactobacillus casei* LB65,  $2,200 \pm 0,005$  U / mg) at pH 7.0, and at pH 2.0 the lowest (*Lactobacillus rhamnosus* BAZ78,  $0,603 \pm 0,000$  U / mg) specific enzyme activity. In artificial intestinal fluid, at pH 8.0, *Bifidobacterium breve* strain A28 ( $1,280 \pm 0,003$  U / mg) shows the highest specific  $\beta$ -glucosidase enzyme activity, while the lowest specific enzyme activity is seen, at pH 5.5, on LE4 strain of *Lactobacillus casei* ( $0,5100 \pm 0,008$  U / mg). Purification process has been applied to determine the purity degree of the enzyme of *Lactobacillus rhamnosus* (BAZ78) strain, which has the highest enzyme activity capability among the  $\beta$ -glucosidase activity showing bacterial cultures. With high performance liquid chromatography (HPLC), it is identified, strains having high enzyme activity could not hydrolyze glucoside isoflavone form (daidzin, genistin) to aglikon form (daidzein, genistein) forms.



**Science Code: 203.1.023**

**Key words: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*,  $\beta$ -glycosidase, isoflavone**

**Page number: 104**

**Adviser: Prof. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezim süresince değerli katkılarıyla ve bilgileriyle beni yönlendiren sayın hocam Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ'a; çalışmalarım esnasında deneyimlerinden ve yardımlarından faydalandığım Prof. Dr. Belma ASLIM, Prof. Dr. Yavuz BEYATLI ve Prof. Dr. Elif DEMİRKAN'a içten teşekkürlerimi sunarım. Bilgi birikimi, öneri ve içten yardımları ile desteklerini esirgemeyen Yasemin KILIÇ ve Mehmet Bahadır ACAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezim süresince beni yalnız bırakmayan Biyoteknoloji Laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Öğrenci İşleri personeli Doğan KARA'ya; çalışmalarımda kullandığım bakterilerin izolasyonunda emeği geçen Sema YİYİT DOĞAN ve Özer ÖNER'e, teşekkür ederim.

Yaşantım süresince bana güvenen, maddi manevi her türlü destekleriyle yanımda olan kıymetli ailem Metin AKTAŞ; Kemal ÇINAR; Sevil ÇINAR; Yusuf ÇINAR; Aysel ÇINAR; Ceylin ÇINAR; Hüsnüye CİN; Berna USLU KAYA; İsmail KAYA; Koray ÜNER; Betül AYDIN; Ayşegül MENDİ; Hande YEĞENOĞLU; Sina ROSTAMİ; Esra YAŞAR; Seda ARIK ve Özlem KARAKUŞ'a sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından 46/2011-01 kodlu proje ile desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	vii
TEŞEKKÜR .....	x
İÇİNDEKİLER .....	xi
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ .....	xiv
RESİMLERİN LİSTESİ .....	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xviii
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	3
2.1. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri.....	3
2.2. Bifidobakterilerin Genel Özellikleri .....	7
2.3. Laktobasillerin ve Bifidobakterilerin Probiyotik Özellikleri .....	9
2.4. Fitoöstrojenler .....	10
2.4.1. İzoflavonlar .....	11
2.4.2. İzoflavonların kimyasal yapısı.....	12
2.4.3. İzoflavonların biyosentezi.....	15
2.5. Doğada Bulunan Fitoöstrojen Kaynakları.....	16
2.6. Fitoöstrojenlerin Biyolojik Aktiviteleri ve Kullanılışları.....	19
2.6.1.Östrojenik / Antiöstrojenik Aktivite .....	19
2.6.2. Antikarsinojenik Aktivite.....	20
2.6.3. Antioksidan Aktivite .....	23
2.7. $\beta$ -Glukozidaz Enzimi .....	24
2.8. Enzimlerin Genel Özellikleri .....	27
2.8.1. Enzim Reaksiyonlarını Etkileyen Faktörler .....	29
2.9. Enzim Aktivitesinin Hesaplanması .....	31
2.10. Enzimlerin Saflaştırılması.....	33
2.10.1. Belirli enzim ayırma ve saflaştırma işlemleri .....	33
3. MATERYAL VE METOT .....	40

3.1. Materyal .....	40
3.1.1. Araştırmada kullanılan bakteriler.....	40
3.1.2. Araştırmada kullanılan besiyerleri .....	42
3.2. Metot .....	45
3.2.1. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları.....	45
3.2.2. Bakterilerin muhafazası .....	45
3.2.3. Kùltürlerin $\beta$ -glukozidaz aktivitelerinin belirlenmesi.....	45
3.2.4. Enzim optimizasyonu.....	46
3.2.5. Bakterilerin yapay mide suyu ve bağırsak sıvısında $\beta$ -glukozidaz aktivitelerinin belirlenmesi.....	47
3.2.6. Enzimin kısmi saflaştırılması.....	47
3.2.7. Protein konsantrasyonlarının belirlenmesi.....	49
3.2.8. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE).....	49
3.2.9. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) analizi .....	53
3.2.10. İstatistiksel analiz .....	53
4. DENEYSEL BULGULAR .....	54
4.1. Araştırmada Kullanılan Bakteriler .....	54
4.2. $\beta$ -Glukozidaz Enzim Aktiviteleri .....	55
4.3. Enzim Optimizasyonu .....	58
4.4. Bakterilerin Yapay Mide Suyu ve Bağırsak Sıvısında $\beta$ -Glukozidaz Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	70
4.5. Enzimin Kısmi Saflaştırılması .....	75
4.6. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) .....	79
4.7. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) analizi .....	80
5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	81
KAYNAKLAR .....	91
ÖZGEÇMİŞ .....	104

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 <i>Lactobacillus</i> cinsi bakterilerin fenotipik özelliklerine göre sınıflandırılması. ....	6r
Çizelge 2.2. İzoflavon yapısının radikal gruplara göre değişimleri. ....	13
Çizelge 2.3. USDA-Iowa State Üniversitesi Database'ine göre bazı besinlerin 100 gramlarında içerdikleri Genistein, Daidzein ve Glisitein izoflavonlarının miligram (mg) cinsinden miktarları. ....	18
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan <i>Lactobacillus</i> ve <i>Bifidobacterium</i> cinsi bakteriler, izolasyon kaynakları ve gelişme sıcaklıkları.....	41
Çizelge 4.1. <i>Lactobacillus</i> ve <i>Bifidobacterium</i> cinsi bakterilerin $\beta$ -glukozidaz aktivite miktarı. ....	56
Çizelge 4.2. <i>Lactobacillus</i> ve <i>Bifidobacterium</i> cinsi bakterilerin farklı pH değerlerinde enzim aktiviteleri, protein miktarları ve spesifik enzim aktiviteler .....	61
Çizelge 4.3. <i>Lactobacillus</i> cinsi bakterilerin farklı besiortamlardaki enzim aktiviteleri, protein miktarları ve spesifik enzim aktiviteleri.....	65
Çizelge 4.4. <i>Bifidobacterium</i> cinsi bakterilerin farklı besiortamlarındaki enzim aktiviteleri, protein miktarları ve spesifik enzim aktiviteleri.....	68
Çizelge 4.5. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> BAZ78 suşunun kısmi saflaştırma işlemi öncesi ve sonrasında elde edilen aktivite değerleri.....	77
Çizelge 4.6. <i>Lactobacillus casei</i> LB65 suşunun kısmi saflaştırma işlemi öncesi ve sonrasında elde edilen aktivite değerleri.....	78

## ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Homofermantatif ve Heterofermantatif Laktik Asit Bakterilerinde Glukozun Fermantasyonu.....	4
Şekil 2.2. İnsan gastrointestinal sistemindeki mikroorganizmalar. ....	7
Şekil 2.3. İzoflavonların formülü.....	12
Şekil 2.4. Aglikon yapısındaki izoflavonlar: Genistein, Daidzein ve Glisitein.....	14
Şekil 2.5. a. Oz, b. Asetil, c. Malonil grupları bağlanmış daidzein izoflavonlar.....	15
Şekil 2.6. Genisteinin biyosentez yolu.....	16
Şekil 2.7. İzoflavonların izomer yapıları ve bakteriyal kaynaklı enzimin hidroliziyle dönüşümleri.....	26
Şekil 2.8. p-nitrofenol-β-D-glikopiranozitin β-glukozidaz enzimi ile hidrolizi.....	27
Şekil 2.9. Enzimlerin genel yapısı.....	28
Şekil 2.10. Enzim reaksiyon hızı.....	30
Şekil 2.11. Kromatografi temelinin şematik açıklanması.....	37
Şekil 2.12. Büyüklükleri farklı üç proteinin jel filtrasyonu ile ayrılması.....	38
Şekil 2.13. (a) Afinite kromatografisinin temeli. Ligand bir matris iskeletine bağlanır. Sadece liganda afinite olan enzimler adsorbana bağlanır. Diğer proteinler kolonu terk eder. (b) Kovalent bağlı glukoz birimleri içeren bir kolonda konkanavalin A'nın kromatografisi ile ayırımı.....	39
Şekil 4.1. <i>Lactobacillus</i> ve <i>Bifidobacterium</i> cinsi bakterilerin farklı pH değerlerinde spesifik enzim aktivitesi.....	59
Şekil 4.2. <i>Lactobacillus</i> ve <i>Bifidobacterium</i> cinsi bakterilerin farklı pH değerlerinde enzim aktiviteleri.....	59
Şekil 4.3. <i>Lactobacillus</i> ve <i>Bifidobacterium</i> cinsi bakterilerin farklı pH değerlerinde protein miktarları.....	60
Şekil 4.4. <i>Lactobacillus</i> ve <i>Bifidobacterium</i> cinsi bakterilerin farklı sıcaklık değerlerinde spesifik enzim aktivitesi.....	62
Şekil 4.5. <i>Lactobacillus</i> ve <i>Bifidobacterium</i> cinsi bakterilerin farklı sıcaklık değerlerinde enzim aktiviteleri.....	63

## ŞEKİLLER LİSTESİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.6. <i>Lactobacillus</i> ve <i>Bifidobacterium</i> cinsi bakterilerin farklı sıcaklık değerlerinde protein miktarları .....	63
Şekil 4.7. <i>Lactobacillus</i> cinsi bakterilerin farklı besiortamlardaki spesifik enzim aktivitesi.....	66
Şekil 4.8. <i>Lactobacillus</i> cinsi bakterilerin farklı besiortamlardaki enzim aktiviteleri.....	67
Şekil 4.9. <i>Lactobacillus</i> cinsi bakterilerin farklı besiortamlardaki protein miktarları .....	67
Şekil 4.10. <i>Bifidobacterium</i> cinsi bakterilerin farklı besiortamlarındaki spesifik enzim aktivitesi.....	69
Şekil 4.11. <i>Bifidobacterium</i> cinsi bakterilerin farklı besiortamlarındaki enzim aktiviteleri .....	69
Şekil 4.12. <i>Bifidobacterium</i> cinsi bakterilerin farklı besiortamlarındaki protein miktarları .....	70
Şekil 4.13. <i>Lactobacillus</i> ve <i>Bifidobacterium</i> cinsi bakterilerin yapay mide suyunda spesifik enzim aktivitesi.....	71
Şekil 4.14. <i>Lactobacillus</i> ve <i>Bifidobacterium</i> cinsi bakterilerin yapay mide suyunda enzim aktiviteleri .....	72
Şekil 4.15. <i>Lactobacillus</i> ve <i>Bifidobacterium</i> cinsi bakterilerin yapay mide suyunda protein miktarları .....	72
Şekil 4.16. <i>Lactobacillus</i> ve <i>Bifidobacterium</i> cinsi bakterilerin yapay bağırsak sıvısında spesifik enzim aktivitesi.....	74
Şekil 4.17. <i>Lactobacillus</i> ve <i>Bifidobacterium</i> cinsi bakterilerin yapay bağırsak sıvısında enzim aktiviteleri .....	74
Şekil 4.18. <i>Lactobacillus</i> ve <i>Bifidobacterium</i> cinsi bakterilerin yapay bağırsak sıvısında protein miktarları .....	75
Şekil 4.19. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> BAZ78 suşunun saflaştırma basamakları sonucu elde edilen aktivite değerleri.....	77

Şekil 4.20. <i>Lactobacillus casei</i> LB65 suşunun saflaştırma basamakları sonucu elde edilen aktivite değerleri .....	78
--	----



## RESİMLERİN LİSTESİ

<u>Resim</u>	<u>Sayfa</u>
Resim 2.1. <i>Lactobacillus paracasei</i> türünün taramalı elektron mikroskobu görüntüsü .....	5
Resim 2.2. <i>Bifidobacterium</i> sp. suşunun taramalı elektron mikroskobu görüntüsü.....	8
Resim 2.3. Diyaliz.....	36
Resim 4.1. a <i>Bifidobacterium longum</i> BAS015 ışık mikroskobu görüntüsü .....	54
Resim 4.1. b <i>Lactobacillus casei</i> LB65 ışık mikroskobu görüntüsü.....	54
Resim 4.2. a <i>Bifidobacterium breve</i> A28 suşunun TPY agarda koloni morfolojisi .....	54
Resim 4.2. b <i>Lactobacillus casei</i> LB65 suşunun MRS agarda koloni morfolojisi .....	54
Resim 4.3. pH7,5’da <i>Lactobacillus rhamnosus</i> BAZ78 ve <i>Lactobacillus rhamnosus</i> SMP6-5 suşlarının enzim aktivitesiyle sarı renk oluşumu ...	55
Resim 4.4. <i>Lactobacillus casei</i> LB65 SDS-PAGE görüntüsü .....	79
Resim 4.5. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> BAZ78 SDS-PAGE görüntüsü .....	80

## SİMGELER VE KISALTMALAR

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

<b><u>Simgeler</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
°C	Santigrat derece
g	Gram
kg	Kilogram
L	Litre
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
nm	Nanometre
pH	Asitlik bazlık birimi
mM	Milimolar

**Kısaltmalar****Spp****Subsp** **$\beta$** **kD****rpm****Cfu****HPLC****TPY****MRS****MMRSC****MRSC****Dak****p-NPG****SDS****Açıklama**

Species (Türleri)

Subspecies (Alttürleri)

Beta

Kilodalton

Devir sayısı

Koloni Oluşturan Birim

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi

Trptone Phytone Yeast Extract

Man&amp;Rogosa ve Sharpe

Modifiye Sisteinli Man&Rogosa ve  
Sharp

Sisteinli Man&amp;Rogosa ve Sharp

Dakika

p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside

Sodyum Dodosil Sülfat

## 1. GİRİŞ

Bitki kimyasalları olarak isimlendirilen izoflavonlar, fitoöstrojenlerin major grubunu temsil eden, sağlığa yararlı bileşiklerdir [Head, 1999]. Meme kanseri, prostat kanseri, kolon kanseri, menopoz semptomları, kardiyovasküler ve osteoporoz gibi hormon hastalıklarına karşı yararlı etkilerinin bulunması, yüksek miktarda izoflavon içeriğine sahip olan izoflavonların önemini gün geçtikçe arttırmaktadır [Adlercreutz ve ark., 1991; Lee ve ark., 1991]. Fitoöstrojenlerin en önemli biyolojik potansiyelleri; östrojenik, antiöstrojenik [Fukutake ve ark., 1996; Cassidy ve ark., 2000] ve antikanserojenik [Büyüktuncer ve Başaran, 2005; Herman ve ark., 1995] aktiviteye sahip olmalarıdır.

Probiyotikler; bağırsak mikrobiyal dengesini iyileştirerek, organizmayı yararlı yönde etkileyen canlı mikrobiyal gıda katkılarıdır [Salminen 1999, Saxami ve ark., 2012]. Laktik asit bakterileri ve bifidobakterilerin ürettikleri bazı inhibitör maddeler sayesinde, gastrointestinal alanda bulunan patojen mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmeleri, bağışıklık sistemini düzenlemede rol oynamaları, gastrointestinal sistemde canlılıklarını sürdürebilmeleri, düşük pH değerlerinde ve safra tuzları ile geniş bir sıcaklık aralığında gelişebilme yeteneğine sahip olmaları gibi sağlığa yararlı etkilerinin bulunmasından dolayı probiyotik olarak kullanılmaktadırlar [Saxami ve ark., 2012]. Ayrıca laktik asit bakterileri ve bifidobakterler gibi bağırsak mikroorganizmaları tarafından üretilen  $\beta$ -glukozidaz enziminin, izoflavonların  $\beta$ -glukozit bağıni kopararak, glukozit formlarını (genistin, daidzin) bağırsak duvarından kolayca emilebilen aglikon formlarına hidrolize edebilme (genistein, daidzein) yetenekleri mevcuttur [Choi ve ark., 2002].  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesine sahip olan probiyotik bakterilerinin, insan sağlığı açısından yararlı etkileri de bilinmektedir.

Bu çalışmada, çeşitli kaynaklardan (insan, hayvan ve gıda) izole edilmiş *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivite yetenekleri araştırılmıştır. Yüksek enzim aktivite gösteren kültürlerin farklı pH, sıcaklık ve besiortamındaki enzim aktivitelerinin optimizasyon çalışmaları

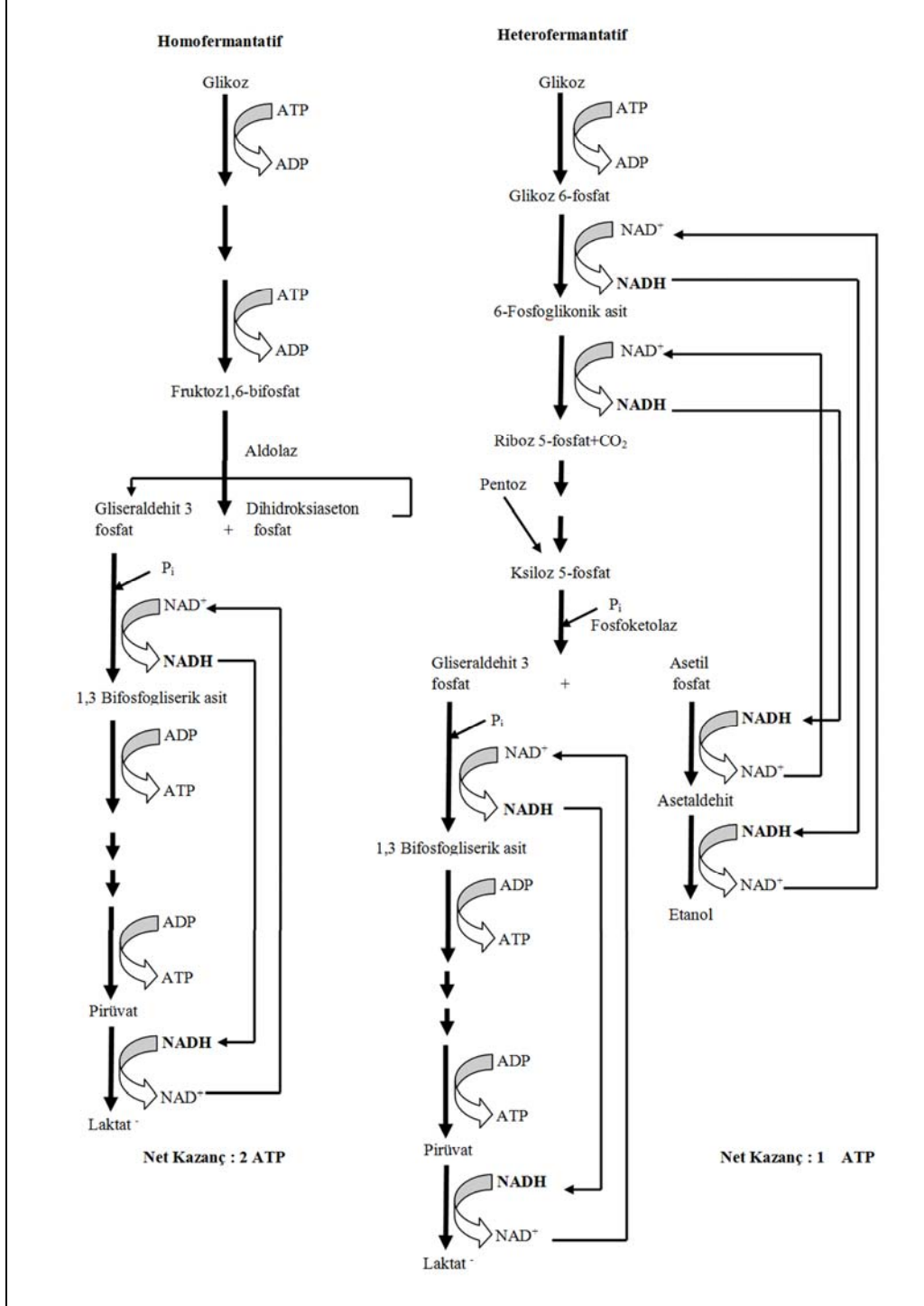
yapılmıştır. Kùltùrlerin, yapay mide-bağırsak sıvında geliştirilerek, asidik ve bazik ortamda canlılıklarını korumaları ve enzim aktivite yeteneğini bu ortamlarda da göstermeleriyle farklı bir bakış açısından probiyotik özellikleri değerlendirilmiştir. Ayrıca, yüksek enzim aktivitesi gösteren suşların izoflavonları hidrolizasyon yeteneklerinin ve ürettikleri enzimin kısmi saflaştırılması çalışmalarının yapılması da hedeflenmiştir.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özelliği

Laktik asit bakterileri; çubuk, kok ve kokobasil şekilde, Gram-pozitif, hareketsiz, sitokramdan yoksun, katalaz (-), aerotolerant, aside dayanıklı, spor oluşturmeyen (*Sporolactobacillus inulinus* hariç) kuvvetli fermantatif olup, nitratları indirgemeyen, büyüme ve gelişimleri için glikoz ve amonyum yanında bazı vitamin ve aminoasitlere ihtiyaç duyan, karbonhidrat fermantasyonu sırasında son ürün olarak laktik asit üreten mikroorganizmalardır [Holzapfel ve ark., 2007]. Laktik asit bakterileri; gıda maddeleri, enzim ve bakteriyosin gibi antimikrobiyal madde üretmeleri nedeniyle endüstriyel açıdan büyük öneme sahiptir [Pfeiler ve Klaenhammer, 2007]. Bu bakteriler, çeşitli gıdaların üretiminde (yoğurt, kefir, sucuk vb.) starter kültür olarak kullanılmaları ile gıda maddelerinin olgunlaştırılması ve dayanıklılık sürelerinin arttırılması açısından, potansiyel gıda koruyucusu olarak, gıda endüstrisinde önemli rol oynarlar [Tangüler ve Erten, 2006; Giraffa ve ark., 2010; Yörük ve Güner, 2011].

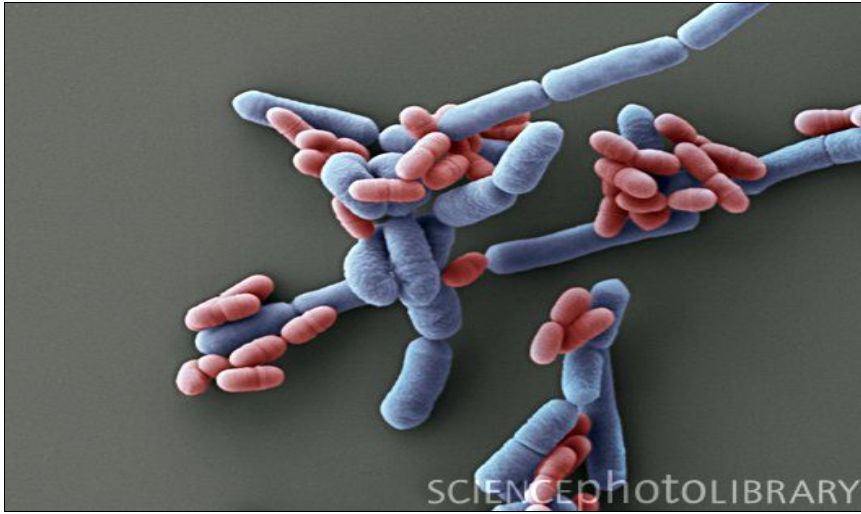
Su ve toprakta hemen hemen hiç rastlanılmayan bu bakterilere, cins ve türe göre değışmek üzere, süt ve süt ürünleri çalışma yerlerinde, bitki ve bitki atıklarında, insan, hayvan ve diğer canlıların bağırsak sistemlerinde rastlanmaktadır [Tekinşen ve Atasever, 1994]. Laktik asit bakterileri, genellikle vitamince zengin, maya ekstraktı, domates suyu, peynir altı suyu, süt serumu veya kan içeren karmaşık besi yerlerinde iyi gelişmektedirler [Halkman, 1991]. Laktik asit bakterileri, karbonhidrat fermantasyonu sırasında son ürün olarak başlıca laktik asit üretmekte olup (Şekil 2.1), karbonhidratları fermente etmelerine göre; homofermantatif, fakültatif heterofermantatif ve zorunlu heterofermantatif olmak üzere üç gruba ayrılmaktadırlar [Curry ve Crow, 2003]. Homofermantatif laktik asit bakterileri; glukozu, Fruktoz Di Fosfat (FDP) yolu ile parçalayarak fermantasyon sonucu, % 99 oranında laktik asit ve %1 oranında diğer bileşikleri meydana getirirler. Heterofermantatif laktik asit bakterileri, glukozu Hegzos Mono Fosfat (HMF) yolu ile parçalayarak, fermantasyon karbondioksiti oluştururlar [Kılıç ve Aslım, 2003].



Şekil 2.1. Homofermantatif ve Heterofermantatif Laktik Asit Bakterilerinde Glukozun Fermantasyonu [Madigan 1997; Kara 2004].

Genetik çalışmalar sonucu ortaya çıkan sınıflandırmada, gıdalarda önem arz eden biyokimyasal ve ekolojik özellikleriyle birlikte filogenetik olarak birbirine yakın olan başlıca LAB soyları: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oeno-coccus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenecoccus*, *Vagococcus* ve *Weissella*'dır [Tangüler ve Erten, 2006; Giraffa ve ark., 2010].

Laktik asit bakterilerinin en büyük grubu olan *Lactobacillus* cinsi, 80'nin üzerinde tür ve alt türlerden oluşmaktadır [Limsowtin ve ark., 2003]. *Lactobacillus* cinsi bakteriler, gıda fermantasyonunda oldukça önemli bir yere sahip olan laktik asit bakterilerinin heterojen grubunu oluşturmakta olup [Giraffa ve ark., 2010] tipik olarak; çubuk şekilli, uzun ve ince, kısa değişen formlarda bulunmaktadır. Resim 2.1'de *Lactobacillus paracasei* türünün taramalı elektron mikroskobundaki formu görülmektedir.



Resim 2.1. *Lactobacillus paracasei* türünün taramalı elektron mikroskobu görüntüsü [http://www.sciencephoto.com, 2011].

*Lactobacillus* cinsi bakteriler; insanların gastrointestinal sistemi, vajina, bitkiler ve bitkisel maddeler, tahıl ürünleri, süt, et ve et ürünleri, olmak üzere oldukça geniş yaşam alanlarında yayılım göstermektedirler [Pfeiler ve Klaenhammer, 2007]. Bunun yanında, böceklerde de *Lactobacillus* cinsi bakteriler bulunabilmektedir [Giraffa ve ark., 2010]. Çoğu türleri homofermantatif olmakla birlikte, heterofermantatif türleri



de bulunmaktadır. Çizelge 2.1.'de *Lactobacillus* cinsi bakterilerin fenotipik karakterlerine göre sınıflandırılması yapılmıştır.

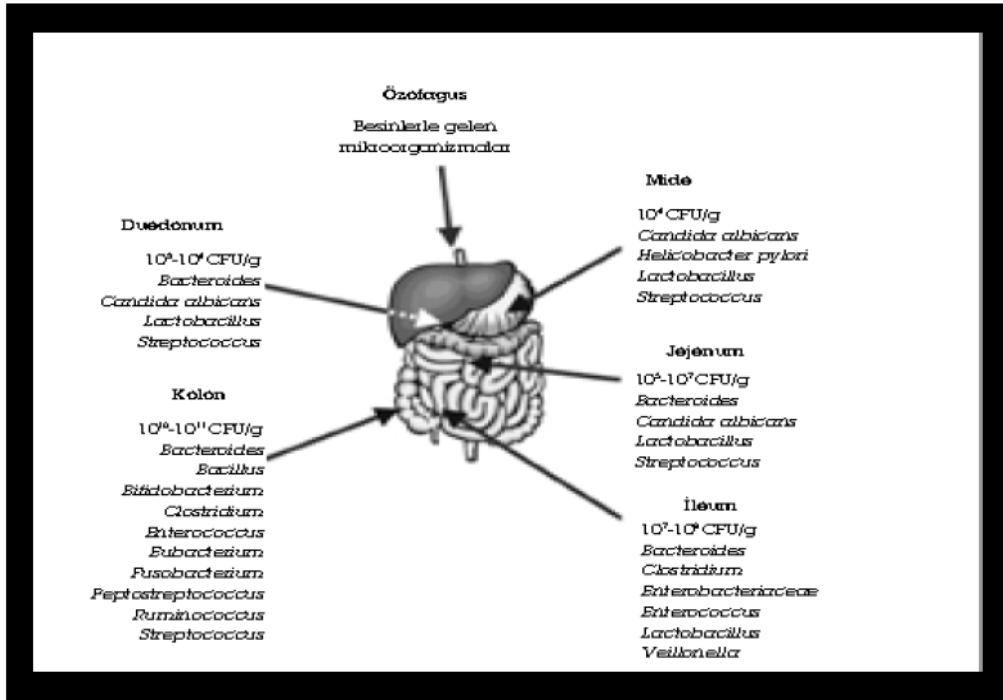
Çizelge 2.1. *Lactobacillus* cinsi bakterilerin fenotipik özelliklerine göre sınıflandırılması [Stiles ve Holzapfel, 1997].

OBLİGAT HOMOFERMANTATİFLE	FAKÜLTATİF HETEROFERMANTATİFLER	OBLİGAT HETEROFERMANTATİFLER
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acetotolerans</i>	<i>L. brevis</i>
<i>L. amylophilus</i>	<i>L. agilis</i>	<i>L. buchneri</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>L. alimentarius</i>	<i>L. collinoides</i>
<i>L. aviarius</i> subsp. <i>araffinosus</i>	<i>L. bifementans</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>L. aviarius</i> subsp. <i>aviarius</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. fructivorans</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i>	<i>L. fructosus</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i>	<i>L. hilgardii</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. kefir</i>
<i>L. farciminis</i>	<i>L. graminis</i>	<i>L. malefermentans</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>L. hamsteri</i>	<i>L. oris</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>L. homohiochii</i>	<i>L. panis</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>L. intestinalis</i>	<i>L. parabuchneri</i>
<i>L. jensenii</i>	<i>L. murinus</i>	<i>L. parakefir</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	<i>L. pontis</i>
<i>L. kefiranofaciens</i>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	<i>L. reuteri</i>
<i>L. kefirgranum</i>	<i>L. paraplantarum</i>	<i>L. sanfrancisco</i>
<i>L. mali</i>	<i>L. pentosus</i>	<i>L. suebicus</i>
<i>L. ruminis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. vaccinofermentans</i>
<i>L. salivarius</i> subsp. <i>salicinus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. vaginalis</i>
<i>L. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>	<i>L. sake</i>	
<i>L. sharpeae</i>		

\*Koyu renkte yazılmış olanlar gıdalarda probiyotik açıdan önemli laktobasillerdir.

## 2.2. Bifidobakterilerin Genel Özellikleri

İnsan gastrointestinal sistemi, birçok bakteri türünden oluşan kompleks bir mikrobiyal ekosistemden meydana gelmektedir [Zoetendal ve Mackie, 2005; Holzapfel, 2006; Aydın, 2011]. Şekil 2.2.'de insan gastrointestinal sisteminde yer alan mikroorganizmalar görülmektedir [Salminen ve Ouwehand, 2004; Mendi, 2011].



Şekil 2.2. İnsan gastrointestinal sistemindeki mikroorganizmalar [Salminen ve Ouwehand, 2004; Mendi, 2011].

Bifidobakteriler; Gram pozitif, heterofermantatif, hareketsiz, zorunlu anaerobik, spor oluşturmeyen çubuk şeklindeki bakterilerdir. Optimum gelişme sıcaklıkları 37-41°C'dir. Bifidobakteriler düzgün basıl formunda olabildiği gibi, kültür koşullarına veya üreme fazının durumuna göre dallanmış formlarda da bulunabilirler (Resim 2.2) [Biavati ve Mattarelli, 2001].



Resim 2.2. *Bifidobacterium* sp. suşunun taramalı elektron mikroskobu görüntüsü [http://www.sciencephoto.com, 2012].

İnsanların ve hayvanların mide-bağırsak sisteminin büyük bir kısmını bifidobakteriler oluşturmaktadır [Rada ve Petr, 2002]. Yeni doğmuş bebeklerin bağırsağında 3. gün görülmeye başlayıp 5. günden itibaren yaygın olarak (%95) bulunurlar. Yetişkinlerde toplam mikrobiyal popülasyonu %25'ini oluştururlar. *Bifidobacterium* spp. gibi probiyotik bakteriler, ürettikleri asetik asitten dolayı antimikrobiyal etki göstermektedirler [Modler ve ark., 1990]. Bifidobakterileri laktik asit bakterilerinden ayıran en önemli özellik ise, DNA'larındaki G+C oranının (%55-70), laktik asit bakterilerinden çok yüksek olmasıdır. Bifidobakteriler metabolik aktivitelerinde kullandıkları karbohidratlardan dolayı da laktobasillerden farklılık göstermektedirler. Bifidobakteriler heksoz metabolizmasında fruktoz-6-fosfat yolunu kullanırken, laktobasiller glikoz-6-fosfat yolunu kullanmaktadırlar [Alp, 2008]. Bifidobakteriler sahip oldukları fosfoprotein fosfotaz aktivitesi sayesinde, insan sütünde bulunan  $\alpha$ -kazeini parçalayabilmekte ve böylece süt proteinlerinin absorpsiyonuna katkıda bulunmaktadırlar [Guarner ve Malagelda, 2003].

Yapılan çalışmalarda, anne sütünün alerji, ishal ve solunum yolu enfeksiyonlarına karşı koruyucu etkisi gözlenmiş olup [Björkstén ve ark., 2001], son zamanlarda anne sütü içinde bifidobakterilerin varlığı rapor edilmiştir [Gueimonde ve ark., 2007; Solis ve ark., 2010]. Anne sütüyle beslenen bebeklerde, yüksek miktarda bifidobakterilerin

gözlenmesiyle, anne sütünde bifidogenik oligosakkaritlerin varlığı atfedilmiştir [Arboleya ve ark., 2011].

Fermente süt ürünlerinde kullanılan bazı bifidobakteri suşları, gastrointestinal alanda canlılığını yüksek miktarda korumakta ve probiyotik özelliklerini kalın bağırsakta göstermektedir [Klijn ve ark., 2005]. Mikrobiyal ekosistemde yer alan bifidobakterilerin sayısının artması ve intestinal mikrofloradaki zararlı bakterilerin baskılanması oldukça önemlidir [Kouya ve ark., 2007]. Bifidobakteriler, ürettikleri bazı inhibitör maddeler sayesinde gastrointestinal alanda bulunan patojen mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmekte, ayrıca bağışıklık sistemini düzenlemektedirler. Bifidobakterilerin sindirim sisteminde de sağlığı destekleyici rol oynadığı düşünülmektedir [Leahy ve ark., 2005].

### **2.3. Laktobasillerin ve Bifidobakterilerin Probiyotik Özellikleri**

Konakçı sağlığı üzerinde yararlı etkileri olan mikroorganizmalar "probiyotik" olarak tanımlanmaktadır. Birleşmiş Milletler Dünya Sağlık Örgütü Gıda ve Tarım Organizasyonu (FAO/WHO) tarafından yapılan bildiriye göre probiyotikler; '*yeterli miktarda verildiğinde konak üzerinde olumlu etki bırakan canlı mikroorganizmalar*' olarak tanımlanmıştır [FAO/WHO, 2001]. Bu mikroorganizmaların en önemlileri *Lactobacillus*, *Enterococcus* ve *Bifidobacterium* cinsine ait türlerdir [Salminen 1999, Saxami ve ark., 2012].

Probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmaların, konakçı sağlığına zarar verecek hiçbir yan etkisi olmaması gerekmektedir. Bu nedenle, probiyotik üretiminde kullanılacak mikroorganizmaların kesin tanısının yapılmış olması ve tanısı yapılmamış hiçbir mikroorganizmanın probiyotik gıda üretimine katılmaması gerekmektedir [Rolfe, 2000].

Probiyotik özellik taşıyan mikroorganizmaların insan sağlığı üzerindeki yararlı etkileri ilk kez 1908 yılında ortaya atılmıştır. Fermente süt ürünlerinde bulunan bakterilerin (*Lactobacillus* spp.) bağırsaktaki mikroflorayı olumlu yönde etkilemesi,

toksik etkiyi azaltması, bağırsağın mikrobiyal dengesini iyileştirerek, bireyin bağışıklık sistemini güçlendirmesi gibi sağlık için yararlı etkilerinin belirlenmesinden sonra, probiyotik mikroorganizmalara olan ilgi artmıştır [Gibson ve Fuller, 1998].

Canlı mikrobiyal gıda katkı maddeleri olarak probiyotiklerin en iyi bilinenleri, laktik asit bakterileridir. Yoğurt yapımında kullanılan mikroorganizmalar (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*) dışında tüm laktik asit bakterileri bağırsak florası üyesidir. Patojen ve toksik olmayan bu mikroorganizmalar, depolama sırasında üründe canlılığını koruduğu ve tüketim sonrası insanların metabolizmasında yer aldığı ölçüde yararları artmaktadır [Önal ve ark., 2005].

Laktobasillerin ve bifidobakterilerin insan kaynaklı olması, mide asitliğine ve safra tuzlarına karşı dirençli olmaları, bağırsak florasını iyileştirme, diyareyi önleme, bağışıklık sistemini güçlendirme, kanda kolesterol seviyesini düşürme, kanser hücrelerini baskı altına alma, mineral absorpsiyonunu güçlendirme ve laktoz kullanımını iyileştirme, intestinal mukozaya tutunabilme, antimikrobiyal maddeler üreterek patojen bakterilerin gelişimini engelleyebilme gibi yararlı etkilerinin bulunmasından dolayı insan probiyotikleri olarak kullanılmaktadırlar [Kaur ve ark., 2002; Uzun, 2006; Espinoza ve Navarro, 2010; Mendi 2011; Saxami ve ark., 2012].

Gastrointestinal sistem için yararlı ve probiyotik olarak kullanılan *Bifidobacterium* cinsine ait suşlar *Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. thermophilum*'dur [Yılsay ve Kurdal, 2000; Akalın ve ark., 2000].

#### **2.4. Fitoöstrojenler**

Fitoöstrojen terimi, ilk kez 1980 yılında ortaya çıkmıştır. Bitki kökenli östrojenler veya östrojene benzer etkiye sahip olan bileşikler fitoöstrojenler olarak adlandırılmıştır [Golberg, 2001; Magee ve Rowland, 2004]. Fitoöstrojenler, nutrasotik maddeler içinde yer almaktadır. Nutrasotikler hastalıkların tedavisinde

veya önlenmesinde sağlığa yararları bilimsel olarak ispatlanmış, toksik olmayan, herhangi bir gıda desteğini ifade eden bileşiklerdir [Başer ve Kırimer, 2002].

Fitoöstrojenler kimyasal yapı olarak östrojenlere benzemektedir ve östrojen reseptörlerine, özellikle de son zamanlarda tanımlanan östrojen reseptör  $\beta$ 'ya (ER- $\beta$ ), bağlanmaktadır. Östrojen reseptörleri fitoöstrojenlerin steroid/tiroid hormon reseptör ailesinde yer alır. İki tip östrojen reseptörü (ER- $\alpha$  ve ER- $\beta$ ) mevcuttur ve bunların doku düzeylerindeki dağılımları farklılık gösterir. Reprodüktif hücreler, özellikle meme ve uterus, ER- $\alpha$  bakımından zengin iken, kemik, beyin, vasküler endotel ve mesane ER- $\beta$  açısından zengindir [Kan, 2008]. Östrojenik ve antiöstrojenik etkileri dışında östrojen reseptörlerinden bağımsız antioksidan, antiproliferatif ve antianjiogenik fonksiyonları da bulunmaktadır [Setchell ve Cassidy, 1999]. Fitoöstrojenler, intestinal bakteriler tarafından metabolize edilip absorbe olduktan sonra, portal venöz sistem aracılığı ile karaciğere taşınır, burada konjüge edilerek dolaşıma salınır ve en sonunda idrar ve safra yolu ile atılır [Lundh, 1995]. Fitoöstrojenlerin metabolizma üzerindeki östrojenik ve antiöstrojenik etkileri, dolaşımdaki konsantrasyonları, endojen östrojen düzeyleri, cinsiyet, menopozal durum ve kolondaki mikroflora değişkenliği gibi bireysel faktörlerden etkilenmektedir [Knight ve Eden, 1996].

Bitkilerde fenilpropan ve basit fenollerden sentezlenen fitoöstrojenler kimyasal yapılarına göre; izoflavonlar, izoflavanlar, flavanonlar, lignanlar, kumestanlar, stilbenler, steroller, makrolitler olarak sınıflandırılırlar [Büyüktuncer ve Başaran, 2005].

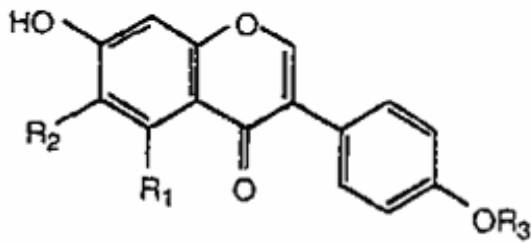
#### **2.4.1. İzoflavonlar**

İzoflavon; bir östrojen molekül çeşididir. "Phytochemicals", yani "bitki kimyasalları" olarak adlandırılan izoflavonlar, diğer bitki kimyasallarına kıyasla doğada gıda olarak tüketilebilen bitki türlerinin çok azında bulunmaktadır [Head, 1999]. İzoflavonlar, flavonoid bileşikler sınıfından olup fitoöstrojenlerin major bir grubunu temsil etmektedir. Bu non-steroidal bileşikler bitkilerden elde edilmektedir

ve otlayan hayvanların üreme verimliliği nedeniyle keşfedilmiştir [Aslan ve ark., 2005; Gallagher ve ark., 2004].

#### 2.4.2. İzoflavonların kimyasal yapısı

İzoflavonların yapılarında temel olarak iki adet benzen halkası vardır ve bunlar birbirlerine heterosiklik piran halkası ile bağlanmıştır. Ayrıca her iki benzen halkasına birer tane hidroksil (-OH) grubu bağlıdır. İzoflavonlar bitkilerde doğal olarak ozlarla konjuge yapılar olan glukozit halinde bulunurlar. Oz veya dioz izoflavonun çoğunlukla 7. C atomuna glikozidik bağ ile bağlanmış durumdadır. 6-O-asetilglukozitler ve 6-O-malonilglukozitlerde ise aglikona bağlanan karbonhidrat molekülüne ek olarak asetil ve malonil grubu vardır (Şekil 2.3) [Erçetin, 2007].



Şekil 2.3. İzoflavonların formülü [Erçetin, 2007].

İzoflavonlar kimyasal yapı olarak östrojenlere benzediklerinden, reseptör düzeyinde östradiolle yarışarak, hem östrojenik hem de anti-östrojenik etki gösterebilir. İzoflavonların östrojenik aktivite gösterebilme yetenekleri farklıdır. Bitkilerden izole edilen izoflavonların bir çoğunun östrojenik etkisi olmadığı, etkili olanların da östrojenik etkilerinin aynı olmadığı saptanmıştır [Davis ve ark., 1999]. Örneğin; genistein en güçlü östrojenik etkiyi gösterirken, soya izoflavonlarının % 5-10'unu oluşturan glisitein diğer izoflavonlardan çok daha zayıf östrojenik özelliğe sahiptir [Liggins ve ark., 1998; Song ve ark., 1999; Cassidy ve ark., 2000]. İnsan vücudunda izoflavonların %5'ten daha az bir kısmı serbest halde bulunur. Bir kısmı seks hormonu bağlayıcı globülinler (SHBG) gibi plazma proteinlerine bağlı olabilir. İzoflavonların nasıl etki gösterecekleri, dolaşımda bulunan östrojen miktarı ve östrojen reseptörlerinin sayısı ve tipine bağlıdır. İzoflavonlar ayrıca seks hormonu

bağlayıcı globülinlere (SHBG) bağlı halde olan östrojen ve testosteronu ayırarak, hedef hücrelere ulaşan hormon düzeylerini de değiştirebilir [Setchell ve Adlercreutz, 1998; Kan, 2008]. Çizelge 2.2.'de izoflavonların radikal gruplara göre değişimleri gösterilmektedir.

Çizelge 2.2. İzoflavon yapısının radikal gruplara göre değişimleri [Erçetin, 2007]

İZOFLAVON	R1	R2	R3
Formononetin	H	H	CH <sub>3</sub>
Biokanin A	OH	H	CH <sub>3</sub>
Genistein	OH	H	H
Daidzein	H	H	H
Daidzin	H	H	Glukoz
Genistin	OH	H	Glukoz
Glisitein	H	OCH <sub>3</sub>	H
Glisitin	H	OCH <sub>3</sub>	Glukoz

İzoflavonlar bitkilerde dört temel yapıda bulunabilir. Bunlar da radikal gruplarına göre farklılaşırlar.

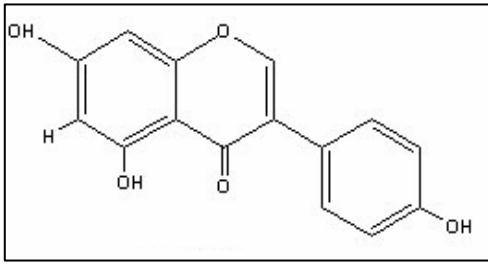
**I. Aglikon yapısındaki konjuge olmamış izoflavonlar:** Daidzein (4,7-dihidroksi izoflavon), Genistein (4,5,7-trihidroksi izoflavon), Glisitein (7,4-dihidroksi 6-metil izoflavon) (Şekil 2.4.)

**II. 7-O-glukozitler:** Daidzin (Şekil 2.5.a), Genistin, Glisitin

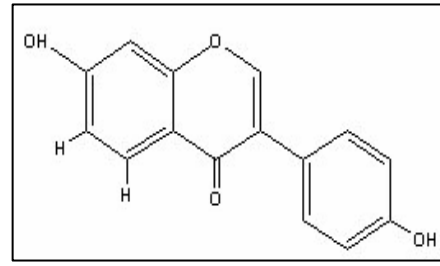
**III. 6-O-asetilglukozitler:** 6-O-asetildaidzin (Şekil 2.5.b), 6-O-asetilgenistin, 6-O-asetilglisitin

**IV. 6-O-malonilglukozitler:** 6-O-malonildaidzin (Şekil 2.5.c), 6-O-malonilgenistin, 6-O-malonilglisitin [Sam ve Chang, 2002; Erçetin, 2007]

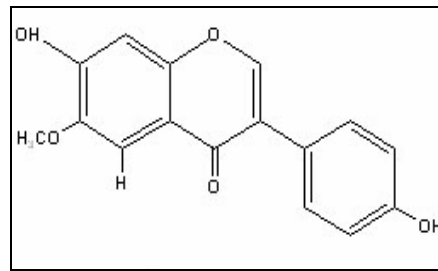




a. Genistein

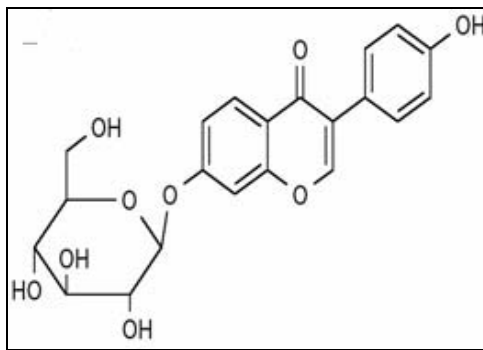


b. Daidzein

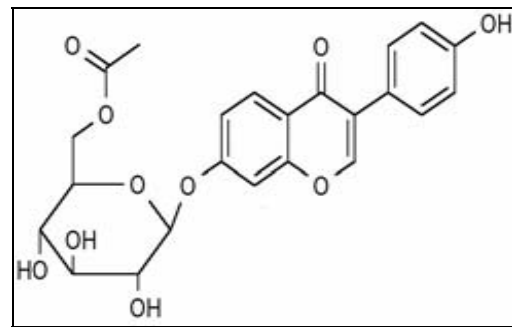


c. Glisitein

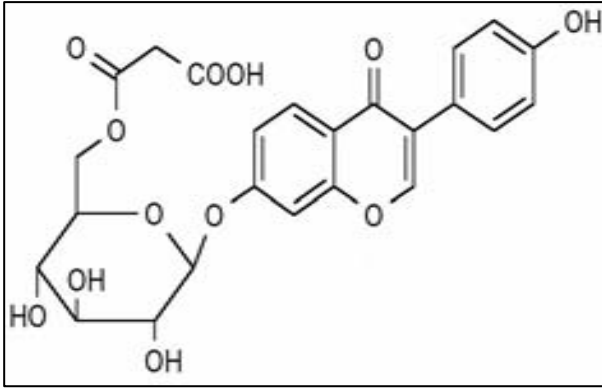
Şekil 2.4. Aglikon yapısındaki izoflavonlar: Genistein, Daidzein ve Glisitein  
[www.gidaderneği.org, 2005].



a. Daidzin



b. 6-O-Asetildaidzin

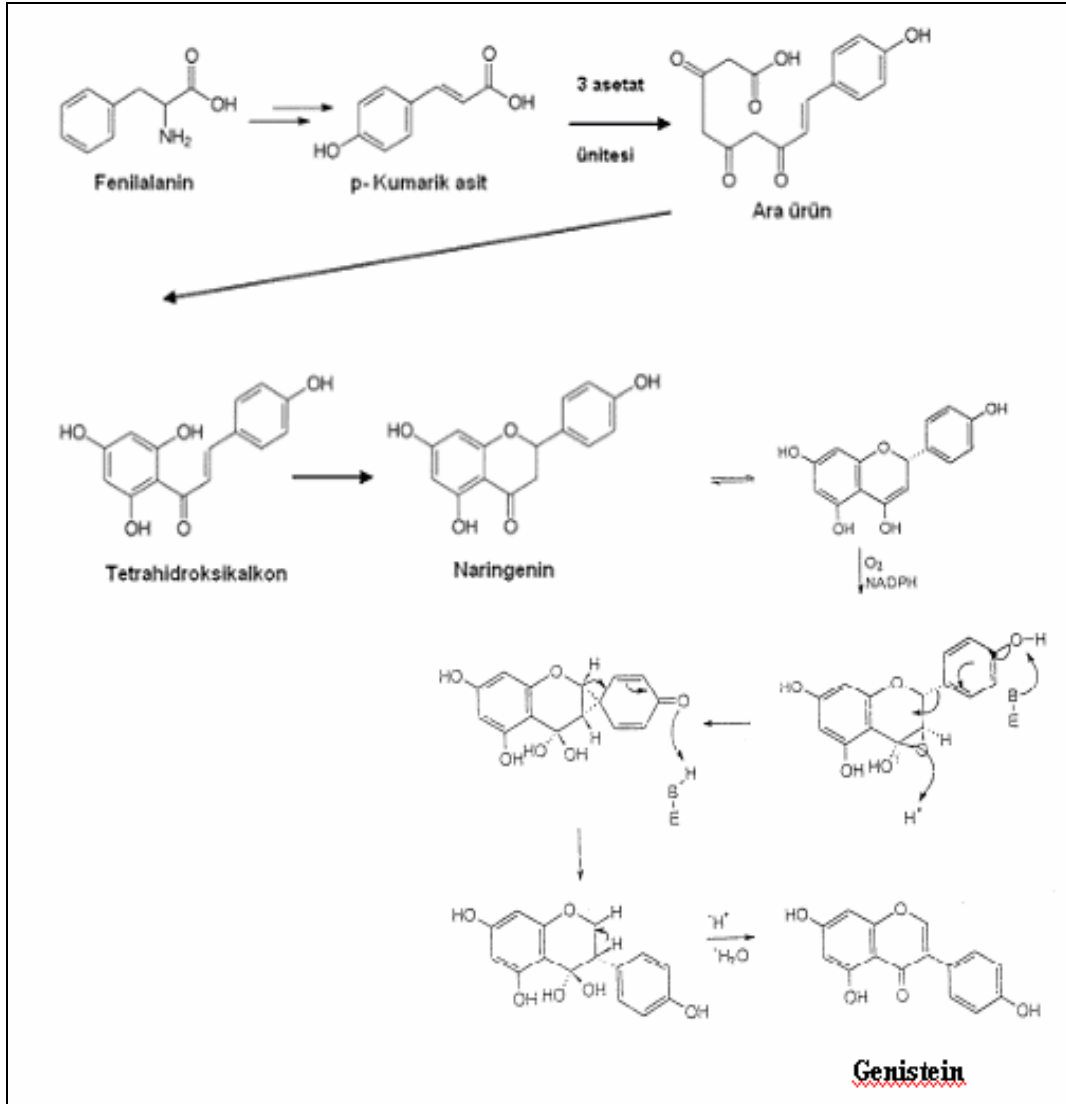


c. 6-O-Malonildaidzin

Şekil 2.5. a. Oz, b. Asetil, c. Malonil grupları bağlanmış daidzein izoflavonlar [http://www.lclabs.com, 2005].

### 2.4.3. İzoflavonların biyosentezi

İzoflavonların biyosentezinde Şikimat-asetat yolunun son ürünü olan Fenilalanin, Sinamik asite ve daha sonra okside olarak p- Kumarik asite dönüşür. p- Kumarik asit, üç asetat ünitesiyle kondansasyona uğrayarak A halkasını oluşturup, tetrahidrokalkona dönüşecek olan ilk ara ürünün oluşmasını sağlar. Diğer kapalı halka yapısı (C halkası) oluştuğunda bir flavonon olan Naringenin meydana gelir. Bundan sonra flavonlar arasında değişik formlar oluşur (Şekil 2.6.) [Jensen ve Schripsema, 2002; Erçetin, 2007]. Flavonon oluşumundan sonra izoflavonların oluşum mekanizması iki basamakta gerçekleşir. İlk basamakta, bir flavonon enol formunun oksidasyonu ve reorganizasyonu; ikinci basamakta, su molekülünün eliminasyonu sonucu izoflavon molekülü oluşumu gerçekleşir.



Şekil 2.6. Genisteinin biyosentez yolu [Jensen ve Schripsema, 2002; Erçetin, 2007].

## 2.5. Doğada Bulunan Fitoöstrojen Kaynakları

Birçok alt gruba ayrılan fitoöstrojenler, buldukları besin kaynakları bakımından çeşitlilik gösterirler. İzoflavonlar temel olarak Leguminosae ailesinin üyelerinde (soya fasüyesi, bezelye, mercimek) bulunsalar da Graminae, Rosaceae (*Prunus* sp.), İridaceae (*Iris* sp.) ve Solanaceae (*Nicotiana tabacum*) türlerinde de tanımlanmışlardır. Günümüzde en çok kullanılan izoflavon kaynakları; soya fasüyesinin işlenmesi ile elde edilen soya unu, soya protein izolatları, soya sütü, soya yoğurdu, miso, tofu, tempeh'dir. Meyve ve yağlı tohumlar içerisinde kuş üzümü

ve kuru üzüm gibi küçük taneli meyvelerin de yüksek östrojenik aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir [Liggins ve ark., 2000].

İnsanlar için major izoflavon kaynağı soya fasulyesidir. Soya fasulyesi yüksek miktarda izoflavon içeriğine sahiptir ve birçok asya ülkesinde yaygın olarak tüketilmektedir. Soya fasulyesinde izoflavon glukozitler (genistin, daidzin) ve bunların sağlık açısından yararlı biyoaktif aglikon (genistein, daidzein) formları bulunmaktadır. Soya izoflavonların antioksidatif [Kapiotis ve ark., 1997; Naim ve ark., 1976], antiosteoporotik [Anderson ve Garner, 1997], antikarsinojenik [Herman ve ark., 1995] dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Genistein ve daidzein gibi izoflavonlar, doğada en çok soya fasulyesinde bulunmaktadır. 1 g soya fasulyesinde 800 u.g daidzein ve 500 u.g genistein bulunurken, 1 g soya proteininde 150 u.g daidzein ve 250 u.g genistein bulunmaktadır [Dixon ve Ferreira, 2002].

Soya yağı ve soya sosunda, hidrofilik glukozitler ayırlamadığından dolayı izoflavon miktarları azdır [Fukutake ve ark., 1996; Erçetin, 2007]. Soya tohumlarındaki fitoöstrojen seviyeleri çevresel faktörlere önemli bir şekilde bağlıdır. Çizelge 2.3.'de genistein, daidzein ve glisitein izoflavonlarının miligram (mg) cinsinden miktarları gösterilmektedir. Bir besinin fitoöstrojen içeriği bitkinin genetik yapısı, yetiştiği bölge, mevsim özellikleri, mantarlar ile enfekte olma durumu ve besin işleme yöntemleri gibi birçok faktörden etkilenir [Davis ve ark., 1999]. Çizelge 2.3.'de görüldüğü gibi fitoöstrojenlerce zengin olduğu bilinen çeşitli besinlerin fitoöstrojen içerikleri kendi içlerinde de büyük değişiklik göstermektedir.

Çizelge 2.3. USDA-Iowa State Üniversitesi Database'ine göre bazı besinlerin 100 gramlarında içerdikleri Genistein, Daidzein ve Glisitein izoflavonlarının miligram (mg) cinsinden miktarları (<http://www.nal.usda.gov> 2002).

Besin (mg /100g)	Daidzein	Genistein	Glisitein	Glisitein
Soya tohumu	46,64	73,76	10,88	128,35
Soya unu	37,47	71,21	7,55	131,19
Soya sütü	2,41	4,60	□	7,01
Soya peyniri	11,24	20,08	□	31,32
Soya protein izolatu	33,59	59,62	9,47	102,68
Soyafasulyesi Brezilya	20,16	67,47	□	87,63
Soyafasulyesi Japonya	34,52	64,78	□	87,63
Miso	16,13	24,56	2,87	42,55
Tofu	13,60	13,90	2,00	29,50
Tempeh	17,59	24,85	2,10	43,52

Asya ülkelerinde soyalı ürünlerin kullanımı bu kadar yaygın olmasına karşın ülkemizde bu ürünlerin tüketimi oldukça azdır. Yüksek miktarda izoflavon içeriğine sahip soya ürünlerinin üretimi bakımından ülkemizin durumu; Trakya, Marmara, Karadeniz ve Akdeniz Bölgelerinde ana ürün olarak, Ege, Güneydoğu Anadolu ve Akdeniz Bölgelerinin sulanır tarım alanlarında ise ikinci ürün olarak yapılmaktadır. Soya ekiminin % 91'i Adana, Osmaniye, Hatay, Mersin, Kahramanmaraş illerini kapsayan Akdeniz bölgesinde, % 8'i Karadeniz Bölgesinde Ordu ve Samsun illeri civarında, % 1'i ise Ege bölgesinde gerçekleşmektedir. Soya en çok hayvan yemi olarak ve gıda sanayinde ise en çok soya yağı şeklinde tüketildiği görülmektedir. Ülkemizde soyalı ürünlerin tüketimi, üretime oranla oldukça düşük seviyelerde olduğu, bu nedenle soyalı ürünler dışındaki diğer kurubaklagiller (mercimek, fasulye, bezelye, nohut), tam-tahıl ürünleri, çuha çiçeği yağı ve kırmızı yonca otları, kuş üzümü, civan perçemi, keten tohumu, maydanoz, adaçayı gibi fitoöstrojen kaynakları alternatif olarak değerlendirilebilir [Umland ve ark., 2000; Liggins ve ark., 2000; Cassidy ve ark., 2000].

## 2.6. Fitoöstrojenlerin Biyolojik Aktiviteleri ve Kullanılışları

### 2.6.1.Östrojenik / Antiöstrojenik Aktivite

Fitoöstrojenlerin en önemli biyolojik potansiyelleri; östrojenik ve antiöstrojenik aktiviteye sahip olmalarıdır [Fukutake ve ark., 1996; Cassidy ve ark., 2000]. Fitoöstrojenlerin östrojenik etkileri ilk olarak 1946 yılında Batı Avusturalya’da, izoflavonca zengin bir çeşit yonca (*Trifolium subterraneum*) ile beslenen koyunlarda üreme bozukluğunun geliştiğinin farkedilmesi ile anlaşılmıştır [Adlercreutz ve Mazur, 1997; Fitzpatrick, 1999].

Fitoöstrojenlerin aktivitelerinin, ortamın endojen östrojen düzeyi ile ilişkili olabileceği ve bunun sonucunda yüksek östrojenli durumda yani menopoza öncesi kadınlarda antiöstrojenik etki gösterirken, düşük östrojenli yani menopoza sonrası kadınlarda östrojenik etki gösterebilecekleri düşünülmektedir [Martini ve ark., 1999].

Fitoöstrojenler, östrojen reseptör (ER)- $\beta$ 'ya ER- $\alpha$ 'dan daha güçlü bağlanma kapasitesine sahiptir. Örneğin; genistein ER- $\beta$ 'yı ER- $\alpha$ 'dan 20 kat fazla bağlayabilir [Adlercreutz ve Mazur, 1997; Bingham ve ark., 1998; Cassidy ve ark., 2000]. ER- $\beta$ ; prostat salgılamaya epitelinde, beyinde, idrar yolunda, düz kas hücreleri ve göğüs hücrelerinde görülür ve mRNA ekspresyonu ER- $\alpha$ 'dan daha yüksektir [Davis ve ark., 1999].

Fitoöstrojenlerin östrojenik ve antiöstrojenik özelliklerinin açıklanmasında, steroid metabolizmasını etkileyen enzimler üzerindeki etkilerinin de önemli olabileceği ileri sürülmüştür. İzoflavonların plasenta ve overlerdeki mikrozomlarda aromataz enzimini baskılayarak, androjenlerin östrojenlere dönüşümünü bloke ettiği, özellikle kumestrol ve genisteinin östronun östradiole çevrilmesinden sorumlu olan 17- $\beta$ -östradiol oksidoredüktaz enzimini baskıladığı yapılan araştırmalarla gösterilmiştir [Morris, 1996; Collins ve ark., 1997].

İzoflavon fitoöstrojenlerin etki mekanizması, kemik yapımından sorumlu olan osteoblast hücrelerinin çoğalmasını uyarması, oksidasyona bağlı hasara karşı bazı

hücrelerin korunması ve kemik yıkımında etkili osteoklast hücrelerinin apoptozisinin artmasını içermektedir [Dixon, 2004]. Fitoöstrojenlerin, kemikte östrojen reseptörlerine bağlanarak östrojenik etki gösterdiği ve bu mekanizmanın menopozda oluşan kemik yıkımını azalttığı gözlenmiştir [Gambacciani ve ark., 1997; Alekel ve ark., 2000]. İzoflavonlar genel olarak osteoblastları aktive ederek kemik formasyonunu arttırmakta ve osteoklastları inhibe ederek de kemik rezorpsiyonunu azaltmaktadır. Başlıca izoflavon kaynağı olan soya; omega-3 yağ asidi olarak da bilinen linolenik asit yönünden de oldukça zengindir. Özellikle menapoz sonrası kadınlarda osteoporoz riskine karşı alınması gereken omega-3 yağ asidi miktarı soyanın tanesinde % 5-11 arasında değişen oranda bulunmaktadır. Soya fasulyesindeki kalsiyum oranı, süte oranla iki kat fazladır. Bu içeriği sayesinde soya proteini, osteoporoz hastalıklarını önlemektedir [<http://www.ito.org.tr>].

Fitoöstrojence zengin diyetle beslenen kadınlarda; östradiol, progesteron, seks hormon bağlayıcı globülin (SHBG) düzeylerinde azalma, FSH (Folikül stimüle edici hormon) ve LH (Luteinize edici hormon) da baskılanma gibi endokrin değişiklikler görülmesi fitoöstrojenlerin menopoz öncesi dönemdeki kadınlarda antiöstrojenik etki gösterdiğini kanıtlar niteliktedir [Lu ve ark., 2001].

### **2.6.2. Antikarsinojenik Aktivite**

Kanser; düzensiz hücre büyümesi, invazyon ve hücrelerin orjinden vücudun diğer bölümlerine yayılmaları ile karakterize edilen hastalık grubudur. Kanser bir kitle ya da tümör oluşumuna yol açtığını bildiğimiz kontrolsüz hücre proliferasyonu (çoğalması) karakterize edilmiş olan neoplazinin (patolojik anlamda yeni doku oluşumu) daha kesin formlarını tanımlamak için kullanılır. Bununla birlikte neoplazinin kanser olabilmesi için, malign (habis, kötü huylu) özellik göstermesi, bir başka deyişle kontrolsüz büyümesi, komşu dokuları istila edebilmesi veya yakın-uzak mesafelere yayılabilme (metastaz; herhangi bir organdaki kanser hücrelerinin vücudun başka bir bölümüne atlaması) özelliğine sahip olması gerekmektedir. Tümörler metastaz yapmıyorlarsa kanseröz değildir ve bu durumda, benign-iyi huylu-tümör olarak adlandırılır. Tümör; normal dokuların gelişmesini aşan, normal

dokulara uyum göstermeyen ve kendisini oluşturan uyarının yok olması durumunda bile büyümeye devam eden anormal doku kitlesidir. Kansere ise, tüm kötü huylu tümörleri kapsayan bir terimdir [Nussbaum ve ark., 2005].

Kanser tüm dünyada hızla çoğalan bir sağlık problemi olup, kalp hastalıklarından sonra ikinci önemli ölüm sebebidir. 100' ün üzerinde kanser tipi sınıflandırılmıştır. Kanselerin yaklaşık % 85'i epitel hücrelerinde meydana gelmekte ve karsinoma olarak sınıflandırılmıştır [Doll ve Peto, 1981]. İzoflavonların meme kanseri, prostat kanseri, kolon kanseri, menopoz semptomları, kardiyovasküler hastalık ve osteoporoz gibi hormon hastalıklarına karşı yararlı etkilerinin bulunması, fitoöstrojen içeriğince zengin soyalı ürünlerin tüketimine olan ilgiyi arttırmıştır [Adlercreutz ve ark., 1991; Lee ve ark., 1991; Cho ve ark., 2009; Rabiau ve ark., 2010].

Fitosteroller, tümör oluşumunda önemli rol oynayan DNA topoizomeras I ve II, tirozin kinaz, ribosomal S6 kinaz, 5a-redüktaz enzimlerinin etkinliklerini baskılamaktadırlar. Ayrıca fitoöstrojenlerin antiproliferatif özellikleri, hücrelerin bölünerek çoğalmasını önlemekte, antiangiogenetik etki ile de tümör hücrelerinin metastaz yapmalarını azaltmaktadır [Umland ve ark., 2000].

FDA (Gıda ve İlaç İdaresi), soya fasulyesinin, hormon ilişkili olsun olmasın pek çok tipteki kanserli hücrenin (prostat, mide, meme, bağırsak, rahim, deri, akciğer ve kolon kanseri gibi) oluşmasını engellediğini ortaya koymuştur. İçeriğindeki genistein anormal hücre oluşmasına neden olan enzimlerin aktivitesini ortadan kaldırarak bu etkiyi sağlamaktadır [Barnes ve ark., 1995].

Göğüs kanseri, kadınlarda akciğer ve kolorektal kanserden sonra kanserlerden ölümlerin en sık üçüncü nedenidir [Baring ve ark., 1993; Spratt ve ark., 1995]. Akciğer kanserinden sonra, dünyada görülme sıklığı en yüksek olan kanser türüdür. Göğüs kanserine karşı fitoöstrojenlerin koruyucu olabileceğine dair çeşitli dayanaklar vardır. Asya ülkelerinde göğüs kanserinin görülme sıklığının batı toplumlarına göre daha az olması ve bu bölgede yaşayan insanların soya ve soyalı ürünleri fazla tüketmesinden dolayı, fitoöstrojenlerin koruyucu etki gösterebileceğini



düşündürmektedir. Fitoöstrojen molekül çeşidi olan izoflavonların aglikon yapısındaki Genistein, göğüs kanseri hücrelerine karşı güçlü büyüme inhibitör etkisine sahiptir. Genistein protein tirozin kinaz (PTK) inhibitörü olarak tanımlanmıştır. PTK'lar hücre büyümesinin kontrolünde, onkogeneizde, apoptozda önemli rol oynamaktadır [Bingham ve ark., 1998].

Göğüs kanseri risk faktörleri içerisinde steroid hormon düzeyleri ve menstrual siklus uzunluğu da yer almaktadır. Mamaryan epitelyal hücrelerin steroid hormonlarına maruz kaldığı süre ne kadar uzun ise, göğüs kanseri riski de o kadar fazla olmaktadır. Fitoöstrojenler, menstrual siklusu uzatarak ve östrojen düzeyini azaltarak göğüs kanseri riskini azaltabilir. Japon kadınların kan ve idrarında batılı kadınlara göre daha yüksek izoflavon düzeyi saptanmış ve buna bağlı olarak menstrual siklusun anlamlı şekilde uzadığı gözlenmiştir. Batıda menstrual siklus 26-28 gün sürerken, Asya'da bu sürenin 32 gün kadar olduğu bilinmektedir [www.turkmedikal.com, 2011].

Amerika'da 1996–1998 yılları arasında 83 prostat kanserli ve 107 kontrollü çalışmada, kumestrol ve daidzeince zengin diyetin genisteine göre önemli şekilde kanseri azalttığı gözlemlenmiştir [Adlercreutz, 1998]. İnsan prostat epitel hücrelerinde iyi ve kötü huylu tümör gelişiminde daidzein güçlü inhibitör etki gösterirken, onun metaboliti olan ekuol, mikromolar konsantrasyonlarda bile daha güçlü inhibitör etki göstermektedir. Daidzeinin ekuole dönüşmesi prostat kanserini önleyici diyetle önemli bir faktördür [Hedlund ve ark., 2003]. Yapılan bir çalışmada; her gün düzenli soya sütü kullanan erkeklerde prostat kanseri riski düşük olduğu görülmüştür [Ganry, 2005].

*In vitro* çalışmalarda yüksek fitoöstrojen konsantrasyonlarının kanserli hücre büyümesini inhibe ettiği görülmüştür [Adlercreutz ve ark., 2000]. Ayrıca genistein, insan mide kanser hücrelerinin gelişiminin inhibisyonunda, apoptozisi uyaran temel bileşikler olduğu gözlenmiştir [Yanagihara ve ark., 1993]. Genistein hücre büyümesinde önemli rol oynayan tirozin kinaz enzimini engelleyerek kanser riskini azaltmaktadır [Büyüktuncer ve Başaran, 2005].

### 2.6.3. Antioksidan Aktivite

Vücutta antioksidatif koruma sisteminin iyi çalışmadığı durumlarda serbest radikallerin fazlaştığı görülmektedir. Bu da vücutta bazı hasarlara neden olmaktadır. Serbest radikallerin miktarı arttıkça önce yaşlanma hızlanır, ardından hücre ölümü, doku ölümü daha sonra ise beyin damarlarının tahribatına varan hasarlar oluşmaktadır [Bilaloğlu ve Harmandar, 1999].

İzoflavonlar, serbest radikalleri doğrudan veya antioksidan enzimleri etkileyerek, oksidatif DNA hasarını önleyebilirler. İzoflavonlar ayrıca seks hormonu bağlayıcı globülinlere (SHBG) bağlı halde olan östrojen ve testosteronu ayırarak, hedef hücrelere ulaşan hormon düzeylerini de değiştirebilir [Adlercreutz, 1998]. Fitoöstrojenlerin antioksidan özellikleri lipit oksidasyonu ve membran lipit peroksidasyonunu azaltarak koroner kalp hastalığına karşı koruyucu olabilmektedir. Genistein, izoflavonlar içinde en yüksek antioksidan aktiviteyi gösteren bileşik olarak bildirilmektedir [Knight ve Eden, 1996].

Soy izoflavonların konjuge halka yapıları ve hidroksil grupları sayesinde potansiyel antioksidan olarak, superoksit anyonları ve lipit peroksid radikallerini temizledikleri ve serbest radikaller ile ilişkili olaylarda hidrojenasyon veya kompleks yapılar oluşturarak okside edici ajanları stabilize edebildikleri de gözlenmiştir [Kelly ve ark., 2002; Kulling ve ark., 2002; Üstündağ ve ark., 2005]. Soy izoflavonların bu özellikleri yanı sıra düşük dansiteli lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonunun önlenmesinde etkili oldukları ve bu etkilerini direkt veya indirekt gösterebildikleri ileri sürülmüştür. LDL oksidasyonunun önlenmesinde yüksek dansiteli lipoproteinler (HDL) aracılığıyla gerçekleşen olaylarda antioksidan bir enzim olan paraoksonaz enzimi önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir [Mackness ve ark., 1996; Üstündağ ve ark., 2005].

## 2.7. $\beta$ -Glukozidaz Enzimi

$\beta$ -glukozidaz; çeşitli disakkaritlerin, oligosakkaritlerin, bir aril ya da alkil aglikon ve glukoz arasında ya da iki veya daha fazla aglikon artıklar arasında olan  $\beta$ -D-glukozitlerin,  $\beta$ -1,4 glukozidik bağlarının seçici bölünmesini katalize eden glukozit hidrolaz enzimlerinin önemli bir grubunu oluşturmaktadır. Hidrolazlar C-C, C-N, C-O ve diğer bazı bağları, su molekülü ilave ederek parçalayan enzimlerdir [Yan ve ark., 2008; Zotta ve ark., 2007; Kara ve ark., 2011].

Selülozun hidrolizinden sorumlu olan  $\beta$ -glukozidaz enzimi, mikroorganizmalar tarafından üretilen ve izoflavon glukozidazları sağlık açısından yararlı olan biyoaktif izoflavon aglikon formuna dönüştüren önemli bir enzimdir. Ayrıca selülozun yeryüzünde en bol bulunan substrat olması ve gelecekte önemli yenilenebilir bir enerji kaynağı olma ihtimalinin yüksek olmasından dolayı, selülitik mikroorganizmalardaki  $\beta$ -glukozidaz son zamanlarda birçok araştırmanın odak noktasını oluşturmuştur [Tomme ve ark., 1995; Bothast ve Saha ; 1997; Kara ve ark., 2011].

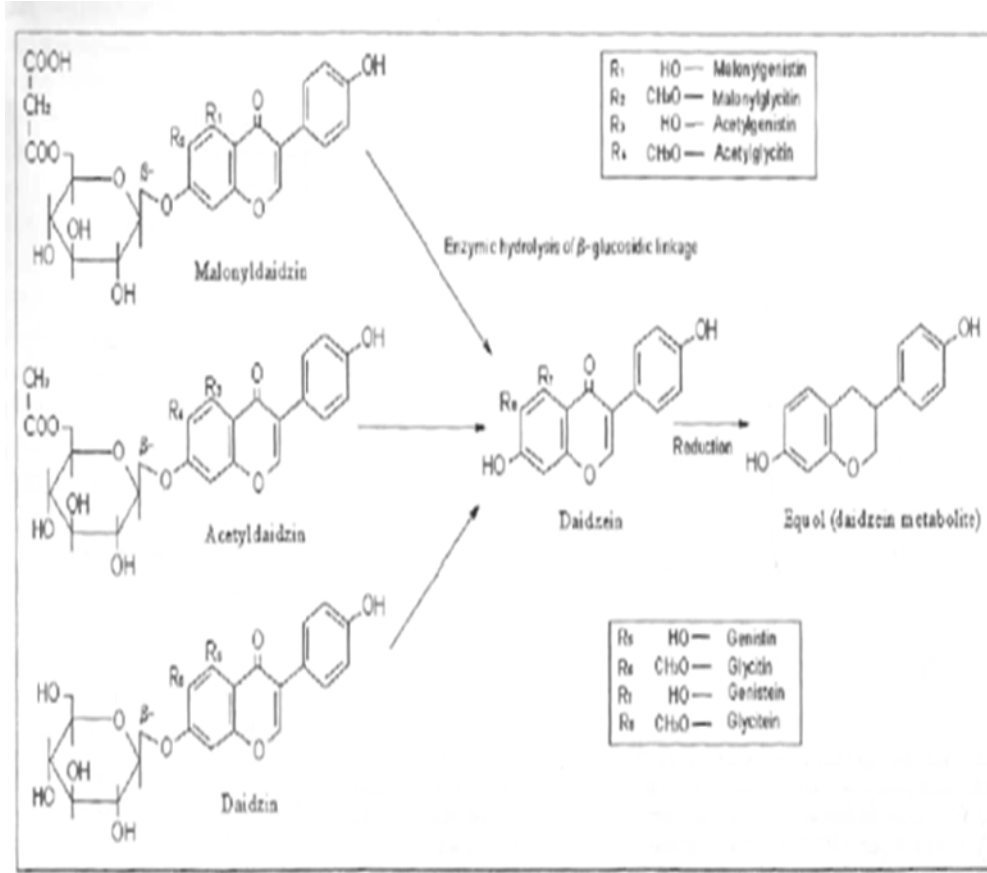
$\beta$ -glukozidaz enzimi; biyoteknoloji, gıda sanayi ve farmakoloji gibi alanlarda yaygın kullanımıyla ticari öneme sahiptir.  $\beta$ -glukozidazlar, bitki zararlıları ile mücadelede, çimlenme sırasında endospermin hücre zarının zayıflamasında ve şarabın, çayın, meyve suyunun kalitesinin iyileştirilmesinde ve aromatik bileşiklerin üretiminde önemli rol oynamaktadır [Gueguen ve ark., 1999; Esen, 2003; Aksoy, 2010].  $\beta$ -glukozidazların meyvelerde bağlı haldeki glukozidik yapıyı hidrolize ederek aroma maddelerini serbest hale getirdiği düşünülmekte, ayrıca alkollü içkilerde aroma gelişiminin sağlanması bakımından oldukça önemlidir [Aksoy, 2010].

$\beta$ -glukozidazlar, bitkilerde, küf ve mayalarda daha yaygın olarak bulunmaktadır [Esteve-Zarzos ve ark., 1998]. Birk ve ark. [1997] yapmış oldukları bir çalışmada, endüstriyel mikroorganizmalar arasında en verimli  $\beta$ -glukozidaz enzimi üreten mikroorganizmanın *Aspergillus niger* olduğu bildirmişlerdir. Günata ve ark. [1990], küf (*Aspergillus niger*) ve mayadan (*Candida molischiana*, *Candida wickerhamii*)

sağlanan  $\beta$ -glukozidazlarla yaptıkları çalışmalar sonucunda, bitki kaynaklı  $\beta$ -glukozidazların birincil alkollerin  $\beta$ -D-glukozidlerini parçalarken, küf kaynaklı  $\beta$ -glukozidaz enziminin aglikon yapısına daha az etki ettiğini saptamışlardır. Maya kökenli  $\beta$ -glukozidaz enzimlerinin, tersiyer alkollerin  $\beta$ -D-glukozidlerinin parçalanmasında oldukça etkili olduğunu bildirmişlerdir.

$\beta$ -glukozidaz enziminin laktik asit bakterileri ve bifidobakteriler tarafından da üretildiği bildirilmiştir [Otieno ve ark., 2006, Chun ve ark., 2008, Donkor ve Shah, 2008, Marazza ve ark., 2009]. Bağırsak mikroorganizmaları tarafından üretilen  $\beta$ -glukozidaz enziminin, insanlarda izoflavonların biyoyararlanım ve metabolizmasının önemli rol oynadıkları ileri sürülmektedir [Setchell, 2000; Chun ve ark., 2008]. İşlenmiş soya ürünleri olan miso ve tofu, asyalıların diyetlerinde izoflavonların ana kaynağını oluşturmaktadır. Miso ve tofuların hazırlanması sırasındaki fermantasyon sürecinde, mikroorganizmalar tarafından üretilen  $\beta$ -glukozidaz enzimi ile kırılan  $\beta(1-4)$  glukozidaz bağı koparılarak, insan metabolizmasına yararlı etkide bulunmayan fenolik bileşik olan izoflavonlar yararlı forma dönüştürülmektedir [Liggins ve ark., 1998].

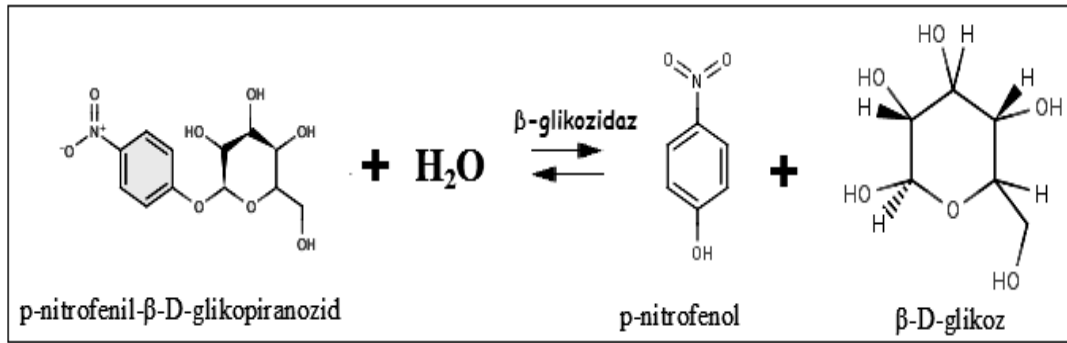
İzoflavonların biyolojik aktiviteleri glukozit formlarından (genistin, daidzin, glisitin) değil, aglikon (genistein, daidzein, glisitein) formlarından kaynaklanmaktadır [Hendrich, 2002; Kawakami ve ark., 2005]. Aglikonlar östrojen aktivitesine sahip olan tek gruptur. Aglikonlar bağırsak duvarı içinden direkt emilmekte, izoflavon glukozidler ise yüksek molekül ağırlıkları ve yüksek hidrofilik özellikleri nedeniyle çok yavaş emilmektedirler [İzumi ve ark., 2000] Mikroorganizmalar, hücre içinde sentezledikleri  $\beta$ -glukozidaz enzimleri ile izoflavonların  $\beta$ -glukozit bağını kopararak glukozitlerin aglikonlara dönüşümünü sağlamaktadırlar [Liggins ve ark., 1998]. Böylelikle serbest formdaki izoflavonların konsantrasyonları ile birlikte yararlılıkları da artmaktadır. Şekil 2.7'de izoflavonların glikozit formu olan genistin,  $\beta$ -glukozidaz enzimi ile genisteine hidrolizi gösterilmektedir.



Şekil 2.7. İzoflavonların izomer yapıları ve bakteriyal kaynaklı enzimin hidroliziyle dönüşümleri [Tsangalis ve ark., 2002].

Kanser gibi çeşitli kronik hastalıkların önlenmesinde izoflavon aglikonlarca zengin gıdaların, glukozit bakımından zengin gıdalardan daha etkili olabileceği düşüncesi nedeniyle hidrolizasyon oldukça önemlidir [Choi ve ark., 2002]. Yüksek  $\beta$ -glukozidaz aktivite gösteren suşların, izoflavonların glukozit formunu (genistin, daidzin) aglikon formuna (genistein, daidzein) dönüştürerek, genistein ve daidzeinin, tümörlerin beslenmeleri için gerekli olan yeni kan damarlarının oluşumunu ve tümör büyümesini destekleyen enzimleri engellemesi açısından da kansere karşı yapılacak çalışmalar için önemlidir [Hertog, 1995]. Bu nedenle bakterilerin, izoflavonların glukozit formlarını sağlık açısından yararlı olan aglikon formuna hidrolize edebilmeleri için, yüksek  $\beta$ -glukozidaz aktivite yeteneğine sahip olmaları gerekliliği düşüncesindeyiz.

p-nitrofenil-β-D-glukopiranozit (p-NPG) substrat olarak kullanılarak, β-glukozidaz aktivite gösteren laktik asit bakterileri ve bifidobakteriler ile birlikte hidrolizasyonu gerçekleştirilebilir (Şekil 2.8). İzoflavonların mikroorganizmalar tarafından glukozit formundan aglikon formuna hidrolizasyonu yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile belirlenmektedir [Choi ve ak., 2002].



Şekil 2.8. p-nitrofenol-β-D-glukopiranozitin β-glukozidaz enzimi ile hidrolizi [Lecas ve ark., 1991].

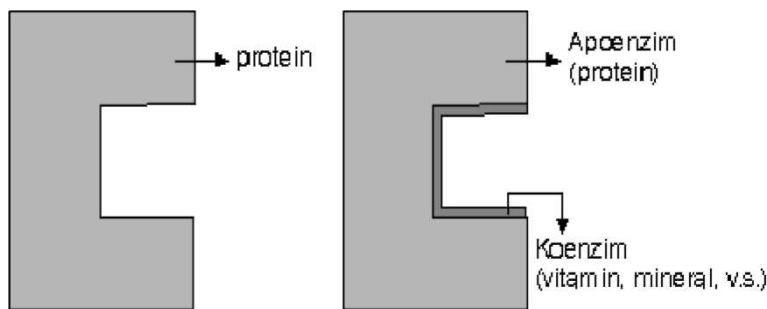
## 2.8. Enzimlerin Genel Özellikleri

Enzimler; reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşürerek substratın ürünler yönünde ilerlemesini sağlayan protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç bütün enzimler proteindirler. Kelime anlamıyla enzim "maya=ferment" anlamına gelmektedir. Enzim, ilk olarak 1700 yılında, midenin salgıları ile etin sindirimi üzerinde yapılan çalışmalarda keşfedilip, tanımlanmıştır. Sonraki araştırmalar, 1800'lerde tükürük ve çeşitli bitki özütleriyle nişastanın şekere dönüşümü çalışmalarıyla devam ettirilmiştir [Ersöz, 2010].

İnsanlar çok eski zamanlardan beri enzimatik reaksiyonlardan yararlanmışlardır. Örneğin; şarap, yoğurt, ekmek, sirke, boza yapımında yine canlılar tarafından üretilen enzimlerden faydalanılmış, fakat bu olaylarda enzimlerin katalitik etkilerinin nasıl olduğu bilinmemiştir. Yeni enzimlerin izolasyonu ve özelliklerinin araştırılması biyokimya bilimini de geliştirmiştir. Enzim üretiminde hammadde sorunu mikrobiyal kaynakların geliştirilmesiyle çözülmüştür. Ancak, enzimlerin

mikrobiyal kaynaklardan izolasyon ve saflaştırılması zor ve oldukça masraflıdır [Nelson ve Cox, 2008].

Enzim reaksiyonlarında yan ürün meydana gelmez, verim % 100'dür. Vücuttaki biyokimyasal reaksiyonları katalize eden ve suda çözünen enzimler spesifik katalizörlerdir, etki ettikleri maddeler tek ve belirlidir. Enzimler reaksiyon hızını oldukça arttırmaktadırlar. Örneğin; dakikada 36 milyon molekülü değişikliğe uğratabilmektedirler. Enzimlerin etkileyip değişikliğe uğrattığı moleküle "**substrat**" adı verilmektedir [Tüzün, 1991]. Enzim, biyokimyasal reaksiyonda substratı değiştirip ürüne dönüştürürken, kendisi değişikliğe uğramaz. Enzimler canlı hücreler tarafından biyolojik koşullarda sentez edilirler, fakat aktivite göstermeleri için hücre içinde bulunmaları gerekmez. Enzimlerin aktivite göstermeleri için gerekli olan ve protein yapısında olmayan genellikle metal iyonlarından meydana gelmiş olan yan gruplarına **kofaktör** adı verilmektedir. Pek çok enzim kofaktör olarak  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  iyonlarına gereksinim duyar. Enzimlerin aktivite göstermeleri için gereksinim duydukları organik moleküllere ise "**koenzim**" adı verilmektedir. Koenzimler; enzimlerin kopardığı ya da eklediği kimyasal grupların taşıyıcısı olan organik moleküllerdir. Koenzimlerin öncül molekülleri vitaminlerdir. Eğer enzim koenzimi veya kofaktörü ile birlikte ve katalitik bakımından tamamen aktif durumda ise, enzimin bu haline **holoenzim** adı verilmektedir. Eğer koenzim ve kofaktör enzimden ayrılacak olursa ve enzimde inaktif hale gelirse, enzimin bu haline de **apoenzim** adı verilmektedir. Apoenzim, protein özelliğinde olan ve yalnızca amino asitlerden oluşan taşıyıcı kısımdır. Şekil 2.9'da enzimlerin genel yapısı görülmektedir [Uyanık, 2008].



Şekil 2.9. Enzimlerin genel yapısı [Uyanık, 2008].

### 2.8.1. Enzim Reaksiyonlarını Etkileyen Faktörler

#### Sıcaklık

Bütün kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi, her enzim reaksiyonunun da gerçekleştiği optimum bir sıcaklık düzeyi vardır. Optimum noktanın biraz üzerinde enzimler etkisiz olmasına karşın, sıcaklık düşüncü tekrar etkili hale geçebilirler. Fakat bu sıcaklığın devamı ya da sıcaklığın biraz daha yükselmesi enzimlerin etkinliğini sonsuz olarak ortadan kaldırır. Enzimlerin etkisiz hale geçmeleri ile proteinlerin koagüle olması arasında büyük bir ilişkinin olması onların büyük bir kısmının proteinlerden yapıldığını kanıtlar. 0 °C'da enzim ya hiç ya da pek az işlev gösterir fakat soğğun enzimin yapısını bozduğu görülmemiştir. Sıcaklık eski hale döndüğünde enzimin etkinliği yeniden başlar. Sabit sıcaklıklı canlılarda enzimler çoğunlukla 37 °C'da optimum etkindirler. Daha yüksek sıcaklıklarda enzimler etkisizleşirler, çok defa da koagüle olurlar [Öztaş, 2007].

#### pH

Enzim reaksiyon hızı, farklı hidrojen iyonu konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Enzimler pH değişimine karşı oldukça duyarlıdır. Genellikle çok fazla asidik ve alkalik ortamda etkisizdirler. Bazı hallerde enzimler en yüksek etkinliği belirli bir pH derecesinde gösterirler. Bu pH derecesine "optimum pH" denir. Enzimlerin aktivite gösterdikleri optimum pH değeri, enzimden enzime farklılık göstermektedir. Örneğin, proteini parçalayan pepsin, midenin pH'nin 2 olduğu asidik ortamında maksimum çalışırken; pankreastan salgılanan ve yine protein sindiriminde rol alan tripsin; ancak pH=8,5'de optimum olarak çalışabilir. Optimum pH değeri tampon sistemleri ile sağlanmaktadır. Kuvvetli asitler ve bazlar enzimleri koagüle etmektedirler [Uyanık, 2008].

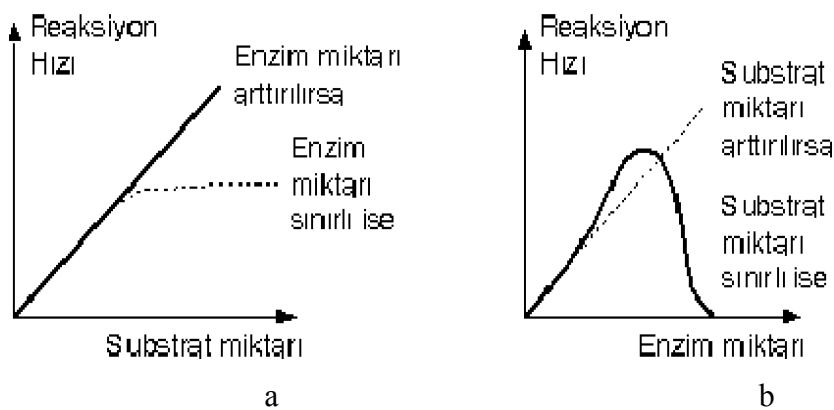


### Substrat Konsantrasyonu

Substrat tükenmesi reaksiyon hızının düşmesinde başlıca etmendir. Çünkü substrat azaldıkça enzim substratı ile doygunluğu yani saturasyonu azalır ve buna bağlı olarak reaksiyon hızında düşme görülür. Substrat derişimi sıfır olduğunda ise, reaksiyon tamamen durur. Reaksiyon hızının düşmesine neden olan esas etmen, substrat tükenmesi ise ortama substrat ilave edilmesi, reaksiyon hızının azalmasını geciktirecektir [Özta, 2007].

### Enzim Konsantrasyonu

Enzim reaksiyonunun hızı, enzimin substrata doygun olduğu durumlarda enzim konsantrasyonuna bağıli olarak lineer bir şekilde artmaktadır (Şekil 2.10.a). Bunun nedeni her bir enzim molekülün diğeri enzim molekülünden bağımsız olarak davranmasıdır. Ortamdaki enzim moleküllerinin çalışma hızına ve substrat miktarına bağıli olarak reaksiyon hızı değışmektedir (Şekil 2.10.b). Enzim aktivite ölçümlerinde güvenilir sonuçlar elde etmenin en önemli koşullarından birisi de, çok sağıklı blank (körv) ve kontrol ölçümleri yapmaktır.



Şekil 2.10. Enzim reaksiyon hızı [Uyanık, 2008]

## Su

Enzim reaksiyonlarının gerçekleşebilmesi için ortamda belirli oranda su bulunması gerekir. Moleküllerin birbirine çarparak reaksiyonu gerçekleştirebilmesi için sıvı bir ortamın olması gerekir. Enzimlerin büyük bir kısmı işlevlerini su içerisinde gösterdiklerinden, suyun miktarı da enzim işlevinde etken bir koşuldur. Genellikle % 15'in altında su içeren ortamlarda, enzimler işlev göstermezler [Uyanık, 2008].

## Kimyasal Maddeler

Bazı kimyasal maddeler enzimleri etkisiz hale getirmektedir. Örneğin; siyanit, solunumda önemli rol oynayan sitokrom oksidaz enzimini etkileyerek inhibe etmektedir. Florit, glikozu laktik aside çeviren enzim kademelerine etki etmektedir. Böyle kimyasal maddeler enzim reaksiyonu azaltarak olumsuz etkiledikleri için bunlara inhibitörler denilmektedir. Ancak bazı maddelerin ortamda bulunması enzim reaksiyonunu hızlandırmaktadırlar. Bu maddelere de aktivatörler denilmektedir.  $K^+$  ve  $Mg^{2+}$  gibi bazı iyonlar ve su aktivatör örnek olarak kullanılan maddelerdir [Uyanık, 2008].

## **2.9. Enzim Aktivitesinin Hesaplanması**

Enzim aktivite tayininde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Aktivite tayinlerinde genellikle ya kaybolan substrat miktarı ya da meydana gelen ürün miktarı tayin edilerek enzimlerin aktiviteleri ölçülür. Enzim aktivite tayininde, spektrofotometrik, monometrik, thunberg, elektrot, polimerik, kromatografik ve kimyasal tayin yöntemleri kullanılmaktadır [Gözükara, 1997].

Enzim aktivite tayininde yöntem seçerken metodun pratik oluşuna ve kısa sürede yapılışına, ayrıca hassas oluşuna da özen göstermek gerekir. Bu nedenle enzim aktivitesi tayininde kolaylığı, basitliği ve hassas oluşu nedeniyle daha çok spektrofotometrik yöntem kullanılmaktadır. Birçok enzim substratı, ürünü veya koenzimi, görülen ışıktaki veya ultraviyole ışıktaki bir tepe değeri göstererek, absorbans

vermektedir. Bu takdirde ya substratın kaybolması ya da ürünün meydana gelişi gibi koenzimdeki değişiklik spektrofotometreden tayin edilir. Bir enzimin aktivitesini çeşitli şekilde ifade etmek mümkündür. Örneğin, 1 mg enzim proteini tarafından birim zamanda meydana getirilen absorbans değişimi ( $dA/dt$ ) bir birim olarak ifade edilir. Fakat elde edilen sonuçları karşılaştırabilmek için daha standart bir birim ifadesi geliştirilmiştir. Uluslar arası ünite (IU) veya enzim ünitesi (U) olarak ifade edilmektedir. Bir ünite enzim bir dakikada bir  $\mu\text{mol}$  ürünün oluşumu veya 1  $\mu\text{mol}$  substratın dönüşümünü katalizleyen enzim miktarıdır ( $U=\mu\text{mol/dak}$ ). Enzimatik reaksiyonda oluşan ürün (veya dönüşen substrat) spektral yöntemle kolaylıkla izlenir ve enzim aktivitesi temelde Beer-Lambert yasasına dayanan formül ile hesaplanmaktadır [Temizkan ve ark., 2008].

$$\text{Örnekteki enzim ünitesi} = \frac{V_t \times dA/dt \times 1000 \times \text{sulandırma faktörü}}{\epsilon \lambda \times v_s \times d} = (U/l)$$

$\epsilon_\lambda$  = Absorpsiyon katsayısı ( $\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$ )

$d$  = Küvetin ışık yolu (genellikle 1 cm)

$dA/dt$  = Birim zamanda (dakikada) absorbans değişimi ( $\text{dak}^{-1}$ )

$V_t$  = Reaksiyon karışımının toplam hacmi (ml)

$v_s$  = Reaksiyona katılan örnek (enzim) hacmi (ml)

Enzim aktivitesini tanımlamak için kullanılan diğer birim ise spesifik (özgün) aktivitedir. Bir enzimin spesifik aktivitesi ise 1 mg protein başına düşen enzim ünitesinin sayısıdır. Saf bir enzimin spesifik aktivitesi sabittir ve o enzime özgü bir değerdir [Telefoncu,1997]. Spesifik aktivite özellikle bir enzimin saflığını kabaca tanımlamak için kullanılmaktadır [Temizkan ve ark., 2008].

Spesifik aktivite = U/mg protein
----------------------------------

## 2.10. Enzimlerin Saflaştırılması

Enzimler yalnızca canlı hücreler tarafından sentezlenen, metabolizma reaksiyonlarını hızlandıran, protein yapısında ki biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin bir kısmı hücre içerisinde kalarak burada fonksiyon göstermektedir. Bu tip enzimlere “*intraselüler*” (hücre içi) enzimler denir. Bazı enzimler ise hücre içinde sentezlendikten sonra hücre dışına salınarak burada fonksiyon göstermektedir. Bu tip enzimlere “*ekstraselüler*” (hücre dışı) enzimler denir [Özta, 2007].

Proteinlerin enzimatik kataliz, transport, depolama, sinir impluslarının transmisyonu, immün koruma, büyüme ve farklılaşmanın kontrolü gibi fonksiyonları vardır. Proteinlerin saflaştırılması bu fonksiyonları yapan molekülün belirlenmesi ve endüstriyel amaçla kullanımının araştırılması açısından oldukça önemlidir [Telefoncu,1996].

Bilimsel araştırmalar için az miktarda protein üretimi yeterli iken, endüstriyel uygulamalar için büyük ölçekte protein gerekmektedir ve saflık ikinci derecede önem taşımaktadır. Protein üretimi zaman ve maliyet gerektiren bir çalışma olduğu için ihtiyaç duyulan saf protein miktarı ve saflık düzeyinin ayrıca aktivite kaybını en aza indirmek için gerekli sürenin önceden belirlenmesi gerekmektedir. Protein saflaştırılmasındaki adımlar denatürasyon ve proteolizi minimuma düşürecek şekilde seçilmelidir [Telefoncu,1996]. Enzimlerin hücrede buldukları yeri, etkinliklerini, miktarını, saflık derecelerini belirlemenin en etkili yolu aktivitelerini belirlemektir. Enzimler gibi miktarı az, yapısı oldukça kompleks olan bileşiklerin saflaştırılması için özel enzimolojik tekniklerin kullanılması gerekmektedir [Ersöz, 2010].

### 2.10.1. Belirli enzim ayırma ve saflaştırma işlemleri

#### Enzim kaynağından enzimin çıkarılması

Bu işlem her kaynak için farklı şekilde yapılmaktadır. Ekstraselüler enzimler için enzimin izole edilmesinde ekstra bir işlem gerekmez ancak intraselüler enzimlerde

hücre duvarı ve zarı hücre içeriğinin dışarı çıkarılmasında engel teşkil edeceği için enzimin izole edilmesinde bir takım işlemler gerekmektedir. Örneğin bakteriler de sonikasyon (ultrasonik ses dalgaları ile parçalama), glass beads (cam bilyelerle parçalama), dondurup-çözme yöntemleri kullanılırken, bitkiler de ezme yöntemi kullanılabilir [Angal ve Harris, 1990; Özbek ve Ülgen, 2000; Numanoğlu ve Sungur, 2004].

### Santrifüjleme

Santrifüjleme; enzim kaynağından enzimin izole edilmesinin ardından, ortamdaki hücre organelleri ve büyük partiküllerin uzaklaştırılması için uygulanan bir yöntemdir. Bu teknik santrifüj cihazı yardımıyla, yüksek hızda döndürülerek merkezkaç kuvveti oluşturulan bir alanda partiküllerin davranışı temeline dayanmaktadır [Temizkan ve ark., 2008].

### Amonyum sülfat ile çöktürme

Tuzla çöktürme proteinlerin konsantre edilmesinde ve saflaştırılmasında geniş çapta kullanılan bir yöntemdir. Tuz iyonları solvatasyona büyük ilgileri nedeniyle hidrofob gruplar etrafındaki düzenli su moleküllerini uzaklaştırırlar. Böylece bu grupların birbirleri ile olan etkileşimleri artmaktadır. Ortama eklenen nötral tuz, genellikle denatürasyona yol açmadan, proteinlerin agregasyonuna (bir araya gelmelerine) ve çözeltilerden ayrılarak çökmelerine yol açar. Proteinler farklı tuz konsantrasyonlarında çöktürülerek birbirlerinden ve çözeltideki diğer moleküllerden ayrılabilir. Çöktürme işleminde genellikle etkinliği ve çözünürlüğü yüksek, pH'yı fazla etkilemeyen, çözeltide fazla ısınmaya yol açmayan, ucuz ve etkin bir tuz olan amonyum sülfat  $[(NH_4)_2SO_4]$  kullanılır. Bu nedenle yöntem amonyum sülfat çöktürmesi adıyla da bilinmektedir [Temizkan ve ark., 2008].

Protein çözeltilerinde hidrofobik alanları büyük ve daha fazla olan proteinler, hidrofobik alanları küçük ve daha az olanlarınkine göre daha çabuk birbirleri ile etkileşerek çökerler. Bu olaya proteinlerin fraksiyonlanması denir. Bu işlem için

protein çözeltisine farklı derişimlerde amonyum sülfat eklenir, oluşan çökelti santrifüjleme ile geri elde edilir ve uygun bir tamponda tekrar çözülür. Her çözeltide ilgili protein, analiz yöntemleriyle aranır. Bu şekilde ilgili proteinin bulunduğu çökelti fraksiyonu, diğer protein fraksiyonlarından uzaklaştırılmış olunur. Böylece çöktürme işlemi ile kısmi bir saflaştırma yapılmış olunur [Demirkan, 1995].

Birçok protein %55 amonyum sülfat doygunluğunda çökmektedir. %80 doygunluk genelde tümünün çökmesini sağlamaktadır. Çözeltinin istenilen konsantrasyona (% doygunluğa) ulaşması için ortama eklenmesi gereken tuz miktarı aşağıdaki formülden hesaplanmıştır [Temizkan ve ark., 2008].

$$g(NH_4)_2SO_4 = \frac{505(S_2 - S_1)}{1 - 0,285S_2}$$

$S_1$ = Amonyum sülfatın başlangıç konsantrasyonu (%)

$S_2$ = Amonyum sülfatın son konsantrasyonu (%)

Amonyum sülfat ile fraksiyonlamanın bir avantajı, proteinleri stabilize etmesidir. 2-3 M amonyum sülfat içeren bir protein çözeltisi veya kristalleri yıllarca dayanmaktadır. Yüksek tuz konsantrasyonları proteolizi ve bakteriyel etkileri de engellemektedir. Bu yüzden ticari depolama maddesi olarak kullanılmaktadır [Sarı, 2006].

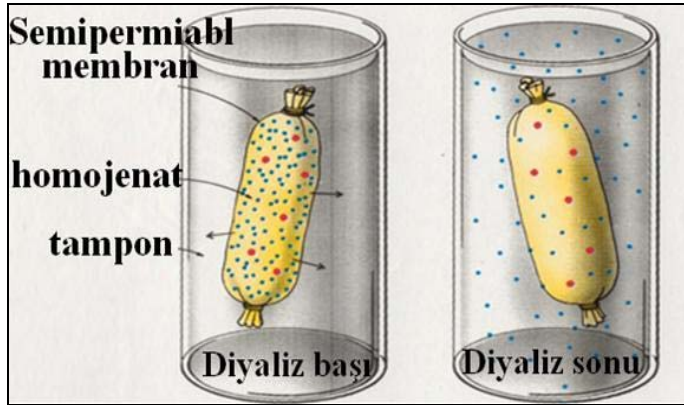
#### İzoelektrik noktaya göre çöktürme

Çalışılmak istenilen enzimin izoelektrik noktasına göre belli bir pH değeri aralığında karıştırılarak çöktürme işlemi uygulandığında, ortamdaki birçok proteinden kurtulmuş olunmaktadır [Özta, 2007].

#### Diyaliz

Seyreltik protein çözeltilerinin konsantre edilmesinde başvurulan en basit yöntemlerden birisi de diyalizdir. Bu yöntem saflaştırmanın belli aşamalarında tuzların uzaklaştırılması veya tamponun değiştirilmesinde kullanılır. Bu işlem için

özel imal edilmiş, genellikle selüloz asetattan yapılmış, gözenekli, gözenekleri 1-20 nm çapında olup küçük molekülleri geçiren ancak büyük molekülleri geçirmeyen yarı geçirgen bir membrandan oluşan diyaliz torbası kullanılır (Resim 2.3). Protein çözeltisi diyaliz torbasına konur ve uygun bir tampon içerisine bırakılır. Çok yavaş bir şekilde karıştırılır. Küçük moleküller membrandaki osmotik basınç dengelene kadar serbestçe membrandan geçerler. Dengeye ulaştığında moleküllerin dış tampona geçmesi durur. Bu nedenle membran içerisindeki tuz veya tamponu tamamen uzaklaştırmak için, membran dışındaki tamponu ya birkaç kez değiştirmek gerekir ya da peristaltik bir pompaya bağlanan özel bir düzenekle sürekli değiştirilir. Protein aktivitesindeki kaybı en aza indirebilmek için, diyaliz genellikle +4°C'da gece boyunca (yaklaşık olarak 16-18 saat) yapılır [Demirkan, 1995; Temizkan ve ark., 2008].

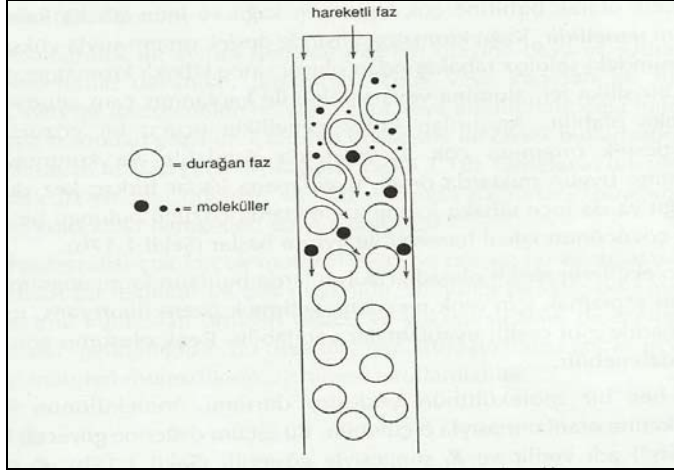


Resim 2.3. Diyaliz [<http://www.biyokure.org>, 1782].

### Kromatografi

Kromatografi, katı veya sıvı durağan fazın yüzeyine ya da içine uygulanmış bir karışımdaki moleküllerin, sıvı veya gaz halindeki mobile faz aracılığıyla hareket ederken birbirlerinden ayrılmaları temeline dayanır (Şekil 2.11). Bu ayrılmaya neden olan etkenler; moleküllerin tutunma, dağılma, iyon değişimi, ilgi özellikleri ya da molekül ağırlıklarındaki farklılıklardır. Bu farklılıklar nedeniyle karışımdaki bileşenlerden bazıları durağan fazda daha uzun süre kalırlar ve kromatografi

sistemindeki hareketleri yavaş olur. Bazıları ise mobile faza daha çabuk geçer ve sistemden daha hızlı ayrılırlar [Temizkan ve ark., 2008].



Şekil 2.11. Kromatografi temelini şematik olarak açıklaması [Temizkan ve ark., 2008].

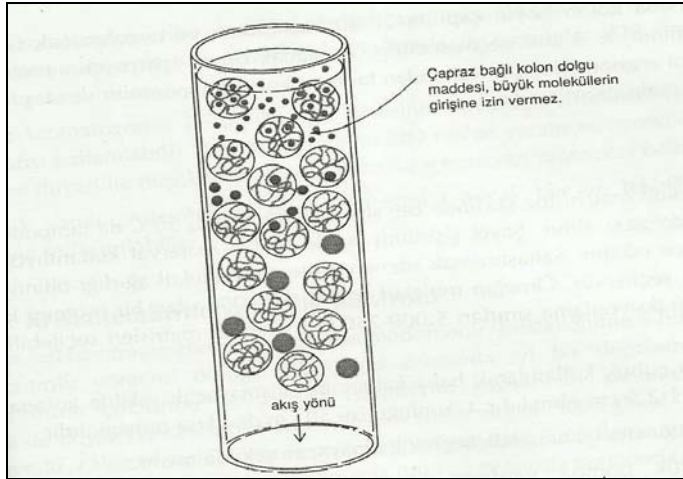
Bileşiklerin bileşenlerine ayrılmasında, duran faz ile bileşenler arasındaki etkileşimin tabiatına göre farklı kromatografik yöntemler geliştirilmiştir. Bu etkileşim molekül büyüklüğüne, polariteye, spesifik bağlanma özelliklerine veya elektrostatik çekim gücüne dayanabilir [Telefoncu, 1996].

*İyon-değişim kromatografisi:* İyonik moleküllerin yüklü bir duran fazla geriye dönüşebilen elektrostatik etkileşime girdikleri bir tutunma kromatografi biçimidir. İyon değişimi kromatografisinin temelini, proteinin yüklü grupları ile katı destek materyali (matris) arasındaki elektrostatik etkileşimler oluşturmaktadır. Matris ayrılacak proteinle zıt yüklüdür ve proteinin kolona bağlanması iyonik bağlarla sağlanır. Proteinler, ya kullanılan tampon çözeltisinin pH'sını ya da tuz konsantrasyonunu değiştirmek suretiyle kolondan ayrılırlar. Pozitif yüke sahip iyon değiştirici matrisler anyon değiştiriciler olarak adlandırılır ve anyonik (negatif yüklü) proteinleri adsorblarlar; negatif yüklü grupların kovalent olarak bağlandığı matrisler ise katyon değiştiriciler olarak bilinir ve katyonik (pozitif yüklü) proteinleri adsorbe ederler [Temizkan ve ark., 2008].

*Jel filtrasyon kromatografisi:* Bu kromatografik yöntemde dekstran esaslı materyallerin kullanılmasıyla, makromoleküller molekül büyüklüklerindeki



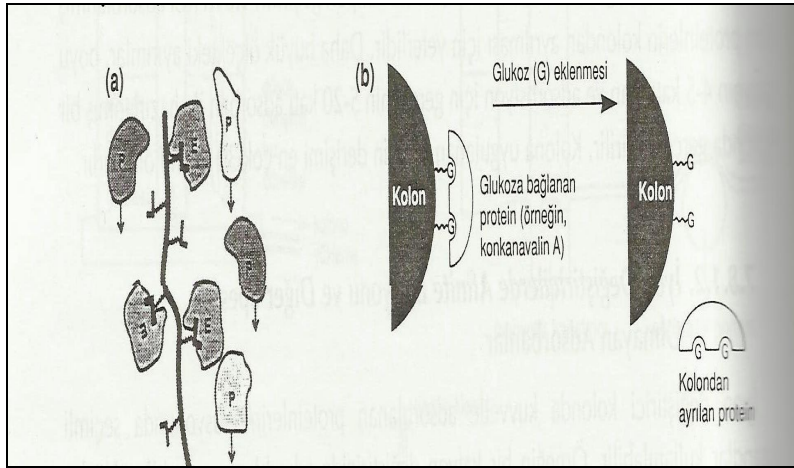
farklılıklara göre ayrılmaktadır. Bu yöntem daha çok proteinlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesi ve protein çözeltilerinin tuz derişimlerinin düşürülmesi için kullanılmaktadır. Kolon küresel yapıli belirli boyutta gözeneklere sahip inert jel parçacıklarından oluşmuştur. Farklı boyutta molekülleri içeren bir çözelti kolondan geçirildiğinde, matriksin gözenek büyüklüğünden daha küçük olan moleküller, matriksin gözenekleri içine girerler ve kolon boyunca oldukça yavaş hareket ederler (Şekil 2.12). Gözenek büyüklüğünden daha büyük olan moleküller ise matriks tarafından dışarı bırakılır ve kolonu öncelikle terk ederler. Ara büyüklükteki moleküller, matriks gözenekleri içine girebilir fakat kolon içinde küçük moleküllerden daha kısa süre kalırlar. Bu şekilde moleküllerin hepsi kolondan azalan büyüklük sırasına göre elue edilmiş olur [Ersöz, 2010].



Şekil 2.12. Büyüklükleri farklı üç proteinin jel filtrasyonu ile ayrılması [Temizkan ve ark., 2008].

*Hidrofobik etkileşim kromatografisi:* Kolonlar hidrofobik uçlu ligandların bağlandığı boncuklarla (dekstran) doldurulur. Ligandlar hidrofobik bölgesi açıkta bırakılan proteinlere bağlanır. Bu şekilde proteinlerin, hidrofobik özelliklerindeki farklılığa göre ayrışması sağlanır. Hidrofilik bölgeleri açıkta bırakılan proteinler ise ligandlara bağlanmaz ve kolondan ilk olarak çıkarlar. Kolona tutunan proteinlerin, tuzun kademeli olarak azaltılması, sıcaklığın ya da pH'nın değiştirilmesi gibi etkilerle kolondan ayrılması sağlanır [Yada, 2004; Ötleş, 2005; Ünlüsayın ve ark., 2009].

*Affinite (İlgi) kromatografisi:* Bu yöntem, kolon dolgu maddesine kovalent olarak bağlanmış ve saflaştırılacak proteine özel affinite göstererek seçinimli bir ayırım sağlayan ligandların kullanılmasıyla gerçekleştirilir. Enzimin saflaştırılmasında ligand olarak o enzimin substratı ya da yapısı substrata benzeyen inhibitör, efektör, kofaktör veya antikör kullanılabilir. Bu molekül ilk olarak çeşitli tutuklama teknikleriyle kolon matrisine bağlanır. Kromatografik ayırım sırasında immobilize liganda özgül ve geri dönüşümlü bağlanma, hedef proteinin yüzeyindeki işlevsel bir bölge tarafından gerçekleştirilir. Böylece hedef proteinin özgün yapısı kaybedilmeden saflaştırılmış olur (Şekil 2.13.) [Temizkan ve ark., 2008].



Şekil 2.13. (a) Affinite kromatografisinin temeli. Ligand bir matris iskeletine bağlanır. Sadece liganda afinite olan enzimler adsorbana bağlanır. Diğer proteinler kolonu terk eder. (b) Kovalent bağlı glukoz birimleri içeren bir kolonda konkanavalin A'nın kromatografisi ile ayırımı [Temizkan ve ark., 2008].

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

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Araştırmada kullanılan bakteriler**

Araştırmada Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan ve moleküler tanımlamaları (16S rRNA) Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde yapılan insan, gıda ve hayvan kaynaklı olmak üzere 39 adet *Lactobacillus* cinsine ait ve yenidoğan gaitasından izole edilmiş olan 3 adet *Bifidobacterium* cinsine ait toplam 42 adet suş kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan bakterilerin tür isimleri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi bakteriler, izolasyon kaynakları ve gelişme sıcaklıkları

	Suşlar	Kodu	İzolasyon Kaynağı	Gelişme Sıcaklığı
Hayvan kaynaklı Laktik Asit Bakterileri	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	BAZ54	Tavuk	37 °C
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	BAZ51	Tavuk	37 °C
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	BAZ59	Tavuk	37 °C
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	BAZ63	Tavuk	37 °C
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	BAZ29	Tavuk	37 °C
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	BAZ43	Tavuk	37 °C
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	BAZ22	Tavuk	37 °C
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	BAZ61	Tavuk	37 °C
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ZYN13	Tavuk	37 °C
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	BAZ36	Tavuk	37 °C
	<i>Lactobacillus salivarius</i>	ZYN9	Tavuk	37 °C
	<i>Lactobacillus salivarius</i>	ZYN15	Tavuk	37 °C
	<i>Lactobacillus salivarius</i>	ZYN23	Tavuk	37 °C
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	ZYN17	Tavuk	37 °C
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	BAZ78	Tavuk	37 °C
	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii</i>	BAZ32	Tavuk	37 °C
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii</i>	ZYN33	Tavuk	37 °C	
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii</i>	ZYN31	Tavuk	37 °C	
Gıda Kaynaklı Laktik Asit Bakterileri	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	SMP6-5	Peynir	42 °C
	<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i>	BKS20	Peynir	42 °C
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ACS6	Peynir	42 °C
	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	B3	Yoğurt	37 °C
İnsan Kaynaklı Laktik Asit Bakterileri	<i>Lactobacillus brevis</i>	LB63	Yenidoğan gaitası	37 °C
	<i>Lactobacillus casei</i>	LB65	Yenidoğan gaitası	37 °C
	<i>Lactobacillus casei</i>	LB68	Yenidoğan gaitası	37 °C
	<i>Lactobacillus casei</i>	LE4	Yenidoğan gaitası	37 °C
	<i>Lactobacillus casei</i>	LE7	Yenidoğan gaitası	37 °C
	<i>Lactobacillus casei</i>	LB17	Yenidoğan gaitası	37 °C
	<i>Lactobacillus casei</i>	LB19	Yenidoğan gaitası	37 °C
	<i>Lactobacillus casei</i>	LB6	Yenidoğan gaitası	37 °C
	<i>Lactobacillus casei</i>	LB23	Yenidoğan gaitası	37 °C
	<i>Lactobacillus casei</i>	LB49	Yenidoğan gaitası	37 °C
	<i>Lactobacillus casei</i>	LB61	Yenidoğan gaitası	37 °C
	<i>Lactobacillus casei</i>	LB83	Yenidoğan gaitası	37 °C
	<i>Lactobacillus casei</i>	LB64	Yenidoğan gaitası	37 °C
	<i>Lactobacillus casei</i>	LB74	Yenidoğan gaitası	37 °C
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	LB16	Yenidoğan gaitası	37 °C
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	GD11	Yenidoğan gaitası	37 °C
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	LP2	Yenidoğan gaitası	37 °C
	<i>Bifidobacterium breve</i>	A26	Yenidoğan gaitası	37 °C
	<i>Bifidobacterium breve</i>	A28	Yenidoğan gaitası	37 °C
<i>Bifidobacterium longum</i>	BASO15	Yenidoğan gaitası	37 °C	

### 3.1.2. Araştırmada kullanılan besiyerleri

Bakteri kültürlerinin geliştirilmesinde ve  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitelerinin belirlenmesinde Man & Rogosa ve Sharp (MRS) besiyeri kullanılmıştır. Enzim optimizasyon çalışmalarında kullanılan besiyerlerinin enzim aktivitesine etkisinin belirlenmesinde, MRS besiyerinde bulunan glukoz çıkarılarak, yerine %2 oranında sukroz, laktoz, fruktoz ve sellobiyoz ilave edilen besiyerleri kullanılmıştır.

Man&Rogosa ve Sharp besiyeri (MRS) içeriği

<b><u>Maddeler</u></b>	<b><u>1000 mL için</u></b>
Pepton	10 g
Yeast Ekstrakt	5 g
Beef Ekstrakt	10 g
Glukoz	20 g
Dipotasyum fosfat	2 g
Sodyum asetat	5 g
Magnezyum sülfat	0,2 g
Manganez sülfat	0,05 g
Tween 80	1,08 mL
Amonyum sitrat	2 g

MRS besiyeri için, maddeler tartılıp distile su ile 1000 mL'ye tamamlanıp maddelerin çözülmesi sağlandıktan sonra, pH  $6,20 \pm 0,02$ 'ye ayarlanmıştır. Besiyeri, otoklavda 121 °C'da 15 dak sterilizasyonu yapılmıştır.

Araştırmada kullanılan Bifidobakteri kültürlerinin geliştirilmesinde ve  $\beta$ -glukozidaz aktivitelerinin belirlenmesinde Trypticase Phytone Yeast Extract besiyeri (TPY) enzim optimizasyon çalışmalarında ise Modifiye Sisteinli Man&Rogosa ve Sharp besiyeri (MMRSC) ve Sisteinli Man&Rogosa ve Sharp besiyeri (MRSC) kullanılmıştır.

Trypticase Phytone Yeast Extract besiyeri (TPY) içeriği

<b><u>Maddeler</u></b>	<b><u>1000 mL için</u></b>
Pepton	7 g
Soya pepton	5 g
Yeast Ekstrakt	5 g
Glukoz	15 g
L-sistein	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,5 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25 g
CaCl <sub>2</sub>	0,15 g
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,001 g
Tween 80	1 mL
Glasiyel asetik asit	1 mL

TPY besiyeri için maddeler tartılmış ve distile su ile 1000mL'ye tamamlanmıştır. Maddelerin çözülmesi sağlandıktan sonra, pH 6,00 ± 0,02'ye ayarlanmıştır. Besiyerinin otoklavda 121 °C'da 15 dak sterilizasyonu sağlanmıştır.

Modifiye Sisteinli Man&Rogosa ve Sharp besiyeri (MMRSC) içeriği

<b><u>Maddeler</u></b>	<b><u>1000 mL için</u></b>
Pepton	10 g
Yeast Ekstrakt	5 g
Beef Ekstrakt	10 g
Glukoz	20 g
Sodyum asetat	5 g
Dipotasyum fosfat	2 g
Magnezyum sülfat	0,2 g
Manganez sülfat	0,05 g
Tween 80	1,08 mL

Amonyum sitrat	2 g
Sodyum thioglicolate	0,2 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,1 g
L-sistein	0,5 g

Sisteinli Man&Rogosa ve Sharp besiyeri (MRSC) içeriği

**Maddeler** **1000 mL için**

Pepton	10 g
Yeast Ekstrakt	5 g
Beef Ekstrakt	10 g
Glucose	20 g
Dipotasyum fosfat	2 g
Sodyum asetat	5 g
Magnezyum sülfat	0,2 g
Manganez sülfat	0,05 g
Tween 80	1,08 mL
Amonyum sitrat	2 g
L-sistein	0,5 g

MMRSC ve MRSC besiyerleri için, besiyeri içeriğinde bulunan maddeler tartılmış distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Maddelerin çözümlenmesi sağlandıktan sonra pH 6,80±0,02'ye ayarlanmıştır. Besiyerinin otoklavda 121 °C'da 15 dak sterilizasyonu yapılmıştır.

Araştırmada kullanılan 0,5 M potasyum fosfat tamponunun hazırlanmasında 87,090 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 68,045 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tartılmış ve distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan tampon, çalışma için uygun pH değerine ayarlanmış ve ardından otoklavda 121°C'da 15 dak sterilizasyonu yapılmıştır.

## 3.2. Metot

### 3.2.1. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları

İnsan ve hayvan kaynaklı *Lactobacillus* spp.'ler uygun besiyerine %2 oranında aşılandıktan sonra 37 °C'da 16-18 saat, gıda kaynaklı *Lactobacillus*'lar ise 42 °C'da 16-18 saat gelişmeleri için inkübasyona bırakılmıştır [Falsen ve ark., 1999]. Bifidobakteri kültürleri, anaerobik jar (Oxoid, Anaerobar) içerisinde, 37 °C'da ortamın %10 CO<sub>2</sub>'li olmasını sağlayan anaerobik kit (Oxoid, Anaerobik generating kit) kullanılarak 36 saat inkübasyona bırakılmıştır [Beerens, 1998].

### 3.2.2. Bakterilerin muhafazası

Ependorf tüplerine 0,3 ml gliserol (Merck) konulmuş ve otoklavda 121 °C'da 15 dak sterilizasyonu yapılmıştır. Uygun sıvı besiyerinde aktifleştirilen kültürlerden 0,6 ml alınarak gliserol içeren steril ependorflara eklenmiş ve -80 °C'da muhafaza edilmiştir. Muhafazaya alınan stoklar iki ayda bir yenilenmiştir [Okereke ve Montville, 1991].

### 3.2.3. Kültürlerin β-glukozidaz aktivitelerinin belirlenmesi

Bakteri kültürlerinin enzim aktivitelerini belirlemek için, kültürler uygun besiyerinde geliştirildikten sonra 5000 rpm'de 20 dak 4 °C'da santrifüj yapılmıştır (Sigma 2-16 KC). Hücre peleti ve süpernatantı ayrı ayrı, 0,5 M potasyum fosfat tamponuyla iki kez yıkanmış ve optikal yoğunlukları Mc Farland 5'e (~ 15 log cfu/ml) ayarlanmıştır. Bakterilerin hücre duvarını parçalamak için, 50 MHz frekansına ayarlanan ve içerisine buz eklenmiş ultrasonikasyon (Vibra-Cell, Sonics&Materials Inc. Danbury, CT USA marka) cihazında, örnekler 5 dakika bekletilmiştir. Hücre atıklarının çöktürülmesi için 1000 rpm'de 10 dak 4 °C'da santrifüj işlemi uygulanmıştır. β-glukozidaz aktivitesinin ölçümü için, p-nitrofenil-β-D-glukopiranozit (p-NPG) substrat olarak kullanılmıştır [Gallo 2004]. 0,5 M potasyum fosfat tamponu (pH 7,5) içinde, 2,5 mM 2 mL p-nitrofenil-β-D-



glukopiranozit (p-NPG) içeren karışıma, hücre süspansiyonundan 0,5 ml eklenmiş ve karışım 30 °C'da 30 dak inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyon 95 °C'da 5 dak bekletilerek durdurulmuştur. Spektrofotometre de (Hitachi UV-1800, Japonya) 420 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak kültürlerin  $\beta$ -glukozidaz aktiviteleri belirlenmiştir [Choi ve ark., 2002].

### 3.2.4. Enzim optimizasyonu

$\beta$ -glukozidaz aktiviteleri belirlenen kültürlerden, en yüksek spesifik aktiviteyi gösteren 4 adet laktobasil (*L. rhamnosus* BAZ78, *L. rhamnosus* SMP6-5, *L. casei* LB65, *L. casei* LE4) ve 2 adet bifidobakteri (*B. breve* A28, *B. longum* BASO15) suşu seçilerek farklı pH, sıcaklık ve besiortamındaki enzim aktivitelerinin optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Farklı pH'lardaki aktivitelerin belirlenmesi için 3 M HCl ve 3 M NaOH kullanılarak, 0,5 M potasyum fosfat tamponunun pH'sı 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 7,5 ve 8,0 değerlerine ayarlanmıştır. Bu pH değerlerinde enzim aktivitesi 3.2.3'te belirtildiği şekilde belirlenmiştir.

0,5 M potasyum fosfat tamponu (pH 7,5) içinde, 2,5 mM 2 mL p-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranozit (p-NPG) içeren karışıma hücre süspansiyonundan 0,5 ml eklendikten sonra, karışım farklı sıcaklıklarda (30 °C, 37 °C, 40 °C, 50 °C ve 60 °C) inkübasyona bırakılmış ve farklı sıcaklık değerlerinde inkübasyona bırakılan karışımın enzim aktivitesi ölçülerek, sıcaklığın aktivite üzerindeki etkisi tespit edilmiştir.

Örneklerin farklı besiortamlarındaki  $\beta$ -glukozidaz aktivitelerinin belirlenmesi için ise, laktobasillerin gelişmesinde en uygun besiyeri olan MRS sıvı besiyeri içine %2 oranında glukoz yerine, yine aynı oranda fruktoz, sukroz, laktoz ve sellobiyoz ilave edilmiştir. Bifidobakteriler için ise TPY (Trypticase Phytone Yeast Extract), MRSC (Sisteinli Man&Rogosa ve Sharp) ve MMRSC (Modifiye Sisteinli Man&Rogosa ve Sharp) besiortamları kullanılarak 3.2.3'te belirtildiği gibi enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Bu şekilde bakterilerin, en yüksek  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivite yeteneğine sahip oldukları besiortamı tespit edilmiştir.

### **Bakterilerin yapay mide suyu ve bağırsak sıvısında $\beta$ -glukozidaz aktivitelerinin belirlenmesi**

En yüksek spesifik enzim aktivitesine sahip 4 adet laktobasil ve 2 adet bifidobakteri suşu, farklı pH'lardaki yapay mide suyunda ve yapay bağırsak sıvısında geliştirilerek  $\beta$ -glukozidaz enzim aktiviteleri 3.2.3'te belirtildiği şekilde belirlenmiştir.

#### Yapay mide suyu

Pepsin (Sigma, 1:10000 ICN) %0,5'lik serum fizyolojik solüsyonunda son konsantrasyonu 3 g/L olacak şekilde çözülerek yapay mide sıvısı hazırlanmıştır. Hazırlanan mide sıvısının pH' sı 4 M HCl ve 0,1 M NaOH ile 2,0; 3,0; 4,0 ve 7,0'a ayarlanmıştır.

#### Yapay bağırsak sıvısı

Pankreatin (Sigma, P-1500 USP) %0,5'lik serum fizyolojik solüsyonunda son konsantrasyonu 1 g/L olacak şekilde çözülerek yapay ince bağırsak sıvısı hazırlanmıştır. Hazırlanan karışıma %0,30 safra tuzu eklendikten sonra pH' sı 0,1 M NaOH ve 4 M HCl ile 5,5; 6,5; 7,5 ve 8,0 'a ayarlanmıştır.

### **3.2.5. Enzimin kısmi saflaştırılması**

$\beta$ -glukozidaz aktivite gösterdiği belirlenen bakteri kültürlerinin sahip oldukları enzimin saflık derecesini belirlemek için saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu en yüksek spesifik enzim aktivite yeteneği gösteren *Lactobacillus rhamnosus* BAZ78 ve *Lactobacillus casei* LB65 suşları, uygun besiortamında geliştirildikten sonra 5000 rpm'de 20 dak 4 °C'da santrifüj yapılmış (Sigma 2-16 KC) ve 0,5 M potasyum fosfat tamponuyla iki kez yıkanmıştır. Kültürlerin optikal yoğunluğu McFarland 5'e ( $\sim 15 \log$  cfu/ml) ayarlanmış ve bakterilerin hücre duvarları ultrasonikatör ile parçalanmıştır. Hücre atıklarının çöktürülmesi için 1000 rpm'de 10 dak 4 °C'da santrifüj işlemi uygulanmıştır. Enzimin konsantre edilmesi ve

saflaştırılması için enzim amonyum sülfatla çöktürülmüş ardından tuzun ortamdan uzaklaştırılması için diyaliz işlemi uygulanmıştır [Demirkan, 1995].

#### Amonyum sülfat ile çöktürme

10 ml'lik bakteri örneği içeren beher, manyetik karıştırıcı üzerindeki buz dolu bir kabın içine yerleştirilmiştir. Toz haline getirilen amonyum sülfattan, çözeltiye %80 oranında yavaş yavaş eklenmiştir. Tuz ilavesinin ardından, 10-60 dak daha karıştırılan çözeltiye 10 000x g'de 10 dak 4 °C'da santrifüj işlemi uygulanmış ve çözeltinin üst sıvısı atılmıştır. Çökelti, 0,5 M potasyum fosfat tamponu (pH 7,5) ile süspanse hale getirilmiştir [Temizkan ve ark., 2008]. Santrifüj işlemi sonunda çözülen numunenin, protein konsantrasyonu Bradford Reagent Kit (Amresco) kullanılarak belirlenmiştir. Bakterinin amonyum sülfat ile çöktürmeden sonraki enzim aktivitesi 3.2.3'te belirtildiği gibi tespit edilmiştir.

#### Diyaliz

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck) çöktürmesi ile elde edilen pelet, potasyum fosfat tamponu içerisinde çözüldükten sonra seluloz diyaliz torbasına konulmuştur. Diyaliz torbası (Sigma, 0,4 in.), içerisinde 0,5 M potasyum fosfat tamponu (pH 7,5) bulunan erlene yerleştirilmiş ve manyetik karıştırıcı ile çok yavaş bir şekilde karıştırılarak 4 °C'da 2 gün bekletilmiştir. Erlen içerisindeki tampon çözelti, sekiz saatlik periyotlarla altı kez değiştirilmiştir. Diyaliz işlemi ile çözüldükten (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'ın giderilip giderilmediği, kullanılan tampon çözeltisine, doymuş baryum klorür'ün (BaCl<sub>2</sub>) (Merck) eklenmesiyle tespit edilmiştir. 0,5 M potasyum fosfat tampon (pH 7,5) çözeltisinden alınan 10 mL örnek üzerine, BaCl<sub>2</sub>'ün tampon çözelti ile etkileşimini önlemek amacıyla, 0,1 M HCl çözeltisinden birkaç damla eklenmiştir. Çözeltide sülfat anyonunun varlığını tespit etmek için, çözeltiye 2 mL doymuş BaCl<sub>2</sub> eklenmiştir. Çözeltide bulanıklık gözlenmemesi, çözelti içinde sülfat anyonunun bulunmadığını göstergesi olarak yorumlanmıştır [Demirkan, 1995]. Elde edilen diyalizatta, protein ve enzim aktivite tayinleri yapılmıştır.

### 3.2.7. Protein konsantrasyonlarının belirlenmesi

Kültürlerin protein konsantrasyonu, Bradford Reagent Kit (Amresco) kullanılarak belirlenmiştir. 0,0025-0,05 mg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda Bovine serum albumin (BSA) standart olarak kullanılmıştır.

### 3.2.8. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

*Lactobacillus rhamnosus* BAZ78 ve *Lactobacillus casei* LB65 suşlarının sahip oldukları  $\beta$ -glukozidaz enziminin, kısmi olarak saflaştırılıp saflaştırılmadığının araştırılması amacıyla Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanılmıştır.

#### *Poliakrilamid jel elektroforezinin yapılışı*

Elektroforez işlemi Laemmli'ye [Laemmli, 1970] göre yapılmıştır.

#### **SDS-PAGE için kullanılan stok çözeltiler**

#### **AKRİLAMİD+N, N'-METİLEN BİS AKRİLAMİD STOĞU (%30'luk)**

Akrilamid (Sigma)	28,80 g
Bis akrilamid (Sigma)	1,20 g

Akrilamid-Bis akrilamid çözeltilisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler, 5 mL distile suda çözülerek, son hacim 100 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır. Whatman No: 1 filtre kağıdından süzülerek, renkli cam şişelerde +4 °C'da en fazla 1 ay muhafaza edilmiştir.

#### **AYIRMA JEL TAMPONU (1,5 M Tris-HCl, pH: 8,6)**

Trizma base (Sigma)	18,16 g
SDS (Sigma)	0,40 g

Ayırma jelinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler, 75 mL distile suda çözüldükten sonra, 6 M HCl ile pH 8,6'ya ayarlanmıştır. Son hacim 100 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır. Otoklavda 121 °C'da 15 dak sterilizasyonu yapılmış ve +4°C'de muhafaza edilmiştir.

### **YIĞMA JEL TAMPONU (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8)**

Trizma base (Sigma)	6,05 g
SDS (Sigma)	0,40 g

Yığma jelinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler, 75 mL distile suda çözüldükten sonra, HCl ile pH 6,8'e ayarlanmıştır. Son hacim 100 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır. Otoklavda 121 °C'da 15 dak sterilizasyonu yapılmış ve +4°C'de muhafaza edilmiştir.

### **KOŞTURMA TAMPONU**

Trizma base (Sigma)	6,05 g
Glisin (Sigma)	5,76 g
SDS (Sigma)	0,40 g

Koşturma tamponu hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler, 1000 mL distile suda çözülmüştür.

### **ÖRNEK TAMPONU (4X)**

0,5 M Tris-HCl, pH:6,8	5,12 mL
Gliserol (Merck)	8,00 mL
Bromo fenol blue (Sigma)	4,00 mg
SDS (Sigma)	2,00 g
2-β ME (Sigma)	4,00 mL
Distile su	3,00 mL

Karışımın hacmi 20 mL'ye saf su ile tamamlanmış ve renkli cam şişede oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

### **BOYAMA ÇÖZELTİSİ**

Glasiyel Asetik Asit (Merck)	70,00 mL
Metanol (Merck)	50,00 mL
Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma)	1,50 g
Distile su	880,00 mL

Boya çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler 880 mL distile suda çözüldükten sonra Whatman No:1 filtre kağıdından süzülerek, renkli cam şişelerde oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

### **BOYA GİDERİCİ ÇÖZELTİ**

Glasiyel Asetik Asit (Merck)	70,00 mL
Metanol (Merck)	50,00 mL
Distile su	880,00 mL

Çözelti oda sıcaklığında renkli cam şişede muhafaza edilmiştir.

### **Ayırma Jelin Hazırlanışı (%4)**

Akrilamid/Bis Akrilamid (%30'luk)	5,78 mL
Distile su	7,13 mL
1,5 M Tris-HCl pH:8,6	4,33 mL
% 10'luk APS (Sigma)	86,70 µL
TEMED (Sigma)	8,16 µL
Akrilamid/Bis Akrilamid (%30'luk)	5,78 mL

Maddeler 1 mm aralığa sahip iki cam arasına aktarılmış, üst kısım saf su ile kaplanarak hava ile teması önlenmiş ve polimerize olması için bekletilmiştir.

### **Yığıma Jelin Hazırlanışı (%10)**

Akrilamid/Bis Akrilamid (%30'luk)	0,82 Ml
Distile su	2,93 mL
1,5 M Tris-HCl pH:6,8	1,25 mL
% 10'luk APS (Sigma)	30,00 µL
TEMED (Sigma)	5,00 µL
Acrylamide/Bis Acrylamide (%30'luk)	0,82 mL

Bu karışım, polimerize olan ayırma jelin üzerindeki distile su uzaklaştırıldıktan sonra dökülmüş ve daha sonra tarak yerleştirilmiştir. Polimerizasyonu takiben tarak çıkarılmış, kuyular koşturma tamponu ile yıkandıktan sonra tanka sabitlenmiş ve hazne koşturma tamponu ile doldurulmuştur.

### ***Protein elektroforezinin yapılışı ve jellerin boyanması***

Proteinler 30 mA'de yaklaşık 120 V'ta (Elite 300) ortalama 3 saat koşturulmuştur. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jeller, Coomassie Brilliant Blue R-250 içeren boyama çözeltisi içinde 24 saat bekletilerek boyanmıştır. Daha sonra boya giderici solüsyonda bırakılarak jellerin zemininde bulunan boyanın uzaklaştırılması sağlanmıştır. %7'lik asetik asit içerisinde muhafaza edilen jellerin fotoğrafları çekilmiştir.

### ***Proteinlerin moleküler ağırlıklarının hesaplanması***

Ayırma jelde proteinin koştuğu mesafenin izleme boyasının bulunduğu mesafeye oranı Rf değerini vermektedir. Moleküler ağırlıklarını bildiğimiz standart proteinlerin (Thermo Scientific Pierce Blue Prestained protein markerı, 26681) her birinin Rf değeri bulunmuş ve yarı logaritmik kâğıtta Rf değeri apsise, proteinlerin moleküler ağırlıkları da ordinata konarak en az üç noktadan geçen bir doğru çizilmiştir. Daha sonra örnek proteinin moleküler ağırlığı da hesaplanmıştır.

### **3.2.9. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) analizi ile izoflavonların hidrolizi**

İzoflavon glukozitlerin yüksek spesifik enzim aktivitesini gösteren *Lactobacillus casei* LB65 ve *Lactobacillus rhamnosus* BAZ78 bakterileri tarafından hidrolize edilip edilmediği HPLC ile belirlenmiştir. Suşlar MRS besi ortamında ve uygun sıcaklıklarda geliştirildikten sonra, kültürlerden 0,2 mL alınarak ve 100 µg genistin (Sigma) ve daidzin (Sigma) içeren 1,8 mL 0,5 M potasyum fosfat tamponu (pH 7,5) içerisine eklenmiştir. Karışım 45°C’de 30 dak bekletildikten sonra 10 dak kaynatılmıştır [Choi ve ark., 2002]. Suşların besi ortamında bulunan izoflavonların glikozit formlarının hidrolize olup olmadıkları HPLC analizi ile ODTÜ Merkez Laboratuvarı Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Ar-Ge Merkezinde yaptırılmıştır.

### **3.2.10. İstatistiksel analiz**

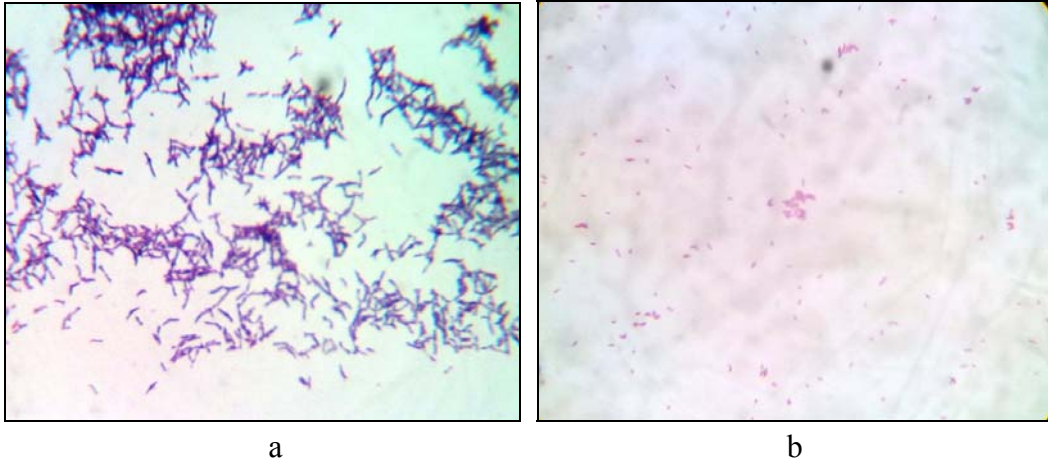
Tüm çalışmalar 3 paralelli ve 3 tekerrürlü olarak yapılmış ve çalışmaların ortalama sonuçları verilmiştir. İstatistiksel analizlerde SPSS Inc. Software (16.0 versiyonu; SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılmıştır. Pearson korelasyonuna göre, suşların enzim aktivitesi - protein miktarı ve protein miktarı - spesifik aktiviteleri arasında korelasyon olup olmadığı araştırılmıştır. Enzim aktivitesi, protein miktarı ve spesifik enzim aktivitesi arasındaki korelasyon düzeyleri Akgül, [2005]’e göre değerlendirilmiştir.



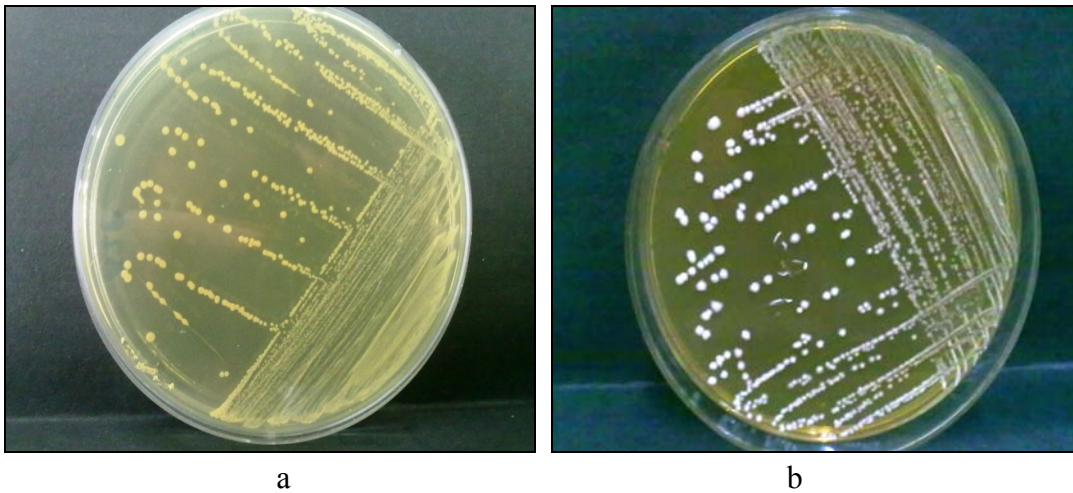
## 4. DENEYSEL BULGULAR

### 4.1. Araştırmada Kullanılan Bakteriler

Çalışmada kullanılan *Bifidobacterium longum* BAS015 ve *Lactobacillus casei* LB65 suşlarının Gram boyama sonucunda ışık mikroskopundaki görüntüleri sırasıyla Resim 4.1.a ve Resim 4.1.b ve *Bifidobacterium breve* A28 ile *Lactobacillus casei* LB65 suşlarının katı besiyortamındaki koloni morfolojileri sırasıyla Resim 4.2.a ve Resim 4.2.b de gösterilmiştir.



Resim 4.1. a. *Bifidobacterium longum* BAS015 b. *Lactobacillus casei* LB65



Resim 4.2.a *Bifidobacterium breve* A28 suşunun TPY Agarda koloni morfolojisi  
b. *Lactobacillus casei* LB65 suşunun MRS Agarda koloni morfolojisi

#### 4.2. $\beta$ -Glukozidaz Enzim Aktiviteleri

*Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerine ait suşlar, p-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranoziti (p-NPG) substrat olarak kullanarak, sahip oldukları  $\beta$ -glukozidaz enzim aktiviteleri ile ürün (p-nitrofenol) oluşturmuşlardır. p-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranoziti (p-NPG) içeren karışımın sarı renge dönüşmesiyle ürün oluşumu gözlenmiştir (Resim 4.3). Kültürlerin pelletinde gözlenen  $\beta$ -glukozidaz enzim aktiviteleri, protein miktarları ve spesifik enzim aktiviteleri Çizelge 4.1’de verilmiştir. Kültür süpernatantlarında ise enzim aktivitesine rastlanılmamıştır.



Resim 4.3. pH 7,5’de *Lactobacillus rhamnosus* BAZ78 ve *Lactobacillus rhamnosus* SMP6-5 suşlarının enzim aktivitesiyle sarı renk oluşumu

Yapılan çalışma sonucunda *Lactobacillus* cinsine ait kültürlerden hayvan kaynaklı *Lactobacillus rhamnosus* BAZ78 ( $4,500 \pm 0,002$  U/mg), gıda kaynaklı *Lactobacillus rhamnosus* SMP6-5 ( $2,670 \pm 0,001$  U/mg), insan kaynaklı *Lactobacillus casei* LB65 ( $3,000 \pm 0,001$  U/mg) ve *Lactobacillus casei* LE4 ( $2,000 \pm 0,001$  U/mg) suşlarının *Bifidobacterium* cinsine ait kültürlerden de *Bifidobacterium breve* A28 ( $2,670 \pm 0,000$  U/mg) ve *Bifidobacterium longum* BASO15 ( $2,330 \pm 0,000$  U/mg) suşlarının en yüksek spesifik enzim aktivitesi yeteneğine sahip oldukları belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin  $\beta$ -glukozidaz aktivite miktarı

Suşlar	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)
<i>L. delbrueckii subsp. delbrueckii</i> ZYN 33	0,020±0,001	0,020±0,002	1,000±0,001
<i>L. delbrueckii subsp. delbrueckii</i> ZYN31	0,010±0,001	0,040±0,001	0,250±0,001
<i>L. acidophilus</i> BAZ54	0,050±0,001	0,050±0,003	1,000±0,001
<i>L. acidophilus</i> BAZ51	0,010±0,002	0,020±0,006	0,500±0,007
<i>L. acidophilus</i> BAZ59	0,010±0,001	0,030±0,002	0,330±0,001
<i>L. acidophilus</i> BAZ63	0,020±0,000	0,020±0,001	1,000±0,000
<i>L. acidophilus</i> BAZ29	0,020±0,001	0,040±0,006	0,500±0,001
<i>L. acidophilus</i> BAZ43	0,010±0,002	0,020±0,005	0,500±0,003
<i>L. acidophilus</i> BAZ22	0,010±0,002	0,020±0,004	0,500±0,001
<i>L. acidophilus</i> BAZ61	0,020±0,003	0,050±0,001	0,400±0,001
<i>L. acidophilus</i> ZYN13	0,020±0,001	0,060±0,006	0,330±0,004
<i>L. acidophilus</i> BAZ36	0,020±0,000	0,040±0,001	0,500±0,000
<i>L. acidophilus</i> ACS6	0,070±0,005	0,040±0,003	1,750±0,002
<i>L. delbrueckii subsp. delbrueckii</i> BAZ32	0,010±0,003	0,020±0,001	0,500±0,002
<i>L. salivarius</i> ZYN 9	0,030±0,000	0,020±0,001	1,500±0,000
<i>L. salivarius</i> ZYN15	0,050±0,002	0,120±0,001	0,420±0,001
<i>L. salivarius</i> ZYN23	0,040±0,000	0,080±0,01	0,500±0,000
<i>L. fermentum</i> ZYN17	0,020±0,001	0,030±0,001	0,670±0,001
<i>L. fermentum</i> LB16	0,070±0,000	0,090±0,001	0,780±0,000
<i>L. paracasei ssp. paracasei</i> BKS20	0,080±0,000	0,050±0,001	1,600±0,000
<i>L. rhamnosus</i> BAZ78	0,027±0,002	0,006±0,001	4,500±0,002*
<i>L. rhamnosus</i> SMP6-5	0,069±0,001	0,026±0,001	2,670±0,001*
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> B3	0,050±0,005	0,110±0,001	0,450±0,003
<i>L. brevis</i> LB63	0,080±0,002	0,050±0,001	1,600±0,001
<i>L. casei</i> LB65	0,030±0,001	0,010±0,001	3,000±0,001*
<i>L. casei</i> LB68	0,080±0,000	0,060±0,001	1,330±0,000
<i>L. casei</i> LE4	0,056±0,001	0,028±0,001	2,000±0,001*
<i>L. casei</i> LE7	0,080±0,001	0,060±0,001	1,330±0,002
<i>L. casei</i> LB17	0,090±0,000	0,110±0,001	0,820±0,000
<i>L. casei</i> LB19	0,080±0,001	0,060±0,002	1,330±0,005
<i>L. casei</i> LB 6	0,070±0,001	0,080±0,001	0,880±0,001
<i>L. casei</i> LB23	0,060±0,001	0,070±0,001	0,860±0,001
<i>L. casei</i> LB49	0,070±0,001	0,080±0,001	0,880±0,001
<i>L. casei</i> LB61	0,060±0,001	0,080±0,003	0,750±0,002
<i>L. casei</i> LB83	0,080±0,000	0,060±0,000	1,330±0,000
<i>L. casei</i> LB74	0,090±0,009	0,090±0,001	1,000±0,008
<i>L. casei</i> LB64	0,050±0,001	0,070±0,002	0,710±0,001
<i>L. rhamnosus</i> GD11	0,080±0,005	0,070±0,001	1,140±0,002
<i>L. rhamnosus</i> LP2	0,060±0,007	0,060±0,001	1,000±0,002
<i>Bifidobacterium breve</i> A28	0,072±0,000	0,027±0,000	2,670±0,000*
<i>B. breve</i> A26	0,060±0,000	0,050±0,000	1,200±0,000
<i>B. longum</i> BASO15	0,070±0,000	0,030±0,005	2,330±0,000*

\*Yüksek spesifik enzim aktivitesi gösteren suşlar kırmızı renkte gösterilmiştir.

*Lactobacillus casei* LB17 ve *Lactobacillus casei* LB74 suşlarında yüksek enzim aktivitesi (0,090 U/ml) tespit edilirken, *Lactobacillus salivarius* ZYN15 (0,120 mg/ml), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 ve *Lactobacillus casei* LB17 (0,110 mg/ml) suşlarının ise yüksek miktarlarda protein içerdikleri belirlenmiştir. Spesifik enzim aktivitesinin yüksek ve düşük olmasında protein miktarlarının etkili olduğu dikkatimizi çekmiştir. Yüksek enzim aktivitesine sahip ancak protein miktarı düşük olan suşlarda (BAZ78, SMP6-5, A28) spesifik enzim aktivitesinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumu desteklemek amacıyla Pearson'ın korelasyonu testi uygulanmış ve protein miktarı ile spesifik enzim aktivitesi arasında  $r = -0,356$  olduğundan negatif yönde zayıf düzeyde bir korelasyon olduğu görülmektedir ve  $p < 0,01$  olduğundan bu anlamlıdır. Enzim aktivitesi ile protein miktarı arasında ise  $r = 0,464$  olduğundan pozitif yönde zayıf düzeyde bir korelasyon ( $p > 0,01$ ) belirlenmiştir.

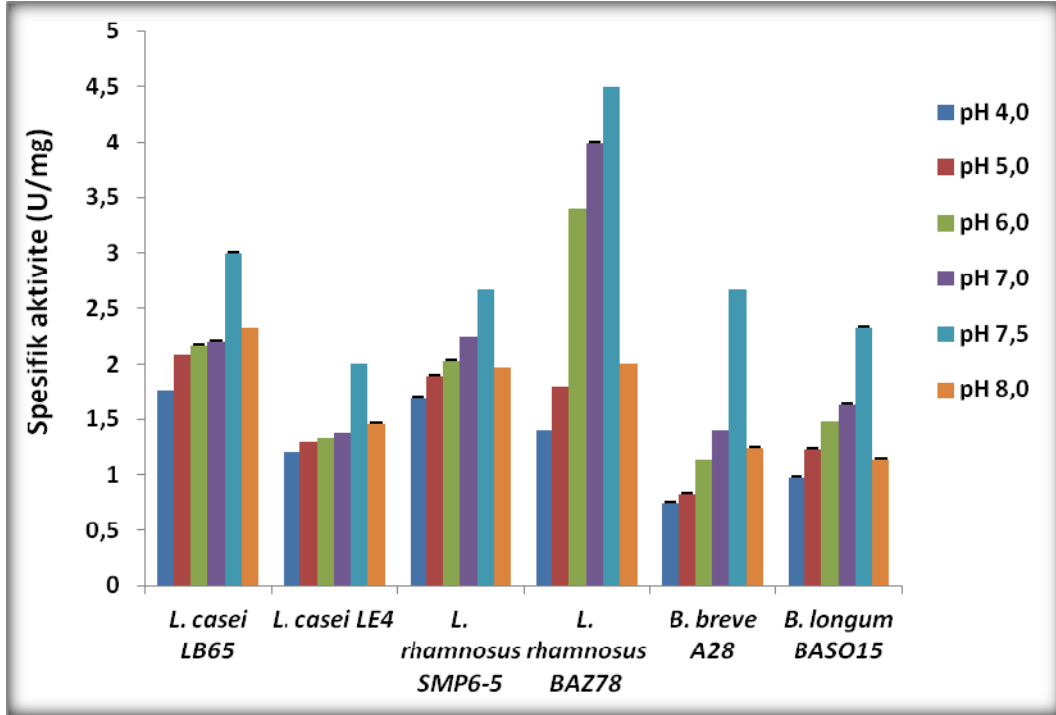
### 4.3. Enzim Optimizasyonu

Enzim optimizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere,  $\beta$ -glukozidaz aktiviteleri belirlenen kültürlerden, en yüksek spesifik enzim aktiviteyi gösteren ve farklı izolasyon kaynağından olmasına da dikkat edilen *Lactobacillus rhamnosus* BAZ78, *Lactobacillus rhamnosus* SMP6-5, *Lactobacillus casei* LB65, *Lactobacillus casei* LE4, *Bifidobacterium breve* A28 ve *Bifidobacterium longum* BASO15 suşları seçilmiştir. Seçilen suşların farklı pH, sıcaklık ve besiortamlarındaki spesifik enzim aktiviteleri, enzim aktiviteleri ve protein miktarları belirlenmiştir.

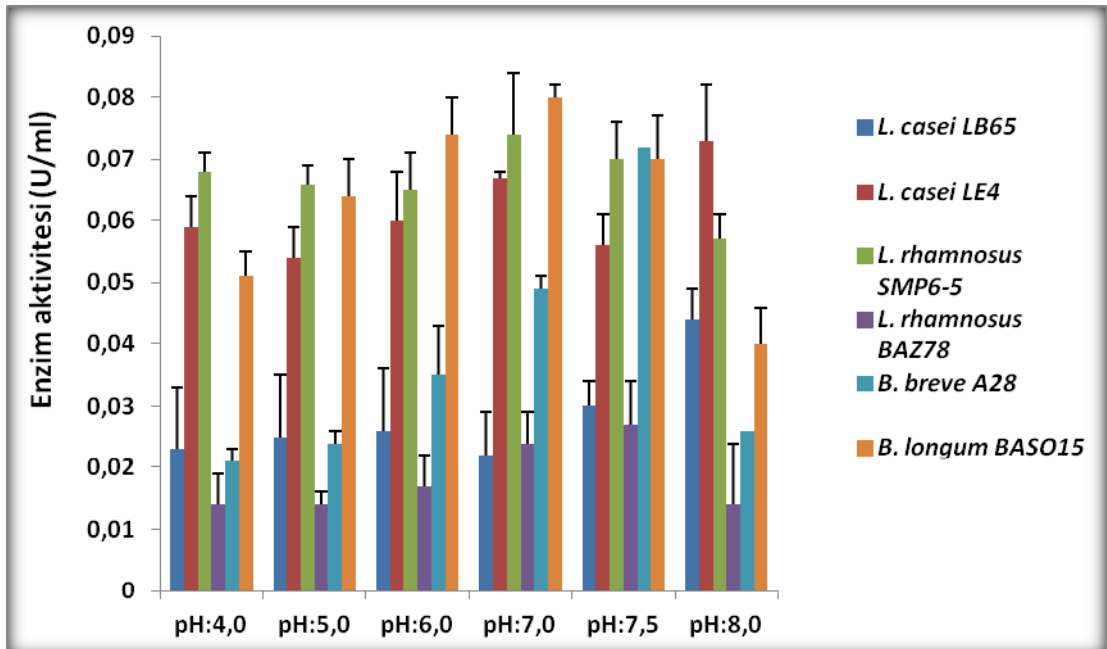
0,5 M potasyum fosfat tamponunun pH'sı 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 7,5 ve 8,0 değerlerine ayarlanarak seçilen suşların spesifik enzim aktiviteleri belirlenmiştir. pH 7,5'te  $4,500 \pm 0,002$  U/mg ile *Lactobacillus rhamnosus* BAZ78 ve  $2,670 \pm 0,000$  U/mg ile *Bifidobacterium breve* A28 suşlarının en yüksek,  $1,200 \pm 0,001$  U/mg ile *Lactobacillus casei* LE4 ve  $0,750 \pm 0,000$  U/mg ile de *Bifidobacterium breve* A28 suşlarının ise pH 4,0'da en düşük spesifik enzim aktivitesi yeteneğine sahip oldukları belirlenmiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.1). Genel olarak suşlar değerlendirildiğinde, kullanılan 6 suşun hepsinde spesifik enzim aktivitesinin pH 7,5'te en yüksek, pH 4,0'da en düşük olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

*Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin farklı pH değerlerindeki enzim aktiviteleri ve protein miktarları Çizelge 4.2, sırasıyla Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te gösterilmektedir. *L. rhamnosus* BAZ78 suşunun pH 4,0; pH 5,0 ve pH 8,0'da en düşük enzim aktivitesine ( $0,014$  U/mL), pH 7,0'da *B. longum* BASO15 suşunun ise ( $0,080$  U/mL) en yüksek enzim aktivitesine sahip oldukları gözlenmiştir.

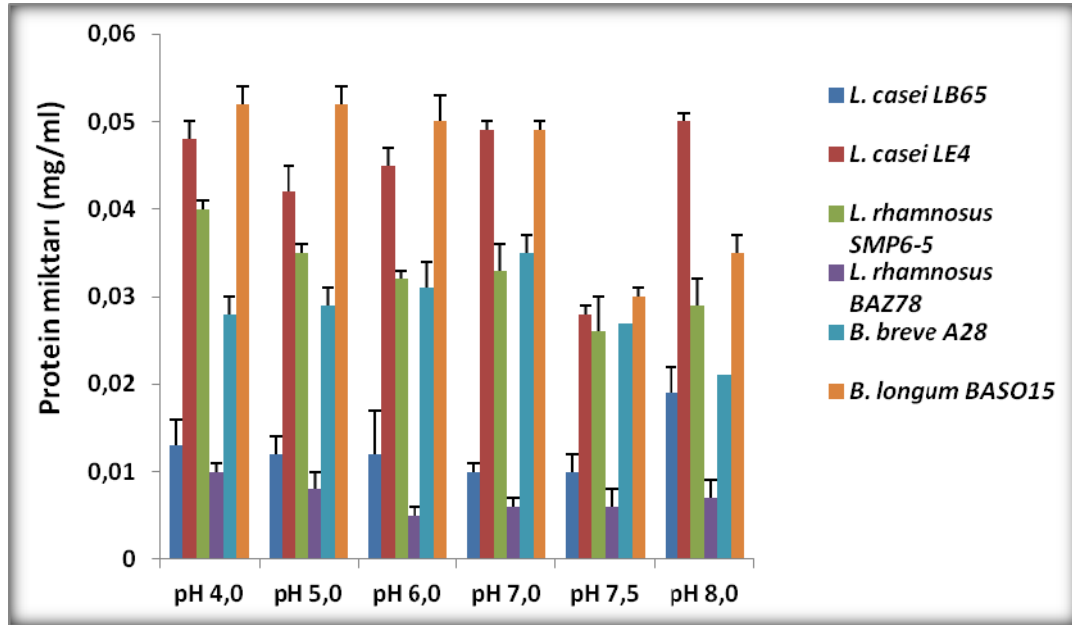
En yüksek protein miktarı pH 4,0 ve pH 5,0'da *B. longum* BASO15 suşunda ( $0,052$  mg/mL) belirlenirken, en düşük protein miktarı pH 6,0'da *L. rhamnosus* BAZ78 suşunda ( $0,005$  mg/mL) tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin farklı pH değerlerinde spesifik enzim aktiviteleri



Şekil 4.2. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin farklı pH değerlerinde enzim aktiviteleri



Şekil 4.3. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin farklı pH değerlerinde protein miktarları

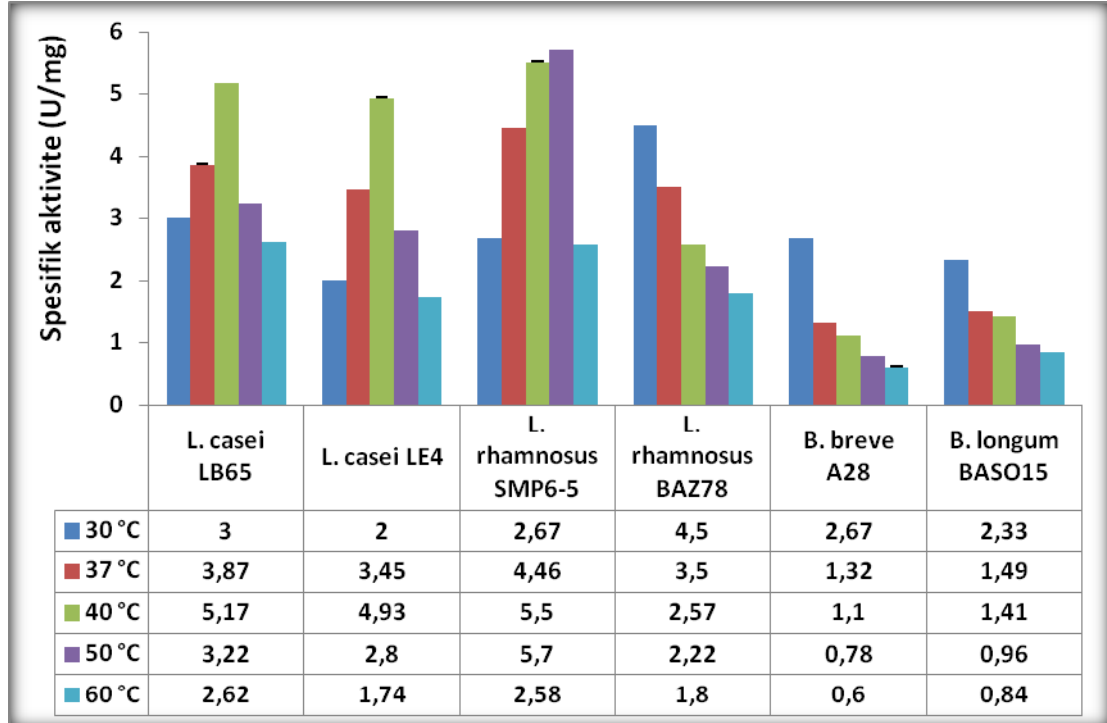
Protein miktarı düşük, enzim aktivitesi yüksek olan suşların (pH 7,5'te *L. rhamnosus* BAZ78, *L. casei* LB65, *B. breve* A28), yüksek spesifik enzim aktivitesi yeteneğine sahip oldukları, protein miktarı yüksek enzim aktivitesi düşük olan suşların (pH 4,0'da *B. breve* A28 ve *B. longum* BASO15) ise düşük spesifik enzim aktivitesi gösterdikleri dikkatimizi çekmiştir. Ancak bazı suşlarda enzim aktiviteleri yüksek olmasına rağmen protein miktarları da yüksek olduğundan dolayı spesifik enzim aktivitelerinde düşüş gözlenmiştir. Bu durumu desteklemek amacıyla Pearson'ın korelasyonu testi uygulanmış ve protein miktarı ile spesifik enzim aktivitesi arasında  $r = -0,582$  olduğundan negatif yönde orta düzeyde bir korelasyon olduğu görülmektedir ve  $p < 0,01$  olduğundan bu ilişki anlamlıdır. Enzim aktivitesi ile protein miktarı arasında ise  $r = 0,787$  olduğundan pozitif yönde yüksek düzeyde bir korelasyon ( $p > 0,01$ ) belirlenmiştir.

Çizelge 4.2 *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin farklı pH değerlerinde enzim aktiviteleri, protein miktarları ve spesifik enzim aktiviteleri

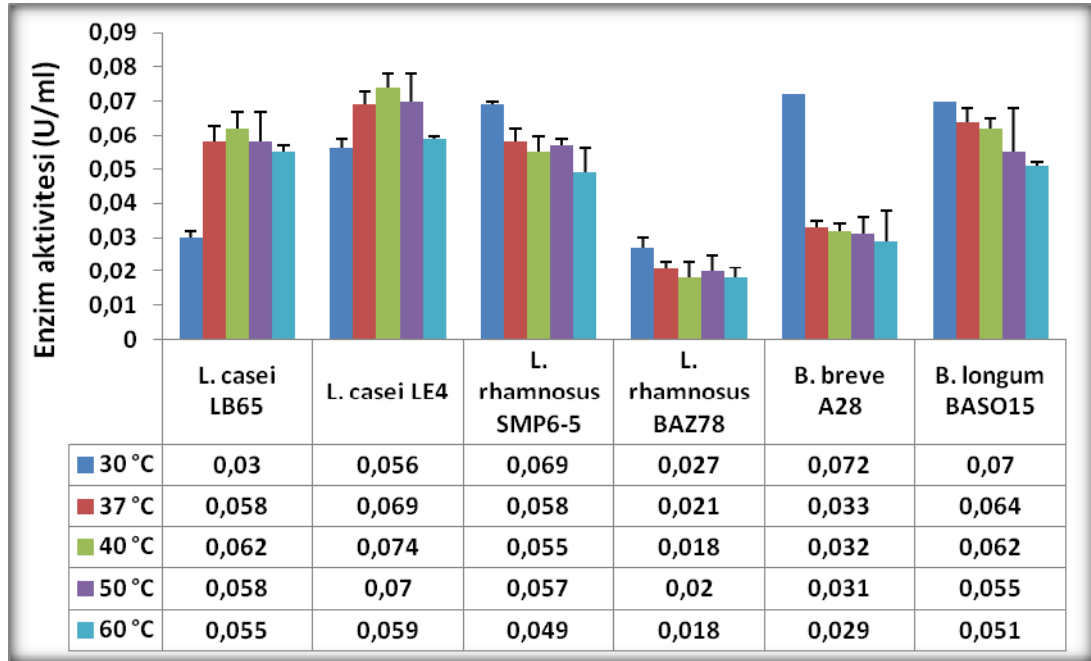
	Suşlar	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)
pH 4,0	<i>L. casei</i> LB65	0,023±0,010	0,013±0,003	1,770±0,007
	<i>L. casei</i> LE4	0,059±0,010	0,048±0,002	1,200±0,005
	<i>L. rhamnosus</i> BAZ78	0,014±0,007	0,010±0,001	1,400±0,007
	<i>L. rhamnosus</i> SMP6-5	0,068±0,010	0,040±0,005	1,700±0,001
	<i>B. breve</i> A28	0,021±0,004	0,028±0,002	0,750±0,001
	<i>B. longum</i> BASO15	0,051±0,005	0,052±0,003	0,980±0,002
pH 5,0	<i>L. casei</i> LB65	0,025±0,005	0,012±0,002	2,080±0,001
	<i>L. casei</i> LE4	0,054±0,005	0,042±0,003	1,290±0,001
	<i>L. rhamnosus</i> BAZ78	0,014±0,001	0,008±0,001	1,800±0,001
	<i>L. rhamnosus</i> SMP6-5	0,066±0,008	0,035±0,002	1,890±0,006
	<i>B. breve</i> A28	0,024±0,005	0,029±0,001	0,830±0,005
	<i>B. longum</i> BASO15	0,064±0,009	0,052±0,001	1,230±0,009
pH 6,0	<i>L. casei</i> LB65	0,026±0,003	0,012±0,001	2,170±0,001
	<i>L. casei</i> LE4	0,060±0,003	0,045±0,001	1,330±0,003
	<i>L. rhamnosus</i> BAZ78	0,017±0,010	0,005±0,003	3,400±0,005
	<i>L. rhamnosus</i> SMP6-5	0,065±0,006	0,032±0,001	2,030±0,006
	<i>B. breve</i> A28	0,035±0,006	0,031±0,004	1,130±0,002
	<i>B. longum</i> BASO15	0,074±0,004	0,050±0,003	1,480±0,001
pH 7,0	<i>L. casei</i> LB65	0,022±0,005	0,010±0,001	2,200±0,005
	<i>L. casei</i> LE4	0,067±0,002	0,049±0,002	1,370±0,001
	<i>L. rhamnosus</i> BAZ78	0,024±0,005	0,006±0,001	4,000±0,001
	<i>L. rhamnosus</i> SMP6-5	0,074±0,005	0,033±0,001	2,240±0,005
	<i>B. breve</i> A28	0,049±0,007	0,035±0,002	1,400±0,003
	<i>B. longum</i> BASO15	0,080±0,010	0,049±0,002	1,630±0,005
pH 7,5	<i>L. casei</i> LB65	0,030±0,002	0,010±0,001	3,000±0,001
	<i>L. casei</i> LE4	0,056±0,002	0,028±0,002	2,000±0,001
	<i>L. rhamnosus</i> BAZ78	0,027±0,004	0,006±0,002	4,500±0,002
	<i>L. rhamnosus</i> SMP6-5	0,069±0,002	0,026±0,002	2,670±0,001
	<i>B. breve</i> A28	0,072±0,000	0,027±0,000	2,670±0,000
	<i>B. longum</i> BASO15	0,070±0,000	0,030±0,000	2,330±0,000
pH 8,0	<i>L. casei</i> LB65	0,044±0,004	0,019±0,002	2,320±0,003
	<i>L. casei</i> LE4	0,073±0,006	0,050±0,002	1,460±0,003
	<i>L. rhamnosus</i> BAZ78	0,014±0,010	0,007±0,001	2,000±0,009
	<i>L. rhamnosus</i> SMP6-5	0,057±0,006	0,029±0,003	1,970±0,001
	<i>B. breve</i> A28	0,026±0,007	0,021±0,001	1,240±0,007
	<i>B. longum</i> BASO15	0,040±0,006	0,035±0,002	1,400±0,003



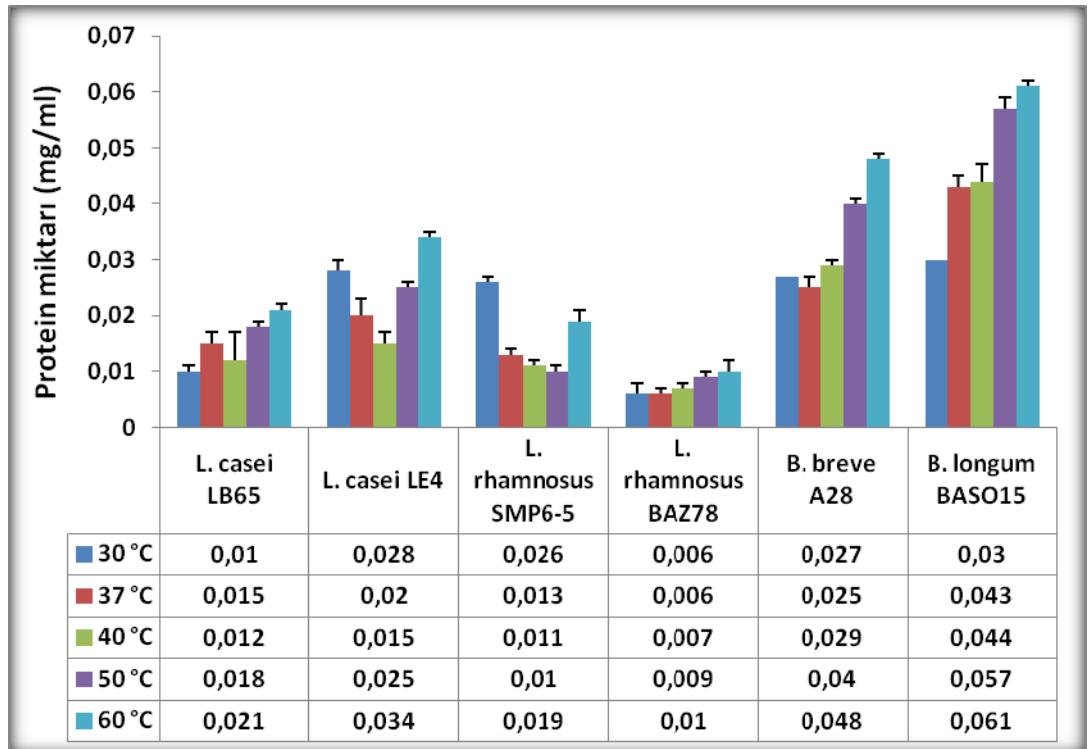
0,5 M potasyum fosfat tamponu (pH 7,5) içinde, 2,5 mM 2 ml p-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranozit (p-NPG) içeren karışıma 0,5 ml süpernatant eklendikten sonra, karışım 30 °C, 37 °C, 40 °C, 50 °C ve 60 °C’da inkübasyona bırakılarak, farklı sıcaklıkların enzim aktivitesi üzerindeki etkileri Şekil 4.4’de verilmiştir. *Lactobacillus rhamnosus* BAZ78 suşunun (4,500±0,002 U/mg) ve *Bifidobacterium* kültürlerinin (A28; 2,670±0,000 U/mg, BASO15; 2,330±0,000 U/mg) 30 °C’da en yüksek spesifik enzim aktivitesi gösterdiği bulunmuştur. İnsan kaynaklı *Lactobacillus casei* LB65 (5,170±0,005 U/mg) ve *Lactobacillus casei* LE4 (4,930±0,003 U/mg) suşlarının yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 40 °C olarak tespit edilirken, gıda kaynaklı *Lactobacillus rhamnosus* SMP6-5 suşu ise (5,700±0,005 U/mg) 50 °C’da yüksek spesifik enzim aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bakterilerin farklı sıcaklık değerlerindeki enzim aktivite değerlerinin 0,018-0,074 U/mL arasında, protein miktarlarının ise 0,006-0,061 mg/mL arasında olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.4. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin farklı sıcaklık değerlerinde spesifik enzim aktiviteleri



Şekil 4.5. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin farklı sıcaklık değerlerinde enzim aktiviteleri



Şekil 4.6. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin farklı sıcaklık değerlerinde protein miktarları

*Bifidobacterium* cinsi bakteriler ile *Lactobacillus rhamnosus* BAZ78 suşunun gelişme sıcaklıklarından daha düşük sıcaklık değerinde, *Lactobacillus casei* LB65, *Lactobacillus casei* LE4 ve *Lactobacillus rhamnosus* SMP6-5 suşlarının ise gelişme sıcaklıklarından daha yüksek sıcaklık değerlerinde yüksek spesifik enzim aktivitesi gösterdikleri tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analizde (Pearson'ın korelasyonu testi) protein miktarı ile spesifik enzim aktivitesi arasında  $r = -0,735$  olduğundan negatif yönde yüksek düzeyde anlamlı bir korelasyon olduğu belirlenmiştir ( $p < 0,01$ ). Ancak protein miktarı ile enzim aktivitesi arasında anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir.

*Lactobacillus* cinsi bakterilerde, kültürlerin geliştirildiği MRS besi ortamında yer alan %2'lik glukoz yerine yine aynı oranda farklı karbon kaynakları (laktoz, sukroz, fruktoz, sellobiyoz) kullanılarak suşların spesifik enzim aktiviteleri, enzim aktiviteleri ve protein miktarları belirlenmiştir. Her bir suşun farklı karbon kaynağına sahip besi ortamlarındaki spesifik enzim aktivitelerinin de farklı olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.7). *Lactobacillus rhamnosus* BAZ78 %2 glukoz içeren besi ortamında  $4,500 \pm 0,002$  U/mg, *Lactobacillus rhamnosus* SMP6-5 %2 sellobiyoz içeren besi ortamında  $3,820 \pm 0,005$  U/mg, *Lactobacillus casei* LB65 %2 fruktoz içeren besi ortamında  $6,800 \pm 0,005$  U/mg, *Lactobacillus casei* LE4 %2 sukroz içeren besi ortamında  $2,570 \pm 0,001$  U/mg diğer besi ortamlarına göre yüksek spesifik enzim aktivitesi göstermiştir.

Kültürlerin  $\beta$ -glukozidaz aktivitelerini belirlemek için kullanılan, %2 glukoz içeren MRS besi ortamına kıyasla *Lactobacillus casei* LB65 suşunun %2 fruktoz ( $6,800 \pm 0,005$  U/mg), %2 laktoz ( $4,860 \pm 0,005$  U/mg), %2 sukroz ( $3,070 \pm 0,002$  U/mg), *Lactobacillus casei* LE4 suşunun %2 laktoz ( $2,200 \pm 0,009$  U/mg), %2 sukroz ( $2,570 \pm 0,001$  U/mg), *Lactobacillus rhamnosus* SMP6-5 suşunun ise %2 sellobiyoz ( $3,820 \pm 0,005$  U/mg) içeren besi ortamlarında daha yüksek spesifik enzim aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir.

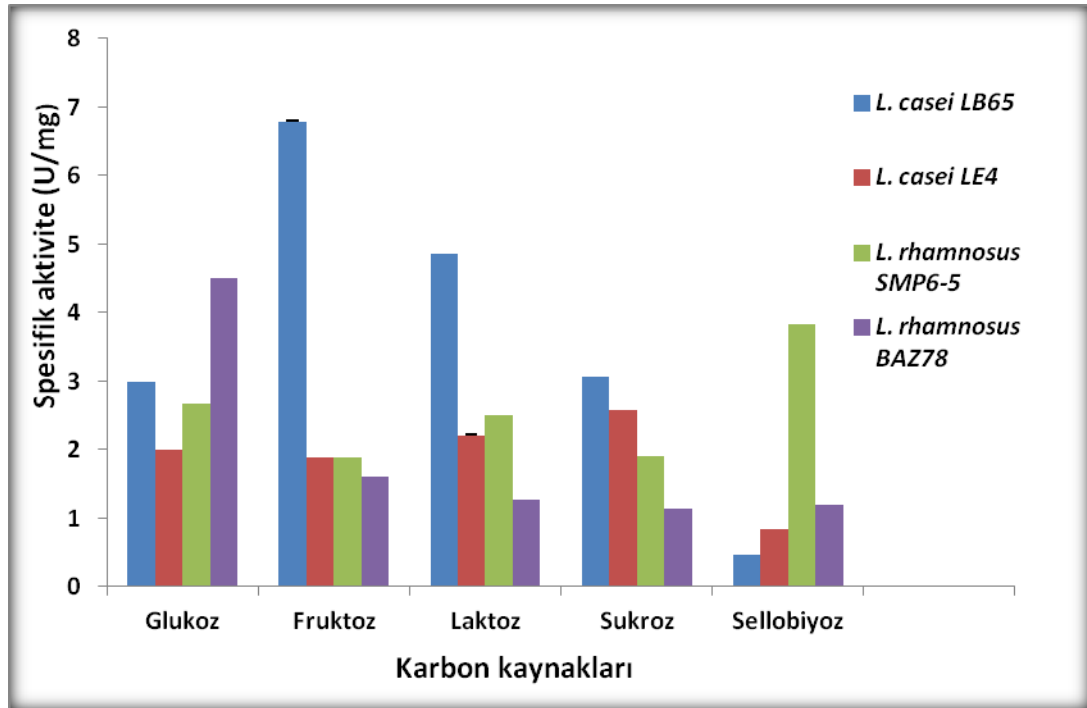
Farklı karbon kaynaklarından %2 sellobiyoz içeren ortamda *L. casei* LB65 suşu düşük enzim aktivitesine ( $0,023$  U/mL) (Çizelge 4.3, Şekil 4.8) sahipken, *L.*

*rhamnosus* SMP6-5 suşu da yüksek enzim (0,084 U/mL) aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. *Lactobacillus* cinsi bakterilerin farklı karbon kaynaklarındaki protein miktarlarının ise 0,006 mg/ml (*L. rhamnosus* SMP6-5, %2 Glukoz) (Şekil 4.8) ile 0,042 mg/mL (*L. casei* LE4, %2 Sellobiyoz) (Şekil 4.9) arasında değiştiği belirlenmiştir.

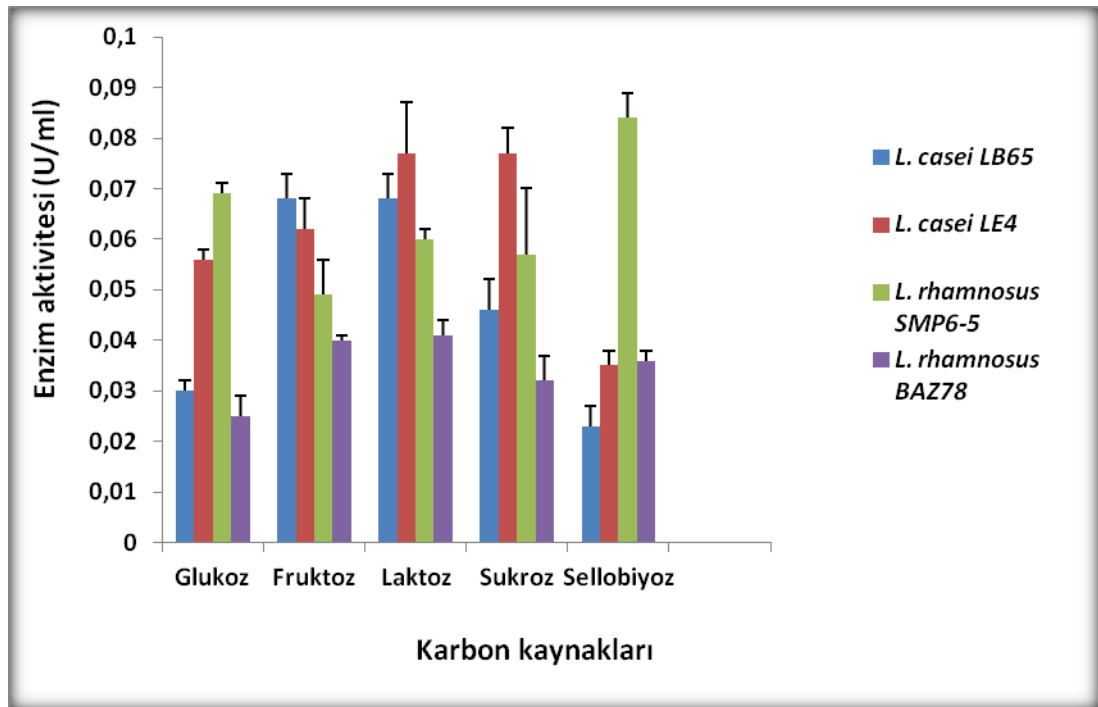
Çizelge 4.3. *Lactobacillus* cinsi bakterilerin farklı besiyortamlardaki enzim aktiviteleri, protein miktarları ve spesifik enzim aktiviteleri

Karbon Kaynağı	Tür adı	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)
GLUKOZ	<i>L. casei</i> LB65	0,030±0,002	0,010±0,002	3,000±0,001
	<i>L. casei</i> LE4	0,056±0,002	0,028±0,002	2,000±0,001
	<i>L. rhamnosus</i> BAZ78	0,027±0,004	0,006±0,002	4,500±0,002
	<i>L. rhamnosus</i> SMP6-5	0,069±0,002	0,026±0,002	2,670±0,001
FRUKTOZ	<i>L. casei</i> LB65	0,068±0,005	0,010±0,001	6,800±0,005
	<i>L. casei</i> LE4	0,062±0,006	0,033±0,002	1,880±0,003
	<i>L. rhamnosus</i> BAZ78	0,040±0,001	0,025±0,001	1,600±0,001
	<i>L. rhamnosus</i> SMP6-5	0,049±0,007	0,026±0,002	1,880±0,004
LAKTOZ	<i>L. casei</i> LB65	0,068±0,005	0,014±0,001	4,860±0,005
	<i>L. casei</i> LE4	0,077±0,010	0,035±0,002	2,200±0,009
	<i>L. rhamnosus</i> BAZ78	0,041±0,003	0,032±0,001	1,280±0,003
	<i>L. rhamnosus</i> SMP6-5	0,060±0,002	0,024±0,001	2,500±0,001
SUKROZ	<i>L. casei</i> LB65	0,046±0,006	0,015±0,003	3,070±0,002
	<i>L. casei</i> LE4	0,077±0,005	0,030±0,002	2,570±0,001
	<i>L. rhamnosus</i> BAZ78	0,032±0,005	0,028±0,002	1,140±0,005
	<i>L. rhamnosus</i> SMP6-5	0,057±0,013	0,030±0,002	1,900±0,007
SELLOBİYOZ	<i>L. casei</i> LB65	0,023±0,004	0,050±0,002	0,460±0,002
	<i>L. casei</i> LE4	0,035±0,003	0,042±0,002	0,830±0,002
	<i>L. rhamnosus</i> BAZ78	0,036±0,002	0,030±0,001	1,200±0,001
	<i>L. rhamnosus</i> SMP6-5	0,084±0,005	0,022±0,001	3,820±0,005

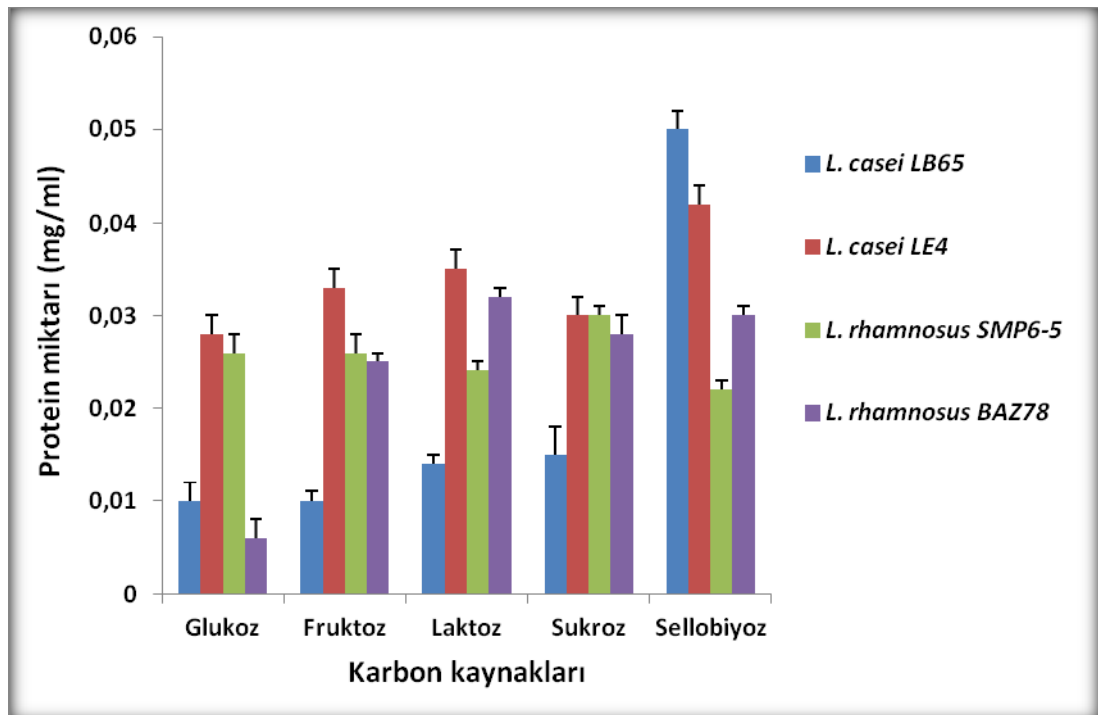
*Lactobacillus casei* LB65 suşunun %2 fruktoz içeren besiyortamında protein miktarının düşük ( $0,010 \pm 0,001$  mg/mL) (Çizelge 4.3, Şekil 4.9), enzim aktivitesinin yüksek çıktığı ( $0,068 \pm 0,005$  U/mL) (Çizelge 4.3, Şekil 4.8) ve diğer suşlara kıyasla daha yüksek spesifik enzim aktivitesi yeteneğine sahip olduğu ( $6,800 \pm 0,005$  U/mg) (Çizelge 4.3, Şekil 4.7), %2 sellobiyoz içeren besiyortamında protein miktarının yüksek ( $0,050 \pm 0,002$  mg/mL), enzim aktivitesinin düşük çıktığı ( $0,023 \pm 0,004$  U/mL) ve düşük spesifik enzim aktivitesi gösterdiği ( $0,460 \pm 0,002$  U/mg) dikkatimizi çekmiştir. Bu durumu desteklemek amacıyla Pearson'ın korelasyonu testi uygulanmış ve protein miktarı ile spesifik enzim aktivitesi arasında  $r = -0,810$  olduğundan negatif yönde yüksek düzeyde bir korelasyon olduğu görülmektedir ve  $p < 0,01$  olduğundan bu ilişki anlamlıdır. Ancak protein miktarı ile enzim aktivitesi arasında anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir.



Şekil 4.7. *Lactobacillus* cinsi bakterilerin farklı besiyortamlardaki spesifik enzim aktiviteleri



Şekil 4.8. *Lactobacillus* cinsi bakterilerin farklı besiortamlardaki enzim aktiviteleri



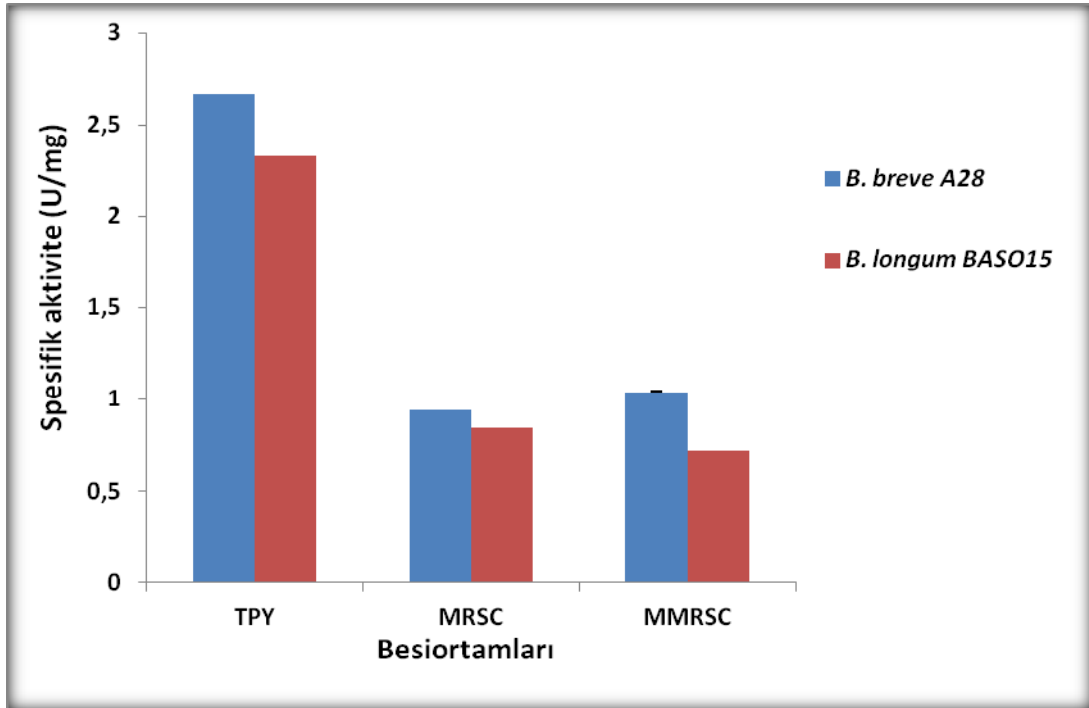
Şekil 4.9. *Lactobacillus* cinsi bakterilerin farklı besiortamlardaki protein miktarları

Bifidobakterilerin farklı besiortamlarında spesifik enzim aktiviteleri, enzim aktiviteleri ve protein miktarları Çizelge 4.4, Şekil 4.10, 4.11 ve 4.12' de verilmiştir. *Bifidobacterium breve* A28 (2,670±0,000 U/mg) ve *Bifidobacterium longum* BASO15 (2,330±0,000 U/mg) suşlarında TPY besiortamında yüksek, *Bifidobacterium longum* BASO15 (0,720±0,001 U/mg) suşunda ise MMRSC besiortamında düşük spesifik enzim aktivitesi gösterdikleri tespit edilmiştir (Şekil 4.10).

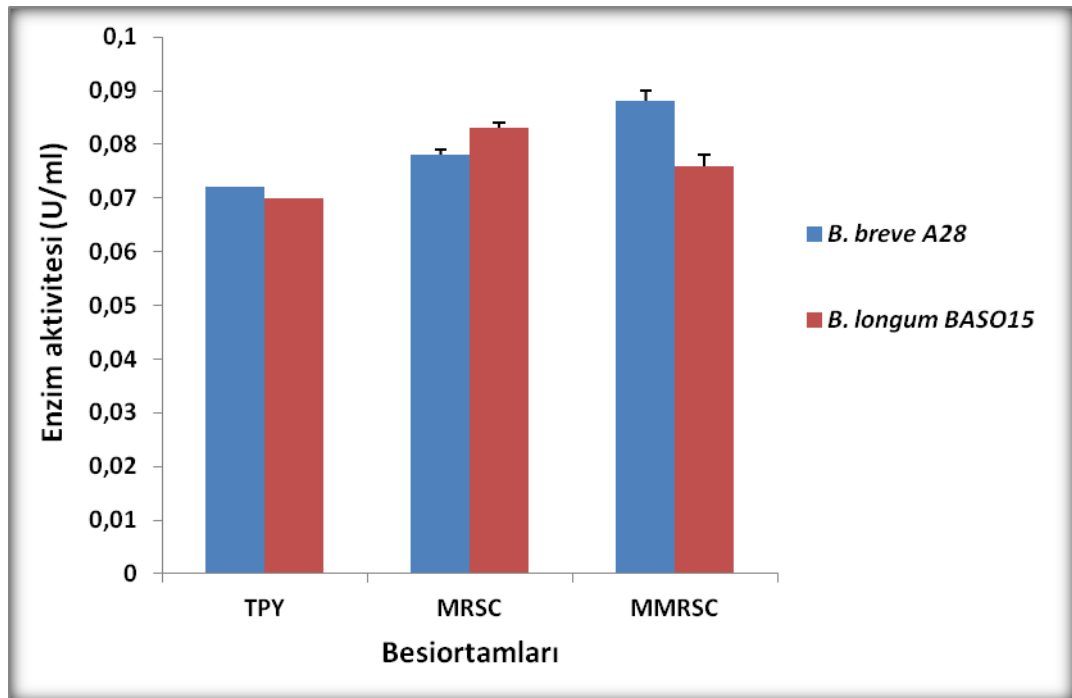
Çizelge 4.4. *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin farklı besiortamlarındaki enzim aktiviteleri, protein miktarları ve spesifik enzim aktiviteleri

Besi Yeri	Tür adı	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)
TPY	<i>B. breve</i> A28	0,072±0,000	0,027±0,000	2,670±0,000
	<i>B. longum</i> BASO15	0,070±0,000	0,030±0,000	2,330±0,000
MRSC	<i>B. breve</i> A28	0,078±0,001	0,083±0,001	0,940±0,001
	<i>B. longum</i> BASO15	0,076±0,002	0,091±0,002	0,840±0,003
MMRSC	<i>B. breve</i> A28	0,088±0,002	0,085±0,003	1,040±0,002
	<i>B. longum</i> BASO15	0,083±0,001	0,115±0,001	0,720±0,001

*Bifidobacterium* cinsine ait suşların TPY besi ortamında 0,070 U/ml-0,072 U/ml enzim aktivitesine sahip oldukları tespit edilmiştir (Çizelge 4.4, Şekil 4.11). Suşların farklı besi ortamlarındaki protein miktarlarının ise 0,027-0,115 mg/ml arasında değiştiği belirlenmiştir (Çizelge 4.4, Şekil 4.12). TPY besi ortamına kıyasla, MRSC ve MMRSC besiortamlarında, *B. breve* A28 (sırasıyla 0,078±0,001; 0,076±0,002) ve *B. longum* BASO15 (sırasıyla, 0,088±0,002; 0,083±0,001) suşlarının hem enzim aktivitelerinin hem de protein miktarlarının yüksek olduğu ancak, spesifik enzim aktivitelerinin düşük olduğu gözlenmiştir.

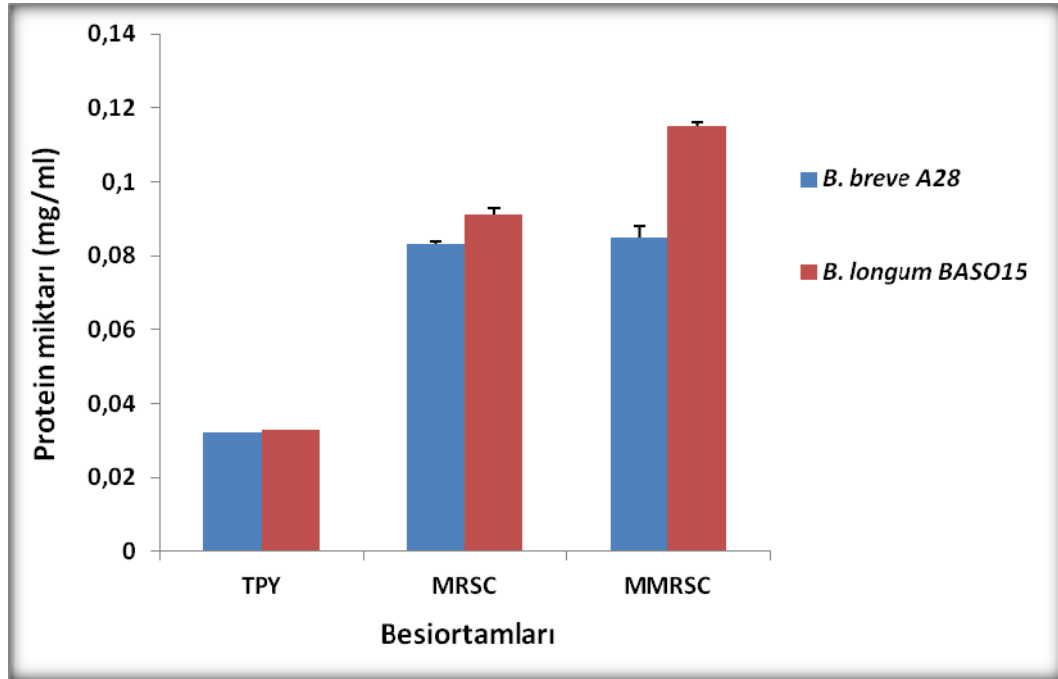


Şekil 4.10. *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin farklı besiyortamlarındaki spesifik enzim aktiviteleri



Şekil 4.11. *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin farklı besiyortamlarındaki enzim aktiviteleri





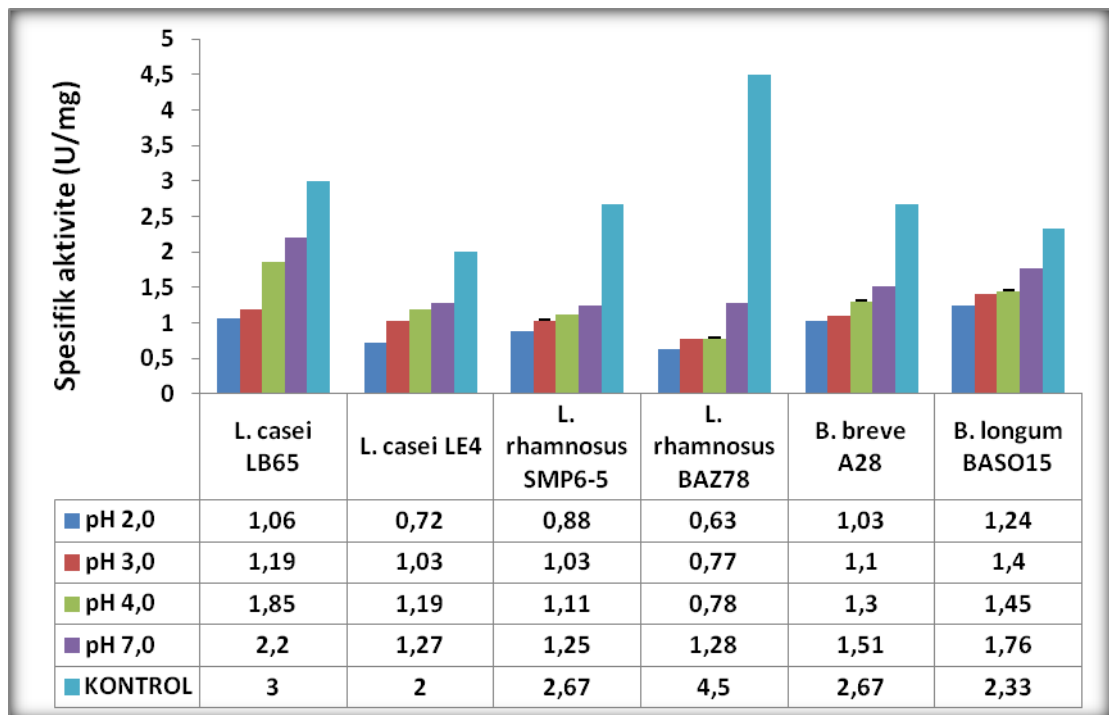
Şekil 4.12. *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin farklı besiortamlarındaki protein miktarları

MMRSC besiortamında *Bifidobacterium breve* A28 ve *Bifidobacterium longum* BASO15 suşlarının, yüksek enzim aktivite yeteneği göstermelerine rağmen (sırasıyla, 0,088±0,002 U/mL, 0,083±0,001 U/mL) protein miktarlarının yüksek (0,085±0,003 mg/mL, 0,115±0,001 mg/mL) çıkmasından dolayı, düşük spesifik enzim aktivite yeteneğine (1,04±0,002 U/mg, 0,720±0,001 U/mg) sahip oldukları dikkatimizi çekmiştir. Yapılan istatistiksel analizde (Pearson'ın korelasyonu testi) protein miktarı ile spesifik enzim aktivitesi arasında  $r = -0,970$  olduğundan negatif yönde yüksek düzeyde anlamlı bir korelasyon olduğu belirlenmiştir ( $p < 0,01$ ). Ancak protein miktarı ile enzim aktivitesi arasında anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir.

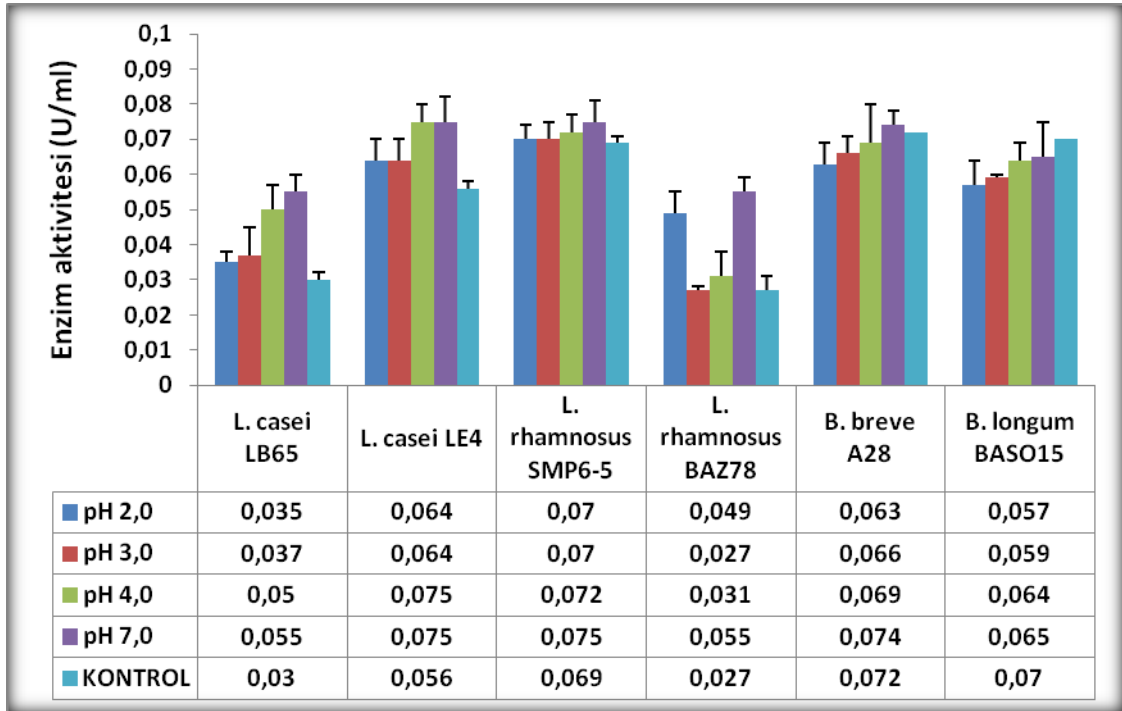
#### 4.4. Bakterilerin Yapay Mide Suyu ve Bağırsak Sıvısında $\beta$ -Glukozidaz Aktivitelerinin Belirlenmesi

Yapay mide sıvısında *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* kültürlerinin, pH 7,0'da en yüksek (*L. casei* LB65, 2,200±0,005 U/mg ve *B. longum* BASO15, 1,760±0,001 U/mg), pH 2,0'da ise en düşük (*Lactobacillus rhamnosus* BAZ78, 0,630±0,003 U/mg ve *Bifidobacterium breve* A28, 1,030±0,001) spesifik enzim aktivite yeteneğine sahip oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.13). *L. casei* LB65, *L. casei* LE4, *L.*

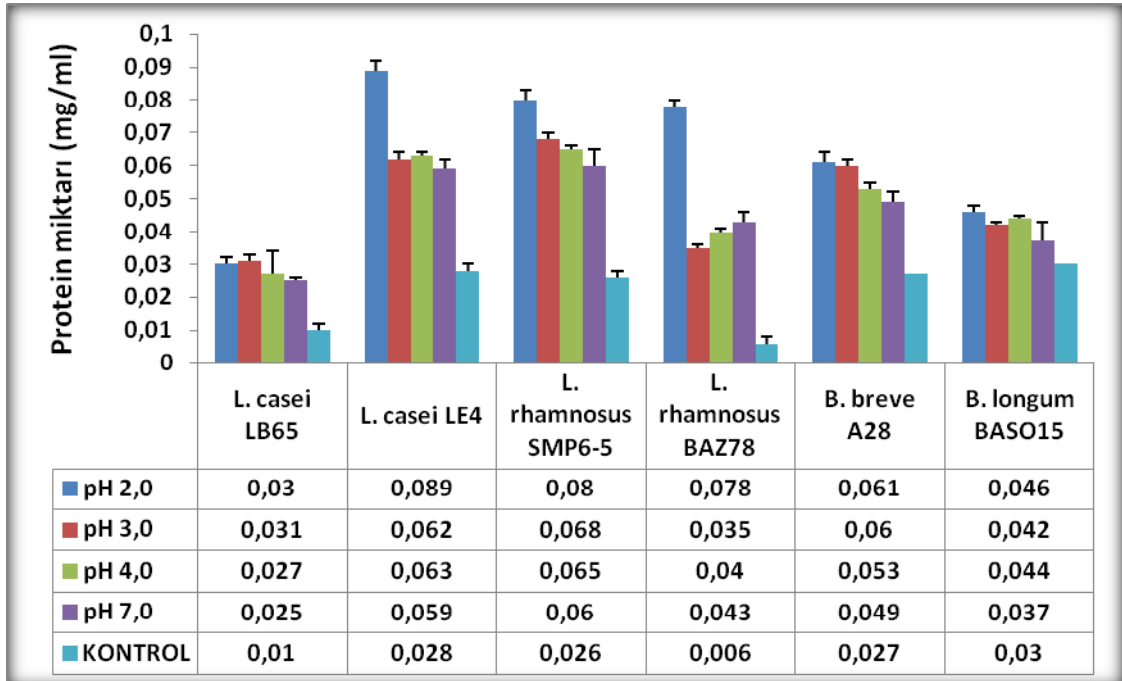
*rhamnosus* SMP6-5 suşlarının yapay mide sıvısındaki tüm pH değerlerinde kontrol (pH 7,5) grubuna kıyasla daha yüksek enzim aktivite değeri gösterdiği, *B. breve* A28 suşunun sadece pH 7,0 'da yüksek enzim aktivitesi ( $0,074 \pm 0,004$  U/mL) gösterdiği, *L. rhamnosus* BAZ78 suşunun ise pH 3,0'da kontrol grubuyla aynı ( $0,027 \pm 0,001$  U/mL), diğer pH değerlerinde daha yüksek enzim aktivitesi gösterdiği ve tüm suşların kontrol grubuna (pH 7,5) göre daha yüksek protein miktarlarına ve düşük spesifik aktiviteye sahip oldukları dikkatimizi çekmiştir.



Şekil 4.13. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin yapay mide suyunda spesifik enzim aktiviteleri



Şekil 4.14. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin yapay mide suyunda enzim aktiviteleri

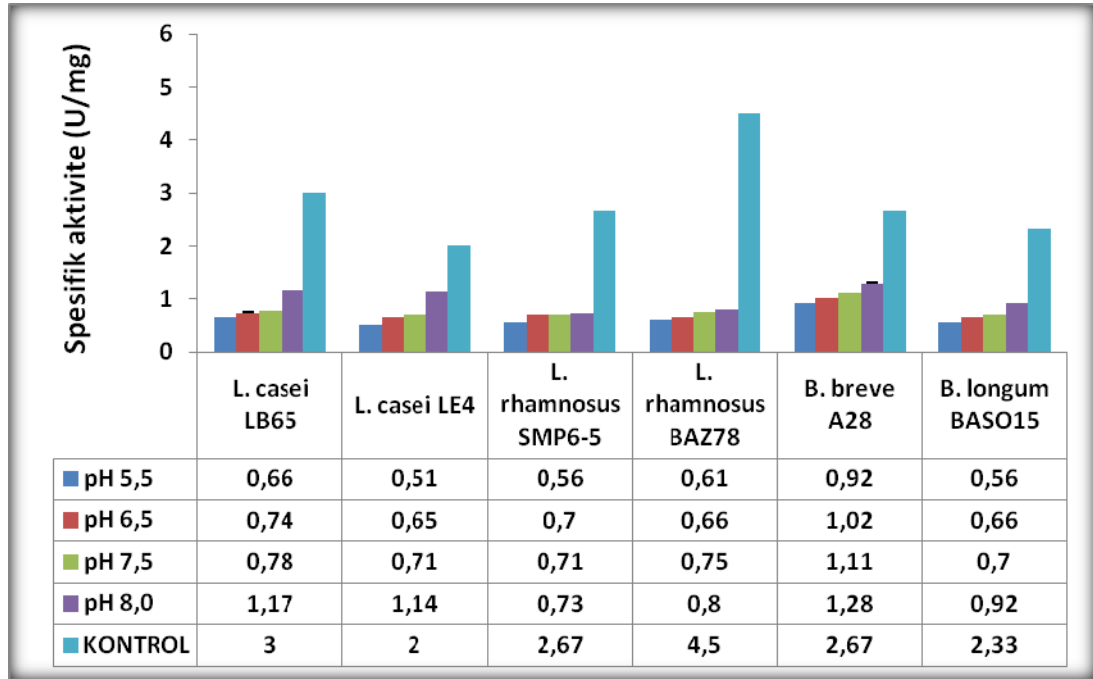


Şekil 4.15. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin yapay mide suyunda protein miktarları

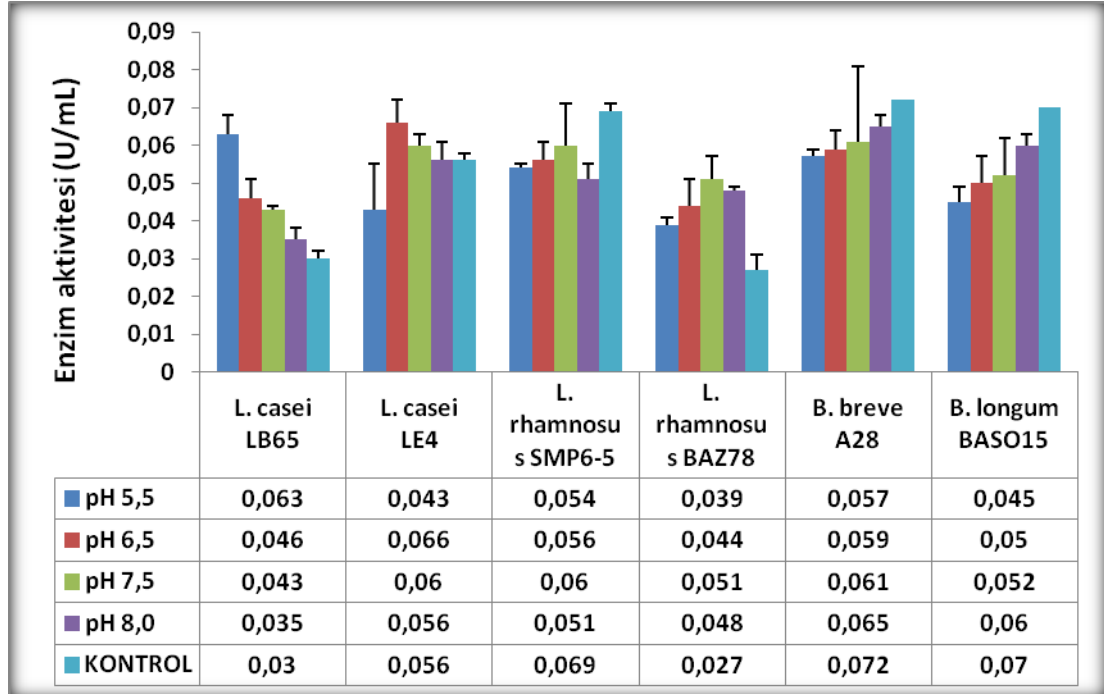
*Lactobacillus* cinsi bakterilerin yapay mide suyunda enzim aktivite değerleri 0,027-0,075 U/mL (Şekil 4.14), protein miktarları 0,025-0,089 mg/mL (Şekil 4.15), *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin ise enzim aktivite değerleri 0,057-0,074 U/ml (Şekil 4.14), protein miktarları 0,037-0,061 mg/mL (Şekil 4.15) olarak belirlenmiştir. Genel olarak suşlar değerlendirildiğinde, kullanılan 6 suşun hepsinde spesifik enzim aktivitesinin normal besiyortamındaki spesifik aktivitesine göre (kontrol) pH 7,0'da yüksek, pH 2,0'da düşük olduğu tespit edilmiştir. İstatistiki analiz sonucu protein miktarı ile spesifik enzim aktivitesi arasında  $r = -0,616$  negatif yönde orta düzeyde korelasyon olduğu ( $p < 0,01$ ), protein miktarı ile enzim aktivitesi arasında ise  $r = 0,560$  olduğundan pozitif yönde orta düzeyde bir korelasyon ( $p > 0,01$ ) belirlenmiştir.

Yapay bağırsak sıvısında, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* kültürlerinin, pH 8,0'da en yüksek (*Lactobacillus casei* LB65,  $1,170 \pm 0,001$  U/mg ve *Bifidobacterium breve* A28,  $1,280 \pm 0,003$  U/mg), pH 5,5'te en düşük (*Lactobacillus casei* LE4,  $0,510 \pm 0,008$  U/mg ve *Bifidobacterium longum* BASO15,  $0,560 \pm 0,002$  U/mg) spesifik enzim aktivite yeteneğine sahip oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.16).

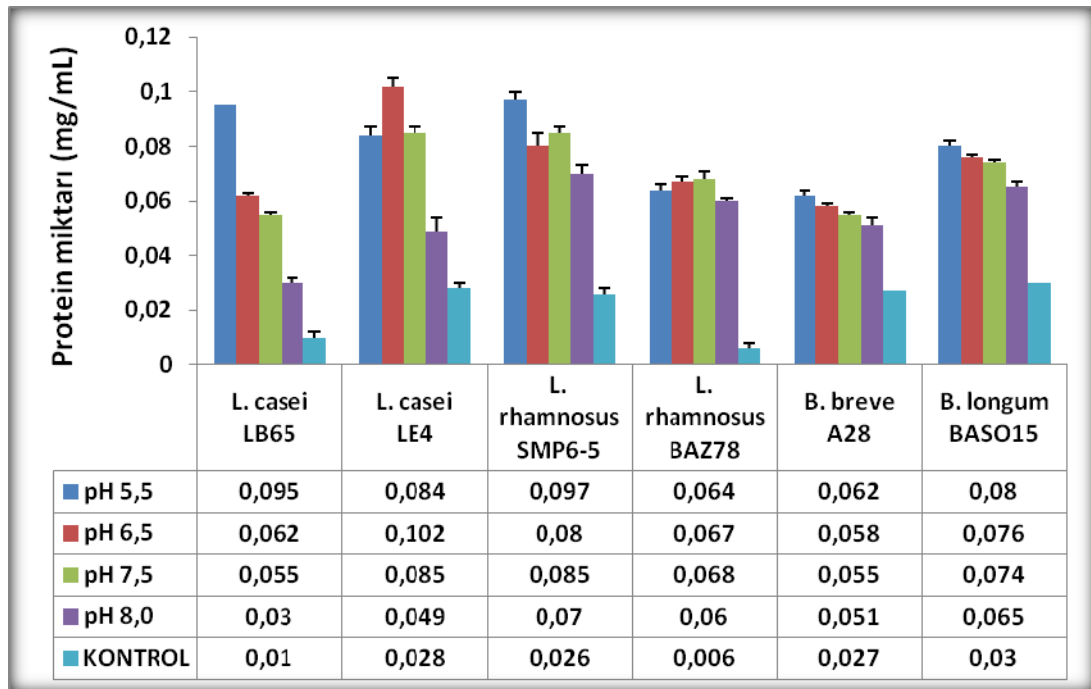
Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'de suşların sırasıyla yapay bağırsak sıvısındaki enzim aktiviteleri ve protein miktarları yer almaktadır. *L. casei* LE4 suşu 0,066 U/mL ile pH 6,5' da hazırlanan yapay bağırsak sıvısında geliştirildiğinde yüksek enzim aktivitesi gösterirken, *L. casei* LB65 suşu pH 8,0 de hazırlanan yapay bağırsak sıvısında geliştiğinde düşük enzim aktivitesi (0,035 U/mL) göstermiştir. Yapay bağırsak sıvısında farklı pH'larda geliştiklerinde suşların protein miktarları ise 0,030-0,102 mg/mL arasında değişmiştir.



Şekil 4.16. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin yapay bağırsak sıvısında spesifik enzim aktiviteleri



Şekil 4.17. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin yapay bağırsak sıvısında enzim aktiviteleri



Şekil 4.18. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin yapay bağırsak sıvısında protein miktarları

Spesifik enzim aktivitesinin yüksek olmasının, enzim aktivitesi ve protein miktarı ile olan ilişkisini belirlemek amacıyla Pearson'ın korelasyonu testi uygulanmış ve protein miktarı ile spesifik enzim aktivitesi arasında  $r = -0,778$  olduğundan negatif yönde yüksek düzeyde bir korelasyon olduğu görülmektedir ve  $p < 0,01$  olduğundan bu ilişki kuvvetli bir şekilde anlamlıdır. Enzim aktivitesi ile protein miktarı arasında ise istatistiksel korelasyon bulunamamıştır.

#### 4.5. Enzimin Kısmi Saflaştırılması

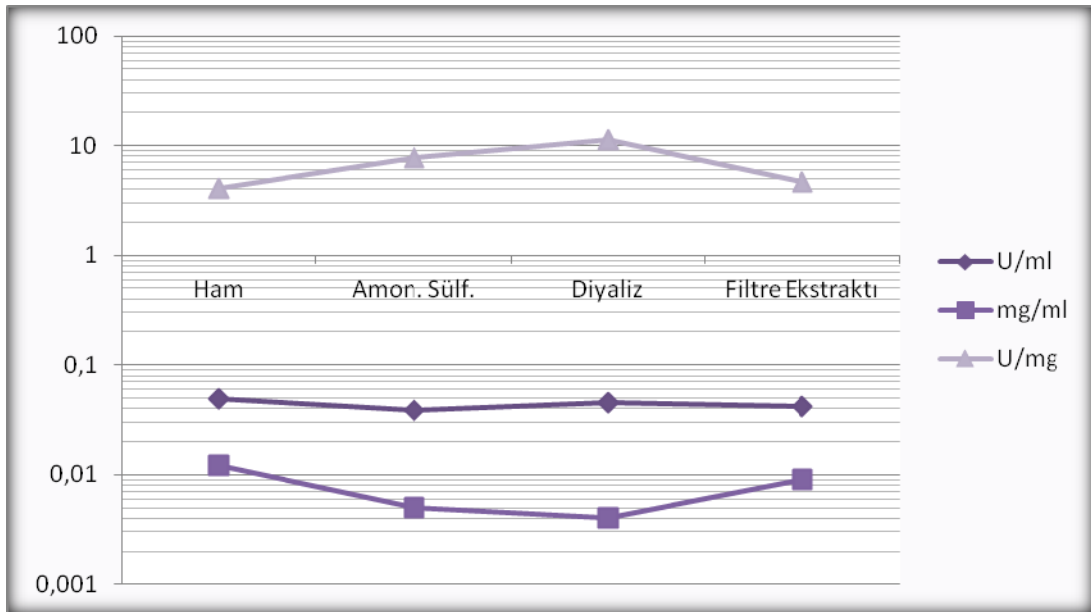
*Lactobacillus rhamnosus* BAZ78 ve *Lactobacillus casei* LB65 suşlarının 3.2.3.'te belirtilen yöntemle  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesi, 3.2.6'da belirtilen yöntemle ise protein konsantrasyonu belirlenmiştir. Ham *Lactobacillus rhamnosus* BAZ78 örneğinin enzim aktivitesi 0,027 U/mL, protein miktarı 0,006 mg/mL, spesifik aktivitesi ise 4,500 U/mg olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.5). Enzime herhangi bir saflaştırma işlemi uygulanmadığı için saflaştırma oranı 0, kurtarma faktörü ise %100 olarak kabul edilmiştir. Enzimin kısmi saflaştırılması için ham örnek %80 amonyum sülfat ile çöktürülmüştür. Çöktürme işlemi sonucu enzim aktivitesi 0,039 U/mL,

protein miktarı 0,005 mg/ml, spesifik aktivitesi ise 7,800 U/mg olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.5). Saflaştırma oranı, amonyum sülfatla çöktürülen örneğin spesifik aktivitesinin, ham örneğin spesifik aktivitesine oranlanmasıyla elde edilmiştir (1,733). Kurtarma faktörü ise amonyum sülfatla çöktürülen örneğin enzim aktivitesinin, ham örneğin enzim aktivitesine oranlanmasıyla elde edilerek %69 olarak tespit edilmiştir. Ortamdaki tuzların uzaklaştırılması için uygulanan diyaliz işlemi sonunda enzim aktivitesi 0,045 U/mL, protein miktarı 0,004 mg/mL, spesifik aktivitesi ise 11,250 U/mg olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.5). Diyaliz sonucu elde edilen örneğin spesifik enzim aktivitesinin ham örneğin spesifik aktivitesine oranlanmasıyla saflaştırma oranı 2,500, enzim aktivitelerinin birbirine oranlanmasıyla kurtarma faktörü %92 olarak belirlenmiştir. Diyaliz sonrası elde edilen örnek Amicon 50 K ile filtreden geçirilmiş ve enzim aktivitesi 0,042 U/mL, protein miktarı 0,009 mg/mL, spesifik aktivitesi ise 4,667 U/mg olarak tespit edilmiştir. Filtre edilmiş örneğin saflaştırma oranı 1,037, kurtarma faktörü ise %86 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.5, Şekil 4.19).

Çizelge 4.6 ve Şekil 4.20'da *Lactobacillus casei* LB65 suşunun saflaştırma basamakları sonucu elde edilen veriler gösterilmiştir. Ham örneğin enzim aktivitesi 0,030 U/mL, protein miktarı 0,010 mg/mL, spesifik aktivitesi ise 3,000 U/mg olarak tespit edilmiştir. %80 amonyum sülfatla çöktürme işlemi sonucu enzim aktivitesi 0,030 U/mL, protein miktarı 0,004 mg/mL, spesifik aktivitesi ise 7,500 U/mg olarak belirlenmiştir. Saflaştırma oranı 2,600 kurtarma faktörü ise %100 olarak tespit edilmiştir. Diyaliz işlemi sonucu enzim aktivitesi 0,032 U/mL, protein miktarı 0,003 mg/ml, spesifik aktivitesi ise 10,667 U/mg, saflaştırma oranı 3,556 iken kurtarma faktörü ise %94 olarak tespit edilmiştir. Amicon 50 K (Millipore) ile filtreden geçirilmiş örneğin enzim aktivitesi 0,031 U/mL, protein miktarı 0,008 mg/mL, spesifik aktivitesi ise 3,875 U/mg olarak belirlenmiştir. Saflaştırma oranı 1,292, kurtarma faktörü ise %91 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. *Lactobacillus rhamnosus* BAZ78 suşunun kısmi saflaştırma işlemi öncesi ve sonrasında elde edilen aktivite değerleri

Saflaştırma Basamağı	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Oranı	Kurtarma Faktörü (%)
Ham ekstrakt	0,027	0,006	4,500	0	100
Amonyum sülfat (%80)	0,039	0,005	7,800	1,733	69
Diyaliz	0,045	0,004	11,250	2,500	92
Filtre edilmiş ekstrakt	0,042	0,009	4,667	1,037	86

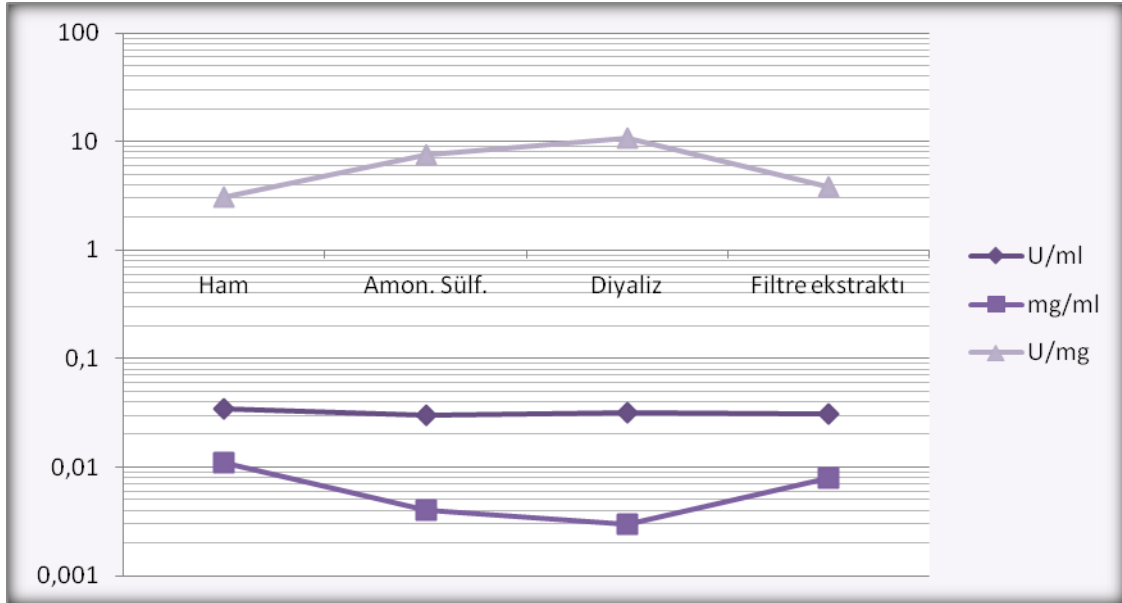


Şekil 4.19. *Lactobacillus rhamnosus* BAZ78 suşunun saflaştırma basamakları sonucu elde edilen aktivite değerleri



Çizelge 4.6. *Lactobacillus casei* LB65 suşunun kısmi saflaştırma işlemi öncesi ve sonrasında elde edilen aktivite değerleri

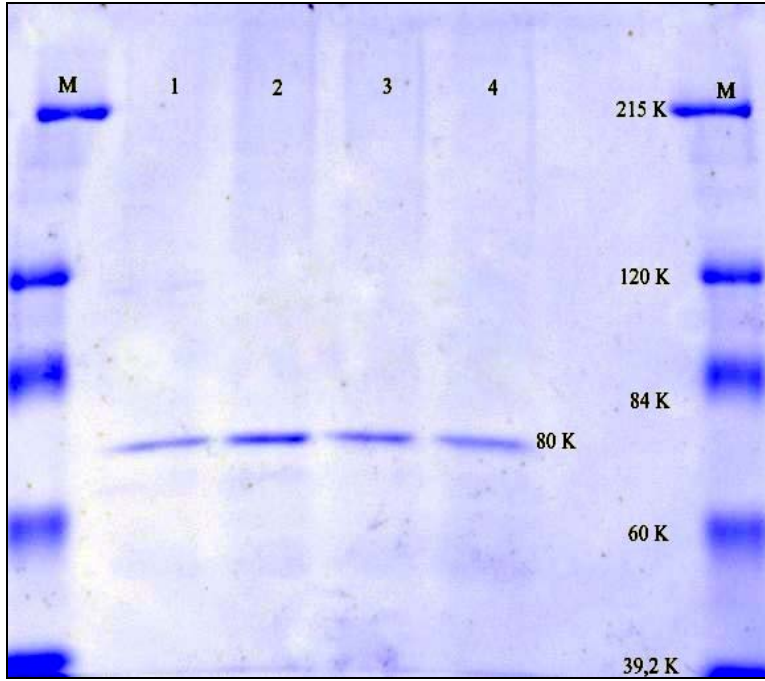
Saflaştırma Basamağı	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Oranı	Kurtarma Faktörü (%)
Ham ekstrakt	0,030	0,010	3,000	0	100
Amonyum sülfat (%80)	0,030	0,004	7,500	2,600	100
Diyaliz	0,032	0,003	10,667	3,556	94
Filtre edilmiş ekstrakt	0,031	0,008	3,875	1,292	91



Şekil 4.20. *Lactobacillus casei* LB65 suşunun saflaştırma basamakları sonucu elde edilen aktivite değerleri

#### 4.6. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

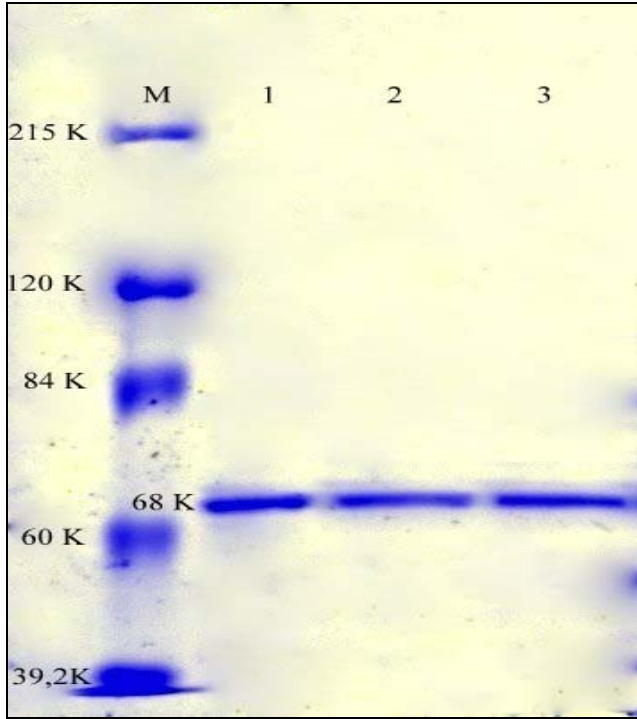
*Lactobacillus rhamnosus* BAZ78 ve *Lactobacillus casei* LB65 suşlarından elde edilen ham ekstrakt ve kısmi saflaştırma sonucu elde edilen  $\beta$ -glukozidaz enzimi 3.2.5'te belirtildiği gibi SDS-PAGE'e uygulanmıştır. *Lactobacillus rhamnosus* BAZ78 suşunda  $\beta$ -glukozidaz enziminin molekül ağırlığı 68 K olarak gözlenirken (Resim 4.4), *Lactobacillus casei* LB65 suşunda 80 K (Resim 4.5) olarak tespit edilmiştir.



Resim 4.4. *Lactobacillus casei* LB65 SDS-PAGE görüntüsü

M: Marker

1. Ham ekstrakt
2. Diyalizden sonraki örnek
3. Amonyum sülfat ile çöktürmeden sonraki örnek
4. Amicon 50K ile filtre edilmiş ekstrakt



Resim 4.5 *Lactobacillus rhamnosus* BAZ78 SDS-PAGE görüntüsü

M. Marker

1. Ham ekstrakt
2. Amonyum sülfat ile çöktürmeden sonraki örnek
3. Diyalizden sonraki örnek

#### 4.7. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analizi

Yüksek  $\beta$ -glukozidaz spesifik aktivite gösteren, *Lactobacillus rhamnosus* BAZ78, *Lactobacillus casei* LB65 ve *Lactobacillus rhamnosus* SMP6-5 suşlarının izoflavon glikozitleri (genistin, daidzin) hidrolize etme yetenekleri yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile tespit edilmiştir. Ancak kullanılan üç suşun, kullanılan izoflavon glukozitlerden daidzin ve genistini hidrolize etme yeteneğinde olmadıkları belirlenmiştir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

İzoflavonların biyolojik aktiviteleri genistin, daidzin, glisitin gibi glukozit formlarından değil genistein, daidzein, glisitein gibi aglikon formlarından kaynaklanmaktadır. İzoflavon glukozitler yüksek molekül ağırlıkları ve yüksek hidrofilik özellikleri nedeniyle bağırsak duvarından çok yavaş emilirken aglikonlar oldukça hızlı emilmektedirler. Mikroorganizmalar tarafından üretilen  $\beta$ -glukozidaz enzimi ile  $\beta$ -D-glukozitlerin,  $\beta$ -1,4 glukozidik bağlarını katalize edilerek, izoflavon glukozidazları sağlık açısından yararlı olan biyoaktif izoflavon aglikon formlarına dönüştürülebilmektedir. Bu nedenle yüksek  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesi gösteren bakteriler de izoflavonların hidrolizasyonunun daha fazla olduğu düşünülmektedir [Liggins ve ark., 1998].

Çalışmada, insan, gıda ve hayvan kaynaklı olmak üzere toplam 42 adet suş kullanılmıştır ve bu suşların  $\beta$ -glukozidaz enzim aktiviteleri belirlenmiştir (Çizelge 4.1). En yüksek spesifik enzim aktivitesi hayvan kaynaklı *Lactobacillus rhamnosus* BAZ78 ( $4,500 \pm 0,002$  U/mg), gıda kaynaklı *Lactobacillus rhamnosus* SMP6-5 ( $2,670 \pm 0,001$  U/mg), insan kaynaklı *Lactobacillus casei* LB65 ( $3,000 \pm 0,001$  U/mg), *Lactobacillus casei* LE4 ( $2,000 \pm 0,001$  U/mg), *Bifidobacterium breve* A28 ( $2,670 \pm 0,000$  U/mg), ve *Bifidobacterium longum* BASO 15 ( $2,330 \pm 0,000$  U/mg) suşlarında tespit edilmiştir. Tüm suşlar 0,010-0,090 U/mL aralıklarda enzim aktivitesi, 4,500-0,250 U/mg aralıklarda spesifik aktivite göstermişlerdir. Bakterilerin enzim aktiviteleri hücre pelletinde gözlenmiş, kültür süpernatantında herhangi bir aktiviteye rastlanılmamıştır.

Çalışmada farklı kaynaklardan (insan, gıda, hayvan) izole edilen suşlar kullanılmış ve izolasyon kaynağına göre enzim aktivitelerinde de farklılık gözlenmiştir (Çizelge 4.1). Genel olarak suşların spesifik enzim aktiviteleri değerlendirildiğinde, tavuktan izole edilen suşların (*Lactobacillus rhamnosus* BAZ78 hariç) enzim aktivitelerinin düşük olduğu, insan kaynaklı suşların ise enzim aktivitelerinin diğer suşlara göre daha yüksek olduğu dikkatimizi çekmiştir.

Marazza ve ark., [2009] yapmış oldukları çalışmada en yüksek spesifik enzim aktivitesini *Lactobacillus rhamnosus* CRL981 (22,93 UE/mg) suşunda gözledikleri ve hücre süpernatantında enzim aktivitesine rastlamadıkları bildirilmiştir. Tsangalis ve ark., [2002] *Bifidobacterium longum-b* suşunda  $4,625 \pm 0,034$  U/mg miktarında  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesine sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Choi ve ark., [2002], *Lactobacillus bulgaricus* KCTC 3188, *L. casei* KCTC 3109, *L. delbrueckii* KCTC 1047, *L. delbrueckii* KCTC 1058 ve *L. lactis* KCTC 2181 suşlarını MRS besi ortamında geliştirerek, suşların  $\beta$ -glukozidaz aktivitelerini belirlemişlerdir. Çalışma sonunda en yüksek  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesini, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* KCTC 1047 suşunun (0,3 unit) gösterdiğini ayrıca, diğer suşların *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* KCTC 1047 suşuna kıyasla önemli ölçüde  $\beta$ -glukozidaz aktivitesine sahip olmadıklarını rapor etmişlerdir. Yapılan çalışmalarda kullanılan suşların enzim aktivitelerinde farklılık olduğu görülmektedir. Bu farklılıkların suşların izolasyon kaynağı, kullanılan besi ortamı, tampon, sıcaklık ve pH'dan kaynaklanabileceği söylenebilir.

Enzim reaksiyonları sıcaklık, pH gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Düşük asidik ve yüksek alkali pH'larda enzimin aktif merkezindeki prototropik grupların iyonlaşmalarındaki değişimler aktif merkezin uygun konformasyonunu, substratın bağlanmasını ve tepkimenin katalizine etki etmektedir [Koolman ve Roehm, 2005]. Bu çalışmada, enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan besi ortamı, sıcaklık ve pH'nın etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda enzim aktivitelerinin optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Choi ve ark., [2002] yaptıkları enzim optimizasyon çalışmasıyla yüksek  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesi gösteren *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* KCTC 1047 suşu için en uygun pH değerinin 6,0 olduğunu bildirmişlerdir. Marazza ve ark., [2009], pH'nın enzim aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla, 100 mM McIlvaine tamponun pH'sını 3,0-8,0'a ayarlamışlardır. Yüksek spesifik enzim aktivitesi gösteren *Lactobacillus rhamnosus* CRL981 suşu için en uygun pH değerinin 6,4 olduğunu belirlemişlerdir. Sestelo ve ark., [2004] şaraptan izole edilen

*Lactobacillus plantarum* suşunu pH 4,5-7,5 geliştirmişler, optimum pH değerinin 5,0 olduğunu tespit etmişlerdir.

Çalışmada seçilen suşlarda pH'nın enzim aktivitesi üzerindeki etkisini gözlemlemek amacıyla 0,5 M potasyum fosfat tamponunun pH'sı 4,0-8,0'a ayarlanmıştır. Farklı pH değerlerinde, suşlar 0,750- 4,500 U/mg aralıklarda spesifik aktivite (Şekil 4.1), 0,014-0,080 U/mL aralıklarda enzim aktivitesi (Şekil 4.2) göstermişlerdir. Bakterilerin pH 4,0'dan pH 7,5'e kadar enzim aktivitesinde artış gözlenmiş ve en yüksek aktivite pH 7,5'te belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Optimum pH değerinden sonra aktivitede düşme görülmüştür. Matsuda ve ark.larının [1994] bildirdiği gibi, bu çalışmada da pH 7,5'te yüksek spesifik aktivite tespit edilmiştir. Bütün bu sonuçlar doğrultusunda,  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesinin belirlenmesinde en uygun pH değerinin 7,5 olduğu söylenebilir.

Çalışmada, suşlar 30-60 °C sıcaklıklarda 0,600-5,700 U/mg spesifik aktivite (Şekil 4.4), 0,018-0,074 U/mL enzim aktivitesi (Şekil 4.5) gösterdiği belirlenmiştir. *Bifidobacterium* kültürlerinin ve hayvan kaynaklı *Lactobacillus rhamnosus* BAZ 78 suşunun 30 °C'da, insan kaynaklı *Lactobacillus casei* LB65 ve *Lactobacillus casei* LE4 suşlarının 40 °C'da, gıda kaynaklı *Lactobacillus rhamnosus* SMP6-5 suşunun ise 50 °C'da en yüksek enzim aktivite değerini gösterdiği tespit edilmiştir. *Bifidobacterium* cinsi bakteriler ile *Lactobacillus rhamnosus* BAZ78 suşunun gelişme sıcaklıklarından daha düşük sıcaklık değerinde, *Lactobacillus casei* LB65, *Lactobacillus casei* LE4 ve *Lactobacillus rhamnosus* SMP6-5 suşlarının ise gelişme sıcaklıklarından daha yüksek sıcaklık değerlerinde yüksek spesifik enzim aktivitesi gösterdikleri tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan suşların 60 °C'de düşük spesifik aktivite ve enzim aktivitesi göstermelerine rağmen, protein miktarlarında artış gözlenmesi, protein yapılarının yüksek sıcaklığa karşı dayanıklı olduğunu ve bu suşların ticari olarak kullanılabilceğini düşündürmektedir.

Enzim aktivitesinin 45 °C'ye kadar etkin aktivite gösterdiği, bu sıcaklık değerinin üzerinde enzim aktivasyonunun düştüğü bildirilmektedir [Choi ve ark., 2002]. Marazza ve ark., [2009] *Lactobacillus rhamnosus* CRL981 suşu için optimum

sıcaklık değerini 42 °C olduğunu, Coulon ve ark., [1998] ise *Lactobacillus casei* ATCC 393 suşunun 35 °C’de en yüksek  $\beta$ -glukozidaz aktiviteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Sestelo ve ark., [2004] *Lactobacillus plantarum* suşunun 30-55 °C sıcaklık değerlerinde enzim aktivitesini tespit etmişler ve enzim aktivitesinin 45°C’de en yüksek değerde olduğunu belirlemişlerdir. Marazza ve ark., [2009] enzimi 50 °C’de 5 dak. belettiklerinde *Lactobacillus rhamnosus* CRL981 suşunun  $\beta$ -glukozidaz aktivitesinde %20, Sestelo ve ark., [2004] aynı işlemi uyguladıklarında *Lactobacillus plantarum* suşunun enzim aktivitesinde %50 azalma olduğunu tespit etmişlerdir.

Yapılan çalışmalarda enzim aktivitesi için uygun sıcaklıkların farklı olduğu, bu çalışmada da sıcaklığa bağlı olarak enzim aktivitesinin değiştiği görülmektedir. Ayrıca, sıcaklık enzim yapısında etkili olduğundan enzim aktivitesinin belirlenmesinde de etkili olmakta ve sıcaklık değişimine bağlı olarak enzim aktivitesi de değişmektedir. Sıcaklık, enzimin protein yapısında değişikliğe neden olduğundan enzim aktivitesinin belirlenmesinde bütün suşlar için belirli bir sıcaklık değeri gözlenememiştir. Ancak, çalışmada *Lactobacillus rhamnosus* SMP6-5 suşunun 50 °C’da en yüksek enzim aktivite değeri göstermesi, enzimin endüstriyel uygulamalarda (biyoteknoloji, gıda sanayi, farmakoloji) kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Tsangalis ve ark., [2002] kullanılan karbon kaynaklarının, enzim aktivitesi üzerindeki etkisini tespit etmek amacıyla, 5 adet bifidobakter suşunu (*Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium longum-a*, *Bifidobacterium longum-b*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium infantis*) MRS sıvı besiyeri, MRS-glukoz sıvı besiyeri, MRS-laktoz sıvı besiyeri ve MRS-rafinoz sıvı besiyerinde geliştirmişlerdir. Suşların besiyerlerindeki spesifik aktivite aralıkları MRS sıvı besiyerinde 0-0,779 U/mg, MRS-glukoz sıvı besiyerinde 0-4,625 U/mg, MRS-laktoz sıvı besiyerinde 0-3,651 U/mg, MRS-rafinoz sıvı besiyerinde 0-0,780 U/mg olarak bildirmişlerdir. *Bifidobacterium infantis* suşunun, kullanılan besiyerlerinde herhangi bir enzim aktivitesi göstermediğini, diğer suşların MRS-glukoz sıvı besiyerinde yüksek  $\beta$ -glukozidaz aktiviteye sahip olduklarını rapor etmişlerdir.

Marazza ve ark., [2009] yapmış oldukları çalışmada, *Lactobacillus* cinsi bakteriler içerisinde *Lactobacillus rhamnosus* ve *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* türlerinde  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesine rastlamışlardır. *Lactobacillus rhamnosus* için spesifik enzim aktivite aralığının 0,5-22,93 UE/mg, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* için ise 0,28-7,99 UE/mg olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, *Lactobacillus rhamnosus* suşları içerisinde %18'inin, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* suşları içerisinde ise %55'inin düşük enzim aktiviteye (<1,4 UE/mg) sahip olduklarını rapor etmişlerdir. *Lactobacillus rhamnosus* CRL981 suşunun, Tsangalis ve ark., [2002] çalışmalarında kullandıkları en yüksek  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesine sahip *Bifidobacterium longum-b* suşundan 4,9 kat daha fazla enzim aktivitesine sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Çalışmada *Lactobacillus* cinsi bakteriler, farklı karbon kaynaklarına sahip besiortamlarında (glukoz, fruktoz, sukroz, laktoz, sellobiyoz) geliştirilmiştir. %2 fruktoz içeren MRS besiortamında en yüksek  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesi *Lactobacillus casei* LB65 suşunda (6,800±0,005 U/mg) belirlenmiştir (Çizelge 4.3). *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin farklı besiortamlardaki enzim aktivitesinin belirlenmesi için TPY, MRSC ve MMRSC besiortamları kullanılmıştır (Çizelge 4.4). *Bifidobacterium breve* A28 suşunun, TPY besiortamında 24-36 saat inkübasyon sonunda 2,670±0,000 U/mg ile yüksek enzim aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.10). *Lactobacillus* cinsi bakterilerde her bir suşun, farklı karbon kaynağına sahip besiortamında enzim aktivitesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu durum kültürlerin izolasyon kaynaklarının farklı olmasından dolayı olabileceği gibi, aynı kaynaktan izole edilen mikroorganizmalar için suşlara göre farklılık göstermesinden ya da gelişmek için ihtiyaç duydukları karbon kaynağının farklılığından kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir.

Yapay mide suyu ve bağırsak sıvısında bakterilerin enzim aktivitesini belirlemek için ortam çeşitli pH değerlerine ayarlanmıştır. Suşların yapay mide sıvısında 0,630-2,200 U/mg (Şekil 4.13) aralıklarda spesifik aktiviteye, 0,027-0,075 U/mL aralıklarda enzim aktivitesine (Şekil 4.14), yapay bağırsak sıvısında ise 0,510-1,280 U/mg aralıklarda spesifik aktiviteye (Şekil 4.16), 0,035-0,066 U/ml aralıklarda enzim



aktivitesine (Şekil 4.17) sahip oldukları belirlenmiştir. Yapay mide sıvısında pH 7,0'da *Lactobacillus casei* LB65 (2,200±0,005 U/mg), *Bifidobacterium longum* BASO15 (1,760±0,001 U/mg) yapay bağırsak sıvısında ise pH 8,0'da *Lactobacillus casei* LB65 (1,170±0,001 U/mg), *Bifidobacterium breve* A28 (1,280±0,003 U/mg) suşlarının yüksek spesifik enzim aktivitesine sahip oldukları tespit edilmiştir.

Literatür taramalarında bakterilerin, mide ve bağırsak sıvısında enzim aktivitelerini belirlemeye yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışma, bu konuda yapılan ilk çalışmadır. Bakterilerin mide ve bağırsak ortamında canlılıklarını koruyarak yüksek  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesi göstermeleri, midenin asit ortamını ve bağırsakta bulunan safrayı tolere edebilmeleri bakımından probiyotik özelliklerine alternatif bir bakış açısı getirmiş olacaktır. Bu suşlarla hazırlanacak ürünlerin tüketilmesiyle, insanlara daha iyi sağlık olanaklarının sunulması, yaşam kalitelerinin yükseltilmesi, gıda maddelerinin daha verimli ve uzun vade de tüketilebilmesi, sağlığa karşı oluşabilecek risk faktörlerinin azaltılması ve önlenmeye çalışılması gibi olumlu etkilerin de sağlanabileceğini düşünmekteyiz.

Genel olarak laboratuvar çalışmaları ve sanayide kullanım için enzim saflaştırma işlemi gereklidir. Laboratuvar çalışmaları için az fakat saflık derecesi oldukça yüksek, sanayideki kullanımı için ise çok fakat saflık derecesinin yüksekliği pek de fazla olmayan enzim örnekleri gereklidir. Saflaştırma basamaklarında önemli olan enzim kaybını en aza indirerek yüksek düzeyde saf, aktivitesi yüksek enzimin elde edilmesidir [Takaç, 2008]. Çalışmada kullanılacak enzimin ortamda istenmeyen diğer proteinlerden uzaklaştırılması ve enzimin molekül ağırlığına yakın diğer enzimlerden ayırt edilebilmesi için kısmi saflaştırma işlemini uygulanmıştır.

Michlmayr ve ark., [2010] *Lactobacillus brevis* SK3 suşunun  $\beta$ -glukozidaz enzimine saflaştırma işlemi uygulamışlardır. Saflaştırma basamağından önce ham örneğin enzim aktivitesini 172 U, toplam protein miktarını 575 mg, spesifik enzim aktivitesini ise 0,29 U/mg olarak belirlemişlerdir. %30 amonyum sülfat ile çöktürme işlemi yapıldıktan sonra enzim aktivitesi 174 U, protein miktarı 484 mg, spesifik aktivitesi ise 0,36 U/mg olarak belirleyerek enzimin 1.2 kat saflaştırıldığını ve hiç

enzim kaybının olmadığını bildirmişlerdir. Sephacryl S-300 kolonu kullandıklarında enzim aktivitesi 29 U, protein miktarı 0,41 mg, spesifik aktivitesi ise 70,9 U/mg olduğunu ve enzimin 244 kat daha saf bir şekilde elde edildiğini fakat enzimin %17 oranında kurtarılabildiğini belirlemişlerdir.

Çalışmada *Lactobacillus casei* LB65 ve *Lactobacillus rhamnosus* BAZ78 suşlarının  $\beta$ -glukozidaz enzimlerinin, kısmi olarak saflaştırılması için uygulanan saflaştırma işlemi sonucunda, *Lactobacillus rhamnosus* BAZ78 suşunda enzimin amonyum sülfat ile çöktürülmesi sonucu 1,733 kat daha saf enzim olduğu ve bu işlem sonucu enzimin %69'nun kurtarılabildiği, diyaliz işlemi ile enzimin 2,500 kat daha saflaştırıldığı ve enzimin %92'sinin kurtarılabildiği, Amicon 50 K filtreden geçirilen enzimin ise 1,037 oranında enzimi saflaştırabildiği ve bu işlem sonucunda enzimin %86'sının kurtarılabildiği gözlenmiştir (Çizelge 4.5).

*Lactobacillus casei* LB65 suşunda ise amonyum sülfat ile çöktürme sonucu enzimin 2,600 kat daha saflaştırılabildiği ve enzimin %100'nün kurtarıldığı, diyaliz işlemi ile 3,556 kat daha saf enzimin elde edildiği ve işlem sonucu enzimin %94'nün kurtarılabildiği, Amicon 50 K filtreden geçirilen enzimin ise 1,292 oranında enzimi saflaştırabildiği ve bu işlem sonucunda enzimin %91'inin kurtarılabildiği belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Diyaliz işlemi ile enzim kaybının daha az olduğu ve enzimin diğer saflaştırma basamaklarına kıyasla daha saf elde edildiği gözlenmiştir. Saflaştırma basamaklarında ki enzim kayıpları nedeninin, enzimin kolayca bozulan bir enzim olabileceği ve kararlı yapısını zamanla kaybedebileceği, hücrenin yeterince parçalanamamış olabileceği ya da parçalama işlemi sırasında sıcaklığın ve sürenin yeterince ayarlanamamış olabileceği nedenlerinden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Sestelo ve ark., [2004] Sephacryl S-200 kromatografisini kullanarak *L. plantarum* USCI suşunun,  $\beta$ -glukozidaz enziminin moleküler ağırlığını 40 K olarak belirlemişlerdir. Acebron ve ark., [2009] HiTrap Q HP kolonu ve Superdex 200 kullanarak *Lactobacillus plantarum* CECT 748T suşunun  $\beta$ -glukozidaz enziminin moleküler ağırlığını 55 K olarak tespit etmişlerdir. Michlmayr ve ark. [2010]

*Lactobacillus brevis* SK3 suşunu kullanarak  $\beta$ -glukozidaz enziminin karakterizasyonunu yapmışlar ve saflaştırılan enzimin molekül ağırlığını 80 K olarak belirlemişlerdir.

Çalışmada *Lactobacillus rhamnosus* BAZ78 ve *Lactobacillus casei* LB65 suşlarından elde edilen ham ekstrakt ve kısmi saflaştırma sonucu elde edilen örneklerle, SDS-PAGE'e uygulanarak suşların molekül ağırlıkları belirlenmiştir. *Lactobacillus casei* LB65 suşunda enzimin molekül ağırlığı 80 K (Resim 4.4), *Lactobacillus rhamnosus* BAZ78 suşunda  $\beta$ -glukozidaz enziminin molekül ağırlığı 68 K (Resim 4.5) olarak tespit edilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarla enzimlerin moleküler ağırlıkları yakın bulunmuştur [Sestelo ve ark., 2004; Acebron ve ark., 2009; Michlmayr ve ark. 2010].

Laktik asit bakterileri ile soyalı sütler fermente edilmekte ve elde edilen ürünlerin izoflavon içerikleri HPLC ile belirlenmektedir [Choi ve ark., 2002, Rekha ve Vijayalakshmi, 2010]. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi bakteriler soya içermeyen besiortamlarında geliştirilmiş ve  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesine sahip olan suşların, izoflavonların hidrolizasyonu belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmada yüksek enzim aktivitesine sahip olan *Lactobacillus rhamnosus* BAZ78, *Lactobacillus rhamnosus* SMP6-5 ve *Lactobacillus casei* LB65 suşlarının, izoflavon glukozitleri (genistin, daidzin) aglikon formuna hidrolize etme yetenekleri HPLC ile belirlenmiştir.

Besi ortamına izoflavon glikozitler ilave edilerek bakterilerin, izoflavon glukozitleri hidrolize edebilmeleri ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmıştır. Bu çalışmada, Choi ve ark., [2002] MRS besiortamında geliştirilen laktik asit bakterileri arasından *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* KCTC 1047 suşunun, izoflavonların glukozit formu olan genistin ve daidzini, aglikon formu olan genistein ve daidzeine hidrolize edebildiği göstermişlerdir. Bakterilerin bu hidrolizasyonu da yüksek  $\beta$ -glukozidaz enzim aktiviteleri sayesinde yapabildikleri bildirilmiştir. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* KCTC 1047 suşunun, ortamda bulunan 50  $\mu$ g/ml

genistin ve daidzinden, genistini 1 µg/ml, daidzini ise 2 µg/ml ye kadar hidrolize ettiği rapor edilmiştir.

Donkor ve Shah [2008], probiyotik özellik gösteren bakterileri soymilk besiortamında fermente ederek, β-gukozidaz enzim aktivitelerini ve yüksek aktivite gösteren suşlarla izoflavonların hidrolizasyonunu belirlemişlerdir. Yaptıkları çalışmada en yüksek β-glukozidaz enzim aktivitesine *Lactobacillus acidophilus* L10, *Lactobacillus casei* L26 ve *Bifidobacterium lactis* B94 suşlarında rastlamışlardır. Suşların enzim aktivite aralığını 0,117-0,204 µmol/mL (U) olarak bildirmişlerdir. β-glukozidaz enzim aktivitesi arttıkça (p<0,05) izoflavon aglikon konsantrasyonunda arttığını (p<0,005) göstermişlerdir.

Araştırmacılar yapmış oldukları çalışmalarla bazı suşların izoflavon glikozitleri hidrolize edebildiklerini bazı suşların ise hidrolize edebilme yeteneklerinin az veya olmadıklarını bildirmişlerdir. Choi ve ark., [2002] laktik asit bakterilerini soymilk besiortamında da geliştirerek izoflavonların hidrolizasyonunu belirlemişler ve soyalı ürünlerin izoflavon, oligosakkarit ve tripsin gibi çeşitli bileşenleri içermesinden dolayı soymilk besiortamında, izoflavonların glikozit formlarının aglikonlara hidrolizinin daha fazla olduğu bildirmişlerdir. Soymilk besiortamında bakterilerin hidrolizasyon değerlerine bakıldığında ortamda bulunan 50 µg/mL genistin ve daidzinden, *Lactobacillus bulgaricus* KCTC 3188 suşunun genistini 15 µg/mL, daidzini 37 µg/mL, *L. casei* KCTC 3109 suşunun genistini 14 µg/mL, daidzini 37 µg/mL, *L. lactis* KCTC 2181 suşunun genistini 10 µg/mL, daidzini 30 µg/mL, *L. delbrueckii* KCTC 1058 suşunun genistini 12 µg/mL, daidzini 30 µg/mL, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* KCTC 1047 suşunun genistinini tamamını daidzini 1 µg/mL kadar hidrolize edebildiği göstermişlerdir. *L. bulgaricus* KCTC 3188, *L. casei* KCTC 3109, *L. delbrueckii* KCTC 1058 ve *L. lactis* KCTC 2181 suşlarının ise MRS besi ortamında genistin ve daidzini hidrolize edemediklerini bildirmişlerdir. Yüksek β-glukozidaz aktivite gösteren ve soymilk besiortamında gelişen bakterilerin, izoflavonların glukozit formunu aglikonlara dönüştürmede daha etkili olduğunu, MRS besi ortamında gelişen bakterilerden ise sadece *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* KCTC 1047 suşunun izoflavonları hidrolize

edebildiğini, diğer suşların hidrolizasyon yeteneğine sahip olmadıklarını rapor etmişlerdir.

Çalışmada, yüksek  $\beta$ -glukozidaz aktivite göstermelerine rağmen *Lactobacillus rhamnosus* BAZ78, *Lactobacillus rhamnosus* SMP6-5 ve *Lactobacillus casei* LB65 suşlarının izoflavonları (genistin ve daidzein) hidrolize etme yeteneğine sahip olmadığı tespit edilmiştir. Suşlar, hidroliz için seçilen genistin ve daidzini hidrolize etme yeteneğine sahip olmayabilir. Bu nedenle daha sonra yapılacak çalışmalarda, diğer izoflavon glukozit formlarının (Glisit, 6-O-asetildaidzin, 6-O-asetilgenistin, 6-O-asetilglisit, 6-O-malonildaidzin, 6-O-malonilgenistin, 6-O-malonilglisit) denenmesi ve diğer yüksek enzim aktivitesine sahip suşların denenmesi hedeflenmektedir.

Sonuç olarak bu çalışma sonucunda, farklı kaynaklardan (insan, gıda, hayvan) izole edilen suşlarda  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesine bakılmış ve yüksek aktivite gösteren suşlarda optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Enzim etkinliğine etki eden sıcaklık, pH, besiortamları ile yapay mide suyu ve yapay bağırsak sıvısında bakterilerin enzim aktivitelerinin belirlenerek enzim aktivitesi, protein miktarı ve spesifik enzim aktivitesi arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Ayrıca bakterilerin, mide ve bağırsak sıvısında enzim aktivitelerini belirlemeye yönelik herhangi bir çalışmanın bulunmaması da çalışmaya özgünlük katmaktadır. Bakterilerin asidik ve bazik ortamlarda canlılıklarını koruyarak,  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesi göstermeleri bu suşların gıda ürünlerine katılarak, alternatif probiyotik suşlar olarak kullanılabilceği düşünülmektedir. Ülkemizde bakterinin enzim aktivitesiyle hidrolizasyon yeteneğine yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Yapılan birçok çalışmada, izoflavonların glukozit formlarının aglikon formlarına hidrolizinin izoflavon içeriğince zengin soyalı ortamlarda gerçekleştirmiş ancak sentetik besiortamlarında bakterilerin izoflavonları hidrolize etme yetenekleri değerlendirilmemiştir. Bu çalışmada, sentetik besiortamlarında suşların izoflavonları hidrolize etme yetenekleri değerlendirilmeye çalışılmış olması çalışmaya ayrı bir özgün değer katmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Acebron, I., Curiel, J.A., Rivas, B., Munoz, R., Mancheno, J.M., ‘Cloning, production, purification and preliminary crystallographic analysis of a glycosidase from the food lactic acid bacterium *Lactobacillus plantarum* CECT 748<sup>T</sup>’, ***Protein Expression and Purification***, 68 177–182 (2009).
- Adlercreutz, H., Honjo, H., Higashi, A., Fotsis, T., Hamalainen, E., Hasegawa, T., Okada, H., ‘Urinary excretion of lignans and isoflavone phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional diet’, ***American Journal of Clinical Nutrition***, 54:1093-1100 (1991).
- Adlercreutz, H., Mazur, W., ‘Phyto-oestrogens And Western Diseases’, ***Annals of Medicine***, 29 (2): 95- 120 (1997).
- Adlercreutz, H., ‘Evolution, nutrition, intestinal microflora, and prevention of cancer: a hypothesis’, ***Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine***, 217: 241–6 (1998).
- Adlercreutz, H., Mazur, W., Bartels, P., ‘Phytoestrogens and prostate disease’, ***Journal of Nutrition***, 130: 658S-659S (2000).
- Akalın, S., Gönç, S., Senderya, S., ‘Probiyotik süt ürünleri ve prebiyotikler’, ***VI. Süt ve Süt Ürünleri Senpozyumu (Süt Mikrobiyolojisi ve katkı maddeler)***, Tebliğler Kitabı Rebel Yayıncılık, 29-38 (2000).
- Akgül, A., ‘Tıbbi Araştırmalarda İstatistiksel Analiz Teknikleri’, (2005).
- Aksoy, V.A., ‘ $\beta$ -glikozidaz enziminin bornova misketi üzümünden izolasyonu, saflaştırılması ve bazı biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi’, ***Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı***, Adana, (2010).
- Alekel, D.L., Germain, A.S., Peterson, C.T., Hanson, K.B., Steward, J.W., Toda, T., ‘Isoflavone rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of premenopausal women’, ***American Journal of Clinical Nutrition***, 72: 844–852 (2000).
- Alp, G., ‘*Bifidobacterium* Cinsi Bakterilerin Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi’, ***Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Ankara, (2008).
- Anderson, J.J.B., Garner, S.C., ‘The effects of phytoestrogens on bone’, ***Nutrition Research***, 17: 1617-1632 (1997).
- Arboleya, S., Madiedo, P.R., Margolles, A., Solís, G., Salminen, S., Gavilán, C., Gueimonde, M., ‘Characterization and *in vitro* properties of potentially probiotic

*Bifidobacterium* strains isolated from breast-milk', *International Journal of Food Microbiology*, 149, 28-36 (2011).

Aslan, M., Şimşek, G., Yıldırım, Ü., 'Effects of short-term treatment with systemic prednisolone on bone healing: an experimental study in rats', *Dental Traumatology*, 21: 222-225 (2005).

Aydın, B., 'Propiyonik Asit bakterilerinin Ürettiği Bazı Metabolitlerle Bifidobakterilerin Gelişimini Düzenleyici (BGD) Etkisi Arasındaki İlişkinin Araştırılması', *Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, (2011).

Barnes, S., Peterson, T.G., Coward, L., 'Rationale for the use of genistein-containing soy matrices in chemoprevention trials for breast and prostate cancer', *Journal of Cellular Biochemistry*, 59(22): 181-187 (1995).

Baring C.C, Squires T.S., Tong T., 'Cancer statistics 1993 C.A.', *Ca-A Cancer Journal for Clinicians*, 43: 7-26 (1993).

Başer, K.H.C., Kırırmer, N., 'Fonksiyonel Gıdalar ve Nutrasotikler', *14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler*, Eskişehir (2002).

Beerens, H., 'Bifidobacteria as indicators of faecal contamination in meat and meat products: detection, determination of origin and comparison, with *Escherichia coli*', *International Journal of Food Microbiology*, 40: 203-207 (1998).

Biavati, B., Mattarelli, P., 'The family Bifidobacteriaceae. In: The Prokaryotes' (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H. and Stackebrandt, E., Eds.). *Springer*, New York 1-70 (2001).

Bilaloğlu, G.V., Harmandar, M., 'Flavonoidler', *Bakanlar Matbaacılık Ltd. Şti.* İstanbul, 336-343 (1999).

Bingham, S.A., Atkinson, C., Liggins, J., 'Phyto-oosterogens: Where Are We Now?', *British Journal of Nutrition*, 79:393-406 (1998).

Birk, R., Ikan, A., Bravado, B., Braun, S., Shoseyov, O., 'Synthesis of iso-propyl- 1-thio-β-D-glucopyranoside (IPTGlc) an inducer of *Aspergillus niger* B1 β-glucosidase production', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 66: 25-29 (1997).

Björkstén, B., Sepp, E., Julge, K., Voor, T., Mikelsaar, M., 'Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108, 516-520 (2001).

Bothast, R.J., Saha, B.C., 'Enzymes in Lignocellulosic Biomass Conversion', *Fuels and Chemicals from Biomass*, 46-56 (1997).

Büyüktuncer, Z., Başaran, A.A., 'Fitoöstrojenler ve Sağlıklı Yaşamdaki Rollerini', *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, Cilt 25, sayı 2, 79- 94 (2005).

Cassidy, A., Hanley, B., Raventos, R., 'Isoflavones, Lignans And Stilbens-Origins, Metabolism And Potential Importance To Human Health', *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 80:1044-1062 (2000).

Cho, K.M., Hong, S.Y., Math, R.K., Lee, J.H. and Kambiranda, D.M., 'Biotransformation of phenolic (isoflavones, flavanols and phenolic acids) during the fermentation of cheonggukjang by *Bacillus pumilus* HY1', *Food Chemistry*, 114, 413-419 (2009).

Choi, Y.B., Kim, K.S., Rhee, J.S., 'Hydrolysis of soybean isoflavone glucosides by lactic acid bacteria', *Biotechnology Letters*, 24: 2113–2116 (2002).

Chun, J., Jeong, W.J., Kim, J.S., Lim, J., Park, C.S., Kwon, D.Y., Choi, I., Kim, J.H., 'Hydrolysis of isoflavone glucosides in soymilk fermented with single or mixed cultures of *Lactobacillus paraplantarum* KM, *Weissella* sp. 33, and *Enterococcus faecium* 355 Isolated from humans', *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(3), 573-578 (2008).

Collins, B.M., McLachlan, J.A., Arnold, S.F. 'The Estrogenic And Antiestrogenic Activities Of Phytochemicals With The Human Estrogen Receptor Expressed In Yeast', *Steroids*, 62:365-372, (1997).

Coulon, S., Chemarin, P., Gueguen, Y., Arnaud, A., Galzy, P., 'Purification and characterization of an intracellular beta-glucosidase from *Lactobacillus casei* ATCC 393'. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 74 (2), 105-114 (1998).

Curry, B., Crow, V., 'Daidzein and Genistein in food', *Analytical Biochemistry*, 264, 1-7 (2003).

Davis, S., Dalais, F., Simpson, E., Murkies, A., 'Phytoestrogens In Health And Disease', *Recent Progress In Hormone Research*, 54:185-211, (1999).

Demirkan, E., 'Alfa-amilaz Üreten Bazı *Bacillus* Suşlarının Gelişme Parametreleri, Enzim Özellik ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu', *Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, (1995).

Dixon, R.A., Ferreira, D., 'Molecules of interest', *Phytochemistry*, 60; ,205 -211 (2002).

Dixon, R.A., 'Phytoestrogens', *Annual Review of Plant Biology*, 55, 225-261 (2004).

Doll, R., Peto, R., 'The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today', *Journal of the National Cancer Study*, 66(6): 1991-308 (1981).

Donkor, O.N., Shah, N.P., 'Production of  $\beta$ -glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus casei* in soymilk', *Journal of Food Science*, 73 (1), M15–M20 (2008).



Erçetin, T., ‘Tetraploid *Trifolium pratense* L. (Çayır Üçgülü) Kalluslarında Bazı İzoflavonların (fitoöstrojen) Analizi’, ***Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Ankara, (2007).

Ersöz, H., ‘Alkoldehidrogenaz (ADH) Enziminin Tavuk Karaciğerinden Saflaştırılması Ve Florosil Üzerine İmmobilizasyonu’, ***Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Adana, (2010).

Esen, A., ‘ $\beta$ -Glucosidase’, ***Handbook of Food Enzymology***. J.R., Whitaker, A.G.J. Voragen and D.W.S., Wong (Eds), Marcel Dekker, New York, p: 791-803 (2003).

Espinoza, Y.R., Navarro, Y.G., ‘Non-dairy probiotic products’, ***Food Microbiology***, 27(1): 1-11 (2010).

Esteve-Zarzoso, B., Manzaneres, P., Ramon, D., Querol, A., ‘The Role of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Industrial Winemaking’, ***International Microbiology***, 1: 143-148 (1998).

Falsen, E., Pauscual, C., Sjoden, B., Ohlen, M., Collins, M.D., ‘Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human source: description of *Lactobacillus iners* sp. nov.’ ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***, 49:217-221 (1999).

FAO/WHO, ‘Health And Nutritional Properties Of Probiotics In Food Including Powder Milk And Live Lactic Acid Bacteria’, ***Food and Agriculture Organization of The United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report***, (2001).

Fenderya, S., ‘Bazı Probiyotik Yoğurtlarda Bifidobakterlerin Canlılığı Üzerine Bir Araştırma’, ***Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, İzmir (2002).

Fitzpatrick, L.A., ‘Selective Estrogen Receptor Modulators And Phytoestrogens: New Therapies For The Postmenopausal Women’, ***Mayo Clinic Proceedings***, 74:601-607 (1999).

Fukutake, M., Takahashi, M., Ishida, K., et al., ‘Quantification Of Genistein And Genistin In Soybeans And Soybean Products’, ***Food And Chemical Toxicology***, 34:457-461 (1996).

Gallagher, J.C., Satpathy, R., Rafferty, K., Haynatzka, V., ‘The effect of soy protein isolate on bone metabolism’, ***Menopause***, 11 (3): 290- 298 (2004).

Gallo, G., ‘Biotechnology of lactic acid bacteria: genetic engineering and enzymology. Purification and characterization of an intracellular family 3  $\beta$ -glucosidase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1, pp. 167-196 (2004).

Gambacciani, M., Ciaponi, M., Cappagli, B., Piaggese, L., Genazzani, A.R., Ganry, M. D., ‘Effects of combined low dose of the isoflavone derivate ipriflavone and

estrogen replacement on bone mineral density and metabolism in postmenopausal women', *Maturitas*, 28: 75–81 (1997).

Ganry, O., 'Phytoestrogens and prostate cancer risk', *Preventive Medicine*, 41: 1-6 (2005).

Gibson, G.R., Fuller, R., 'The Role of Probiotics and Prebiotics in the Functional Food Concept', *Functional Foods: The Consumer, The Products and the Evidence*, M.J., Sadler ve M., Saltmarsh (Ed), Cambridge: *Royal Society of Chemistry*, 3-14 (1998).

Giraffa, G., Chanishvili, N., Widyastuti, Y., 'Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology', *Research in Microbiology*, 161, 480-487 (2010).

Golberg, G., 'Plants: Diet and Health', *British Journal Foundation, Blackwell Publishing*, pp. 138–146 (2001).

Gözükara, M.E., 'Biyokimya', *Nobel Tıp Kitapevleri*, üçüncü baskı (1997).

Guarner, F., Malagelda, J.R., 'Gut flora in health and disease', *Lancet*, 22: 360-6 (2003).

Gueguen, Y., Chemardin, P., Janbon, G., Arnaud, A., Galzy, P., 'Use of  $\beta$ -glucosidase in the development of flavor in wines and fruit juices', in *Carbohydrate Biotechnology Protocols, Methods in Biotechnology*, C. Buck, Ed., 323–331, Humana Press, Totowa, NJ, USA (1999).

Gueimonde, M., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E., 'Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation?', *Neonatology*, 92, 64-66 (2007a).

Günata, Z., Bayonove, C., Cordonnier, R.E., Arnaud, A., Galzy, P., 'Hydrolysis of grape monoterpenyl glucosides by *Candida molischiana* and *Candida wickerhamii*  $\beta$ -D-glucosidases', *Journal Science Agriculture Food Chemistry*, 50: 499-506 (1990).

Halkman, K., 'Tarım Mikrobiyolojisi', *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, Ankara, No: 1214, p:82 (1991).

Head, K.A., 'Ipriflavone: An important bone- building Isoflavon', *Alternative Medicine Review*, 4: 10- 22 (1999).

Hedlund, T. E., Johannes, W. U. and Miller, G. J., 'Soy isoflavonoid equol modulates the growth benign and malignant prostatic epithelial cells in vitro', *Prostate*, 54, 68-78 (2003).

Hendrich, S., 'Bioavailability of isoflavons', *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical and Life Sciences*, 777: 203-210 (2002).

Herman, C., Adlercreutz, H., Goldin, B., Gorbach, S., Hockerstedt, K., Watanabe, S., Hamalainen, E., Markanen, H., Makela, T., Wahala, K., Hase, T. & Fotsis, T., 'Soybean phytoestrogen intake and cancer risk', *Journal of Nutrition*, 125 : 757-770 (1995).

Hertog, M.G.L., 'Flavonoid, intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the 7 countries study', *Archives of Internal Medicine*, 155: 1184-1195 (1995).

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

Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger, U., 'The American Society for Nutr', *Journal of Nutrition*, 137, 838-846 (2007).

İnternet: 'Bifidobacterium sp.'

<http://www.sciencephoto.com> (2011).

İnternet: 'Fitoöstrojenler ve meme kanseri'

<http://www.turkmedikal.com> (2011).

İnternet: 'İzoflavon miktarları'

<http://www.nal.usda.gov> (2002).

İnternet: 'İzoflavonlar'

<http://www.gidaderneği.org> (2005).

İnternet: 'Lactobacillus paracasei'

<http://www.sciencephoto.com> (2011).

İnternet: 'Protein saflaştırma yöntemleri'

<http://www.biyokure.org> (1782).

İnternet: 'Soya ve soya ürünleri'

<http://www.ito.org.tr> (2011).

Izumi, T., Piskula, M.K., Osawa, S., Obata, A., Tobe, K., Saito, M., Kataoka, S., Kubota, Y., Kikuchi, M., 'Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans', *Journal of Nutrition*, 130: 1695-1699 (2000).

Jensen, S.R., Schripsema, J., 'Chemotaxonomy and pharmacology of Gentianaceae', *Gentianaceae Systematics and Natural History*, Struwe, L. & Albert, V. (Eds.), Cambridge University Press. (2002).

Jimenez-Pranteda, M.L., Aguilera, M., McCartney, A.L., Hoyles, L., Jimenez-Valera, M., Nader-Macias, M.E., Ramos-Cormenzana, A., Monteoliva-Sanchez, M.,

'Investigation of the impact of feeding *Lactobacillus plantarum* CRL 1815 encapsulated in microbially derived polymers on the rat faecal microbiota', *Journal of Applied Microbiology*, 113(1): 1365-1394 (2012).

Kan, E.K., 'Periton Diyalizi Hastalarında İzoflavonların Paraoksonaz ve Adiponektine Etkileri' *Uzmanlık Tezi Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi*, Elazığ, (2008).

Kaplotis, S., Hermann, M., Held, I., Seelos, C., Ehringer, H., Gmeiner, B.M.K., 'Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL', *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 17: 2868-2874 (1997).

Kara, F., 'Release and Characterization of Beta-Galactosidase From *Lactobacillus plantarum*', *Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, (2004).

Kara, H.E., Sinan, S., Turan, Y., 'Purification of beta-glucosidase from olive (*Olea europaea* L.) fruit tissue with specifically designed hydrophobic interaction chromatography and characterization of the purified enzyme', *Journal of Chromatography B*, 879, 1507-1512 (2011).

Kaur, I. P., Chopra, K., Saini, A., 'Probiotics:potential pharmaceutical applications', *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15,1-9 (2002).

Kawakami, Y., Tsurugasaki, W., Nakamura, S., Osada, K., 'Comparison of regulative functions between dietary soy isoflavones aglycone and glucoside on lipid metabolism in rats fed cholesterol', *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16: 205-212 (2005).

Kelly, E., Heim, Anthony R. Tagliaferro, Dennis J. Bobilya. 'Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships' *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572-584 (2002).

Kılıç, E., Aslım, B., 'Laktik Asit Bakterilerinin Vajen Florasındaki Önemi ve Probiyotik Olarak Kullanımı', *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 01,02, p:70-82 (2003).

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

Knight, D.C., Eden, J.A., 'A review of the clinical effects of phyto-estrogens', *Obstet Gynecol*, 87:897-904 (1996).

Koolman, J., Roehm, K.H., 'Thieme Color Atlas of Biochemistry, 2nd ed Thieme, of Stuttgart', 209 (2005).

Kouya, T., Misawa, K., Horiuchi, M., Nakayama, E., Deguchi, M., Tanaka, T., Taniguchi, M., 'Production of extracellular bifidogenic growth stimulator by

anaerobic and aerobic cultivations of several propionibacterial strains', *Journal Bioscience an. Bioengineering*, 103:464–471 (2007).

Kulling, S.E., Lehmann, L., Metzler, M., 'Oxidative metabolism and genotoxic potential of major isoflavone phytoestrogens', *Journal of Chromatography*, 777: 211-218 (2002).

Laemmli, U.K., 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, 227: 680-685 (1970).

Leahy, S.C., Higgins, D.G., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D., 'Getting better with bifidobacteria. A review', *Journal of Applied Microbiology*, 98: 1303-1315 (2005).

Lecas, M., Günata, Z.Y., Sapis, J.C., Bayonove, C.L., 'Purification and Partial Characterization of  $\beta$ -glucosidase from Grape' *Phytochemistry*, 30 (2): 451-454 (1991).

Lee, H.P., Gourley, L., Duffy, S.W., Esteve, J., Lee, J. and Day, N.E., 'Dietary effects on breast cancer risk in Singapore', *Lancet*, 337, 1197-1120 (1991).

Liggins J., Bluck L.J.C., Coward A., 'Extraction And Quantification Of Daidzein And Genistein In Food', *Analytical Biochemistry*, 264:1-7, (1998).

Liggins, J., Bluck, J.C., Runswick, S., 'Daidzein and Genistein content of fruits and nuts', *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11, 326-331 (2000).

Limsowtin, G.K.Y., Broome, M.C., Powell, I.B., 'Lactic acid bacteria, taxonomy', *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Vol. 3. Roginski, H., Fuquay, J.W., Fox, F.P. eds. New York: Academic Press, 1470-1478 (2003).

Lu, W., Anderson, K.E., Grandy, J.J., 'Effects of an isoflavone-free soy diet on ovarian hormones in premenopausal women', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86, 3045-3052 (2001).

Lundh, T., 'Metabolism of estrogenic Mackness, M.I., Mackness, B., Durrington, P. isoflavones in domestic animals', *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 208:33-39 (1995).

Mackness, M.I., Mackness, B., Durrington, P.N., Connely, P.W., Hegele, R.A., 'Paraoxonase: Biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins' *Current Opinion in Lipidology*, 7(2): 69-76 (1996).

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 'Biology of Microorganisms, 8th Ed.', *Prentice Hall International, Inc.*, (1997).

Magee, J.P., Rowland, R., 'Phytoestrogens, their mechanism of action; current evidence for a role in breast and prostate cancer', *British Journal of Nutrition*, 91: 513–531 (2004).

Marazza, J.A., Garro, M.S., Giori, G.S., 'Aglycone production by *Lactobacillus rhamnosus* CRL981 during soymilk fermentation', *Food Microbiology*, 26: 333-339 (2009).

Martini, M.C., Dancisak, B.B., Haggans, C. J., 'Effects of soy intake on sex hormone metabolism in premenopausal women', *Nutrition and Cancer*, 34(2), p.133-139 (1999).

Matsuda, S., Norimoto, F., Matsumoto, Y., Ohba, R., Teramoto, Y., Ohta, N., Ueda, S., 'Solubilization of a novel isoflavone glucoside-hydrolyzing  $\beta$ - glucosidase from *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*', *J. Ferment. Bioeng.* 77: 439-441 (1994).

Mendi, H.A., "Bazı muhtemel probiyotik türlerin inulin varlığında antioksidan aktivite ve immünolojik özelliklerinin araştırılması", *Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, (2011).

Michlmayr, H., Schumann, C., Barreira, Braz da Silva N.M., Kulbe, K.D. and del HierroIsolation, A.M., 'Basic characterization of a  $\beta$ -glucosidase from a strain of *Lactobacillus brevis* isolated from a malolactic starter culture', *Journal of Applied Microbiology* 108 550–559 (2010).

Modler, H.W., Mckellar, R.C., Yaguchi, M., 'Bifidobacteria and Bifidogenic Factors', *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* , 23(1): 29-41 (1990).

Morris, D., 'Hormone Replacement Therapy And Coronary Artery Disease', *Current Opinion In Obstetrics And Gynecology*, 8:184-7, (1996).

Naim, M., Gestetner, B., Kirson, I., Birk, Y. & Bondi, A., 'Antioxidative and antihemolytic activities of soybean isoflavones', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24:1174-1177 (1976).

Nelson, D.L. and Cox, M.M., 'Lehninger Principles of Biochemistry', *Freeman*, 5th Edition (2008).

Numanoğlu, Y., Sungur, S., ' $\beta$ -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose-gelatin carrier system', *Process Biochemistry*, 39 (6): 705-711 (2004).

Nussbaum, R.Z., McInnes, R.R., Willard, H.F., Boerkoel, C.F., "Tıbbi Genetik", *Güneş Tıp Kitabevi*, Bölüm 6, Türkiye, p: 311-312 (2005).

Okereke, A., and Montville, T.J., 'Bacteriocin-mediated inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria at refrigeration and abuse temperatures', *Applied of Environmental Microbiology*, 3423-3428 (1991).

Otieno, D.O., Ashton, J.F., Shah, N.P., 'Evaluation of enzymic potential for biotransformation of isoflavones phytoestrogen in soymilk by *Bifidobacterium*

*animalis*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*', **Food Research International**, 39, 394–407 (2006).

Önal, D., Beyatlı, Y., Aslım, B., "Probiyotik Bakterilerin Epitel Yüzeyleme Yapışması", **Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi**, 03:1-10 (2005).

Ötleş, S., 'Methods of Analysis of Food Components and Additives', **CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton**, 437 (2005).

Özben, B., Ülgen, K.Ö., 'The stability of enzymes after sonication', **Process Biochemistry**, 35 (9): 1037-1043 (2000).

Öztan, D., 'Tirozinaz Enziminin Ekstraksiyonu, Saflaştırılması Ve Fenollerin Gideriminde Kullanımı', **Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, (2007).

Pfeiler, E.A., Klaenhammer, T.R., 'The genomics of lactic acid bacteria', **Trends In Microbiology**, 15, 546-553 (2007).

Rabiau, N., Kossai, M., Braud, M., Chalabi, N., Satih, S., Bignon, Y.J., Bernard-Gallon, D.J., 'Genistein and daidzein act on a panel of genes implicated in cell cycle and angiogenesis by Polymerase Chain Reaction arrays in human prostate cancer cell lines', **Cancer Epidemiol**, 34: 200-206 (2010).

Rekha, C.R., and Vijayalakshmi, G., 'Bioconversion of isoflavone glycosides to aglycones, mineral bioavailability and vitamin B complex in fermented soymilk by probiotic bacteria and yeast', **Journal of Applied Microbiology**, 1198-1208 (2010).

Rada, V., Petr, J., 'Enumeration of bifidobacteria in animal intestinal samples', **Vet. Med.-Czech.**, 47: 1-4 (2002).

Rolfe, R.D., 'The role of probiotic cultures in control of gastrointestinal health', **Journal of Nutrition**, 130, 3965-4025 (2000).

Salminen, S., 'Probiotics: Scientific Support For Use', **Food Technology**, 53; p: 66 (1999).

Salminen, E.I., Ouwehand, A.C., "Probiotics", **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, 18: 299-313 (2004).

Sam, K., Chang, C., 'Isoflavones From Soybeans and Soy Foods', **Functional Foods Biochemical and Processing Aspects (Ed. Gazza M.) de CRC Press**, New York (2002).

Sarı, O., 'Bezelye (*Pisum sativum*)'den Lipoksijenaz Enziminin Saflaştırılması', **Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Adana, (2006).

Saxami, G., Ypsilantis, P., Sidira, M., Simopoulos, C., Kourkoutas, Y., Galanis, A., 'Distinct adhesion of probiotic strain *Lactobacillus casei* ATCC 393 to rat intestinal mucosa', *Anaerobe*, 4 (2012).

Sestelo, A.B.F., Poza, M., Viilla, T.G., ' $\beta$ -Glucosidase activity in a *Lactobacillus plantarum* wine strain', *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 20, 633-637 (2004).

Setchell K.D., Adlercreutz, C.H., 'Mammalian lignans and phytoestrogens: Recent studies on their formation, metabolism and biological role in health and disease, Rowland IR (ed). Role of the Gut Flora on Toxicity and Cancer', San Diego: *Academic Press*, 315-345 (1998).

Setchell, K. D. R., Cassidy, A., 'Dietary isoflavones-biological effect and relevance to human health', *Journal Nutrition*, 129:758-767 (1999).

Setchell, K. D. R., 'Absorption and metabolism of soy isoflavones from food to dietary supplements and adults to infants', *Journal of Nutrition*, 130, 654-655 (2000).

Solis, G., Reyes-Gavilan, C.G. de los, Fernandez, N., Margolles, A., Gueimonde, M., 'Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut', *Anaerobe*, 307-310 (2010).

Song, T.T., Hendrich, S., Murphy, P.A., 'Estrogenic Activity Of Glycitein, A Soy Isoflavone', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47:1607-1610, (1999).

Spratt, J.S., Donegan, W.L., Sigdestad, C.P., 'Epidemiology and etiology', *In Donegan WL and Spratt JS(ed): Cancer of the breast*, Philadelphia, Saunders, p. 116-141 (1995).

Stiles, M.E., Holzaphel, W.H., 'Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy', *International Journal of Food Microbiology*, 36, 1-29 (1997).

Takaç, S., 'Lipaz Üretimi İçin İzole Edilmiş Mikroorganizmaların Genetik Yöntem İle Tanımlanması ve Üretilen Enzimlerin Saflaştırılması', *Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri*, Ankara (2008).

Tangüler, H., Erten, H., '9.Gıda Kongresi', *Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü*, Bolu (2006).

Tekinşen, O.C., Atasever, M., 'Süt Ürünleri Üretiminde Starter Kültür', *Selçuk Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Yayını*, Konya, p:150 (1994).

Telefoncu, A., 'Protein Saflaştırma Ve Karakterizasyonu', *Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu*, İzmir, p: 272 (1996).

Telefoncu, A., 'İmmobilize enzimler', *Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu*, Kuşadası (1997).



Temizkan, G., Yılmaz, S., Öztürk, M., Arı, Ş., Ertan, H., Sarıkaya, A.T., Arda, N., ‘Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler’, **Biyogem**, Nobel Tıp Kitapevleri (2008).

Tomme, P., Warren, R.A.J., Gilkes, N.R., ‘Cellulose Hydrolysis by Bacteria and Fungi’, **Microbial Physiology**, 37 (1995).

Tsangalis, D., Ashton, J.F., McGill, A.E.J., Shah, N.P., ‘Enzymic Transformation of Isoflavone Phytoestrogens in Soymilk by  $\beta$ -Glucosidase Producing Bifidobacteria’, **Food Microbiology and Safety**, 67, 8 (2002).

Tüzün, C., ‘Biyokimya’ **Palme Yayınevi**, Ankara (1991).

Umland, E.M., Pharm, D., Cauffield, J.S., ‘Phytoestrogens As Therapeutic Alternatives To Traditional Hormone Replacement In Postmenopausal Women’, **Pharmacotherapy**, 20 (8): 981-990 (2000).

Uyanık, A., ‘Beta- Galaktosidaz Enziminin Mikrobiyal Hücrelerden İzolasyonu ve Karakterizasyonu’ **Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, (2008).

Uzun, Y.S., ‘Probiyotik Karakterli *Lactobacillus acidophilus* LA-5 ve *Bifidobacterium bifidum* BB-12’nin Kaşar Peynirinde Haşlama ve Kuru Tuzlama İşlemlerine Karşı Dirençlerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Çalışma’, **Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**, Şanlıurfa, (2006).

Ünlüsayın, M., Erdilal, R., Çağatay, T., ‘Balık Proteinlerinin Saflaştırılmasında Kullanılan Son Yöntemler’, **Journal of Fisheries Sciences**, 3(4): 298-309 (2009).

Üstündağ, B., Bahçecioglu, İ.H., Şahin, K., Gülcü, F., Düzgün, S., Özercan, İ.H., Gürsu, M.F., ‘Soy izoflavonların karbon tetraklorüre (CCl<sub>4</sub>) bağlı karaciğer hasarı ve plazma paraoksonaz ile arilesteraz aktivite düzeylerine olan etkileri’, **Firat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi**, 19(4), 263-271 (2005).

Yada, R.Y., ‘Proteins in Food Processing’, **Woodhead Publishing**, Cambridge, 686 (2004).

Yan, T., Lin, Y., Lin, C., ‘Purification and characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase II with high hydrolysis and transglucosylation activities from *Aspergillus niger*’, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46, 431-437 (1998).

Yanagihara, K., Ito, A., Toge, T., Numoto, M., ‘Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract’, **Cancer Research**, 53, 5815-5821 (1993).

Yılsay, T.Ö., Kurdal, E., ‘Probiyotik süt ürünlerinin beslenme ve sağlık üzerinde etkisi’, **VI. Süt ve Süt Ürünleri Senpozyumu (Süt Mikrobiyolojisi ve katkı maddeler)** 279-286 (2000).

Yörük, G.N., Güner, A., ‘Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması ve Weissella Türlerinin Gıda Mikrobiyolojisinde Önemi’, *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 6(2): 163-176 (2011).

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

Zotta, T., Ricciardi, A., Parente, E., ‘Enzymatic activities of lactic acid bacteria isolated from Cornetto di Matera sourdoughs’, *International Journal of Food Microbiology*, 115, 165–172 (2007).

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

**Soyadı, adı** : ÇINAR Berat

**Uyruğu** : TC

**Doğum tarihi ve yeri** : 31.01.1985 Gerede

**Medeni hali** : Bekar

**Telefon** : 5321647375

**e-mail** : cinarbrt@gmail.com

**Öğrenim Durumu** :

**Lisans** : Niğde Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Anabilim Dalı (2008).

**Yüksek Lisans** : Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,  
Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilimdalı  
(2009-2012).

### Yabancı Dil

İngilizce

### Yayınlar

1. Ayhan Gurbuz, Yasin Dursun Sari, Zehra Nur Yuksekdağ and Berat Cinar (2011)  
Cementation in a matrix of loose sandy soil using biological treatment method.  
African Journal of Biotechnology Vol. 10(38), pp. 7432-7440.