

***Lactobacillus, Propionibacterium* ve *Bifidobacterium* CİNSLERİNE AİT
FARKLI TÜRLERİN KONJUGE LİNOLEİK ASİT ÜRETİMLERİNİN
PROBİYOTİK AÇIDAN ÖNEMİ**

Sema YİYİT DOĞAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EKİM 2011

ANKARA

Sema YIYIT DOĞAN tarafından hazırlanan *Lactobacillus*, *Propionibacterium* ve *Bifidobacterium* CİNSLERİNE AİT FARKLI TÜRLERİN KONJUGE LİNOLEİK ASİT ÜRETİMLERİNİN PROBİYOTİK AÇIDAN ÖNEMİ adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Belma ASLIM

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

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

Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ

Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Belma ASLIM

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Tarih: 28/10/2011

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

Prof. Dr. Bilal TOKLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

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

Sema YİYİT DOĞAN

***Lactobacillus*, *Propionibacterium* ve *Bifidobacterium* CİNSLERİNE AİT
FARKLI TÜRLERİN KONJUGE LİNOLEİK ASİT ÜRETİMLERİNİN
PROBİYOTİK AÇIDAN ÖNEMİ
(Yüksek Lisans Tezi)**

Sema YİYİT DOĞAN

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Ekim 2011**

ÖZET

Bu çalışmada, Türkiye'nin farklı bölgelerinden temin edilmiş delikli yapıya sahip, el yapımı 78 peynirden 32 adet propiyonibakteri izole edilmiştir. İzolatların klasik ve moleküler tanımlama sonuçları peynirdeki en baskın propiyonibakteri türünün *Propionibacterium freudenreichii* (% 88) olduğunu bununla birlikte *P. acidipropionici*, *P. jensenii* ve *P. thoenii* türlerinin de bulunduğunu göstermiştir. İzole edilen propiyonibakterilerin ve Gazi Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan seçilmiş laktobasil ve bifidobakterilerin linoleis asit (LA) ve ayçiçeği yağından konjuge linoleik asit (KLA) sentezleme yetenekleri taranmıştır. Tüm suşların KLA sentezleyebildiği, linoleik asitten (LA) ayçiçek yağına göre daha yüksek oranda KLA sentezlendiği belirlenmiştir. En yüksek KLA sentezi LA'de % 30, ayçiçeğinde % 14 ile *B. breve* A28 suşunda görülmüştür. Propiyonibakterilerde *P. freudenreichii* spp. *shermanii* S28 (LA'de % 28, ayçiçeğinde % 12) ve *P. thoenii* S72 suşları öne çıkmıştır. KLA sentezi için en ideal sıcaklık, pH, inkübasyon süresi ve LA konsantrasyonları belirlenerek çalışmalar bu koşullarda yapılmıştır. Propiyonibakterilerde; pH 6,8, 30°C, 100 µg/ml LA konsantrasyonda 72 saat inkübasyon, bifidobakterilerde; pH 6,8, 37°C, 100 µg/ml LA konsantrasyonda 48 saat inkübasyon koşulları en ideal olarak belirlenmiştir. Bu çalışma kapsamında, yüksek yetenekteki suşların optimal

koşullarda KLA sentezlemesi ve bu KLA'nın kolesterol düşürücü, antioksidan, insan bağırsak epiteli benzeri hücre hatlarına tutunma ve antikanserojen etkisi araştırılmış, gıda ve sağlık alanında kullanılabilecek yeni probiyotik suşların bulunması amaçlanmıştır. En yüksek kolesterol giderimi KLA sentezi yüksek olan *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* S28 suşunda % 33, KLA sentezi olduğunda ise % 47 bulunmuştur. Bu artış oranı yaklaşık % 14 iken düşük KLA sentezleyen suşlarda % 3 - 6 olduğu görülmüştür. Suşların antioksidan etkisi olduğu bulunmuştur. Antioksidan etkinin KLA sentezi ile değişik oranlarda arttığı en yüksek artışın demir şelatlama aktivitesinde *P. thoenii* S72 suşunda (% 26'dan % 45'e) olduğu belirlenmiştir. Caco-2 ve CCL-221 hücre hatlarında suşların tutunabilme yeteneğinde olduğu tespit edilmiştir. En yüksek tutunma Caco-2 hücre hattında % 58, KLA sentezi olduğunda % 65 ile *B. breve* A28 suşunda bulunmuştur. Tutunma yeteneği ile bağlantılı olarak suşlar iki hücre hattı üzerinde antikanserojenik etki gösterirken en yüksek antikanserojenik etki Caco-2 hücre hattında görülmüştür. KLA sentezi, suşların kanser hücre hatları üzerindeki öldürme etkisini yaklaşık % 8 - 25 arttırırken, sağlıklı fibroblast hücre hattında ölüme sebep olmadığı hatta suşların % 9 - 14 olan öldürme etkisini % 3 - 4 oranına kadar azalttığı bulunmuştur. Çalışma sonuçları S28, S72 ve A28 suşlarının KLA sentezi ve buna bağlı olarak antioksidan, antikanserojen, kolesterol giderimi ve adezyon çalışmalarında yüksek yetenekte olduklarını göstermiştir.

Bilim Kodu : 203.1.023
Anahtar Kelimeler : Konjuge linoleik asit (KLA), Probiyotik, Antioksidan, Antikanserojen, Kolesterol
Sayfa Adedi : 118
Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Belma ASLIM

**PROBIOTIC IMPORTANCE OF CONJUGATED LINOLEIC ACID
PRODUCTION FROM DIFFERENT STRAINS OF *Lactobacillus*,
Propionibacterium and *Bifidobacterium* GENUS
(M.Sc. Thesis)**

Sema YIYIT DOGAN

**GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

October 2011

ABSTRACT

In this study, 32 propionibacteria were isolated from 78 hand-made cheeses obtained from different regions of Turkey having a porous structure. Classical and molecular identification results of the isolates demonstrate that the most dominant propionibacteria species in the cheese was *Propionibacterium freudenreichii* (88%); in addition *P. acidipropionici*, *P. jensenii* and *P. thoenii* species were also present. Conjugated linoleic acid (CLA) synthesis capabilities of the isolated propionibacteria and lactobacilli and bifidobacteria selected from the culture collection of Gazi University Biotechnology Laboratory were scanned. All strains were determined to synthesis CLA and synthesized more CLA from linoleic acid (LA) than sunflower seed oil. The highest CLA synthesis was observed in the *B. breve* A28 strain in LA 30% and sunflower oil 14%. Among propionibacteria, the *P. freudenreichii* spp. *shermanii* S28 (28% in LA, 12% in sunflower oil) and *P. thoenii* S72 strains stand out. The ideal temperature, pH, LA concentrations and incubation period for CLA synthesis were determined and the studies were conducted under these conditions. A total of 72 hours incubation at pH 6.8, 30°C, 100 µg/ml LA concentration was determined to be ideal in propionibacteria, and 48 hours incubation at pH 6.8, 37°C, 100 µg/ml LA concentration was determined to be ideal in bifidobacteria.

Aim of this study, CLA synthesis of the highly capable strains under optimal conditions and the cholesterol lowering, anti-oxidant, adherence to human intestine epithelium cell lines and anti-carcinogenic activity of this CLA were examined, and discovering new probiotic strains that can be used in the fields of food and health was targeted. The highest cholesterol relief was 33% in *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* S28 strain having high CLA synthesis, and this value was found to be 47% when CLA synthesis is present. While this increase in ratio was approximately 14%, it was observed to be 3-6% in strains that synthesize CLA to a lower extent. The strains were found to possess antioxidant effect. It was determined that anti-oxidant effect increased in various proportions with CLA synthesis and the highest increase in iron chelating activity was found to be in the *P. thoenii* S72 strain (from 26% to 45%). The strains were determined to have the ability to adhere to Caco-2 and CCL-221 cell lines. The highest adherence in Caco-2 cell line of 58% was found to be in *B. breve* A28 and was 65% when CLA synthesis was present. While the strains demonstrated anti-carcinogenic effect on two cell lines in relation to adherence capability, the highest anti-carcinogenic effect was seen in Caco-2 cell line. While CLA synthesis increased the lethal effect of the strains on the cancer cell lines, approximately 8-25%, it was found not to be lethal in healthy fibroblast cell line and it even decreased the lethal effect of the strains to 3-4% from 9-14%. The results of the study show that S28, S72 and A28 strains were highly capable in CLA synthesis and associated anti-oxidant, anti-carcinogenic, cholesterol relief, and adhesion studies.

Science Code : 203.1.023

Key words : Conjugated linoleic acid (CLA), Probiotic, Antioxidant, Anticancerogen, Cholesterol,

Page Number : 118

Adviser : Prof. Dr. Belma ASLIM

TEŐEKKÜR

Çalıőmalarım boyunca değerli katkılarıyla ve bilgileriyle beni yönlendiren danıőmanım Sayın Prof. Dr. Belma ASLIM' a, her zaman yardım ve desteklerini gördüğüm Araő. Gör. Betül AYDIN, tüm Biyoteknoloji Laboratuarı ve Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi çalıőanlarına, maddi manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen babam Arif YIYIT, annem Őükran YIYIT, kardeőlerim Sümeyye ve Ömer YIYIT ve eőim Arslan DOĞAN' a teőekkür ederim.

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından 05/2010-66 kodlu projeyle desteklenmiőtir.

İÇİNDEKİLER**Sayfa**

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. Konjuge Linoleik Asit (KLA)	5
2.1.1. Konjuge Linoleik Asidin (KLA) yapısı	5
2.1.2. Konjuge Linoleik Asit (KLA) kaynakları	6
2.1.3. Konjuge Linoleik Asidin (KLA) biyosentezi	8
2.1.4. Konjuge Linoleik Asidin (KLA) sağlık açısından önemi	9
2.2. Probiyotikler	13
2.3. Probiyotik Kültürlerle Konjuge Linoleik Asit (KLA) Sentezlenmesi	21
2.4. KLA Sentezleyebilen Probiyotik Kültürlerin Kolesterol Düşürücü Etkisi	22
2.5. KLA Sentezleyebilen Probiyotik Kültürlerin Antioksidan Aktivitesi	24
2.6. KLA Sentezleyebilen Probiyotik Kültürlerin Adezyon Yeteneği	25
2.7. KLA Sentezleyebilen Probiyotik Kültürlerin Antikanserojenik Etkisi	26
2.8. Konjuge Linoleik Asit (KLA) Sentezleyebilen Probiyotik Bakterilerin Gıdalarda Kullanılması	27
3. MATERYAL ve METOT	29

Sayfa

3.1. Materyal.....	29
3.1.1. Materyal örnekleri	29
3.1.2. Araştırmada kullanılan bakteriler	29
3.1.3. Bakterilerin geliştirilmesi için kullanılan besiyerleri	29
3.1.4. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları	31
3.1.5. Araştırmada kullanılan hücre hatları	31
3.1.6. Hücrelerin geliştirilmesi için kullanılan besi ortamları ve gelişme şartları.....	32
3.2. Metot	32
3.2.1. Propiyonik asit bakterilerinin izolasyonu	32
3.2.2. Bakterilerin muhafazası.....	32
3.2.3. Peynirlerden izole edilen propiyonik asit bakterilerinin tanımlanması	33
3.2.4. Bakterilerinin konjuge linoleik asit (KLA) sentezleme yeteneğinin belirlenmesi	35
3.2.5. Konjuge linoleik asit (KLA) sentezinin optimize edilmesi	36
3.2.6. Bakterilerin kolesterol giderim yeteneğinin belirlenmesi.....	36
3.2.7. Bakterilerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi.....	38
3.2.8. Bakterilerin adezyon yeteneğinin belirlenmesi	39
3.2.9. Bakterilerin antikanserojenik etkisinin belirlenmesi	40
3.3. İstatistiksel Analizler	40
4. DENEYSEL BULGULAR	42
4.1. Propiyonik Asit Bakterilerinin İzolasyonu.....	42
4.2. Peynirlerden İzole Edilen Propiyonik Asit Bakterilerinin Tanımlanması.....	47

Sayfa

4.2.1. Klasik tanımlanmaların değerlendirilmesi.....	47
4.2.2. İleri biyokimyasal tanımlanmaların değerlendirilmesi.....	50
4.2.3. Moleküler tanımlama sonuçlarının değerlendirilmesi.....	52
4.3. KLA Sentezleme Yeteneklerinin Belirlenmesi.....	58
4.4. Konjuge Linoleik Asit Sentezinin Optimize Edilmesi.....	62
4.4.1. <i>Propionibacterium</i> spp. kültürlerinin gelişim eğrilerinin belirlenmesi.....	62
4.4.2. Optimizasyon.....	64
4.5. Kolesterol Gideriminin Araştırılması.....	72
4.6. Antioksidan Etkinin Araştırılması.....	73
4.6.1. Serbest radikal giderme etkisi.....	74
4.6.2. Metal iyonu şelatlama aktivitesi.....	75
4.6.3. Lipid peroksidasyonunun önlenmesi.....	77
4.7. Kültürlerin Adezyon Yeteneğinin Belirlenmesi.....	79
4.8. Antikanserojenik Etki.....	83
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	87
KAYNAKLAR.....	99
EKLER.....	109
EK-1. API kitlerinin metodolojisi.....	110
EK-2. API kitlerinin değerlendirilmesi.....	113
EK-3. <i>Propionibacterium freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> S28 suşunun gen dizilimi.....	116
EK-4. <i>Propionibacterium freudenreichii thoenii</i> S72 suşunun gen dizilimi.....	117
ÖZGEÇMİŞ.....	118

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Gıdalarda bulunan KLA miktarı (mg/g) [Chin ve ark.,1992; Kurban ve ark., 2006].....	7
Çizelge 2.2. KLA' nın bildirilmiş sağlığa faydalı/hastalıklardan koruyucu etkileri [Wahle ve ark., 2004].	10
Çizelge 2.3. <i>Propionibacterium</i> spp. kültürleri.....	20
Çizelge 3.1. <i>Propionibacterium</i> spp.'ler için kullanılan YEL besiyeri.....	30
Çizelge 3.2. <i>Lactobacillus</i> spp. ve <i>Bifidobacterium</i> spp.'ler için kullanılan MRS ve MRSc besiyeri	30
Çizelge 3.3. Primer sekansları, optimal annealing sıcaklıkları ve hedeflenen bölgeler	34
Çizelge 4.1. <i>Propionibacterium</i> spp. izolasyonu yapılan peynirler, izole edilen suşların kodları ve koloni sayımları (log ₁₀ cfu/g).....	46
Çizelge 4.2. <i>Propionibacterium</i> DSMZ standart kültürleri	50
Çizelge 4.3. Klasik ve moleküler tanımlama sonuçları ve % homolojileri.....	55
Çizelge 4.4. <i>Propionibacterium</i> spp.'lerin linoleik asit ve ayçiçek yağından % olarak konjuge linoleik asit sentezleme miktarları	59
Çizelge 4.5. Seçilen <i>Lactobacillus</i> ve <i>Bifidobacterium</i> kültürlerinin % KLA sentezleme kapasiteleri ve izolasyon kaynakları	62

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Linoleik asit ve konjuge c-9,t-11 ve t-10,c-12 izomerlerinin yapısı [Wahle ve ark.,2004].	6
Şekil 2.2. Konjuge Linoleik Asit (KLA) Sentezi [Çelebi ve ark., 2008].	9
Şekil 4.1. Peynirden izole edilen <i>Propionibacterium</i> spp. türlerinin % dağılımı	54
Şekil 4.3. KLA standart eğrisi.	58
Şekil 4.4. Propiyonik asit bakterilerinin gelişim eğrisi, canlılık (\log_{10} cfu/ml) ve besiyeri yoğunluğu (OD)	63
Şekil 4.5. Propiyonik asit bakterilerinin gelişim süresince pH ve % asitliği	64
Şekil 4.6. KLA sentezinde ve bakteri gelişiminde inkübasyon süresinin etkisi	65
Şekil 4.7. KLA sentezi ve bakteri gelişiminde inkübasyon süresinin etkisi.	66
Şekil 4.8. KLA sentezinde ve bakteri gelişiminde sıcaklığın etkisi.	67
Şekil 4.9. KLA sentezi ve bakteri gelişiminde sıcaklığın etkisi.	67
Şekil 4.10. KLA sentezinde ve bakteri gelişmesinde pH'nın etkisi.	68
Şekil 4.11. KLA sentezi ve bakteri gelişiminde pH'nın etkisi.	69
Şekil 4.12. KLA sentezi ve bakteri gelişiminde LA miktarının etkisi.	70
Şekil 4.13. <i>B. breve</i> A28 suşunun KLA sentezi ve bakteri gelişiminde LA miktarının etkisi.	70
Şekil 4.14. KLA sentezinde ve bakteri gelişiminde inülin prebiyotiğinin etkisi.	71
Şekil 4.15. Kültürlerin kolesterol giderim yeteneği ve KLA sentezinin kolesterol giderimi üzerindeki etkisi.	73
Şekil 4.16. Kültürlerin DPPH giderim yeteneği ve KLA sentezinin DPPH giderimi üzerindeki etkisi.	75
Şekil 4.17. Kültürlerin Fe^{+2} iyonu şelatlama yeteneği ve KLA sentezinin şelatlama üzerindeki etkisi	77

Şekil	Sayfa
Şekil 4.18. Kültürlerin lipid peroksidasyonunu inhibe etme yeteneği ve KLA sentezinin inhibisyon üzerindeki etkisi	78
Şekil 4.19. Caco-2 hücre hattına kültürlerin tutunma kapasitesi (%) ■ KLA sentezi olmadığında ■ KLA sentezi olduğunda	80
Şekil 4.20. CCL-221 hücre hattına kültürlerin tutunma kapasitesi (%) ■ KLA sentezi olmadığında ■ KLA sentezi olduğunda	80
Şekil 4.21. Yüksek KLA sentezleme yeteneğine sahip bakterilerin Caco-2 hücre hattı üzerindeki antikanserojenik etkisi	84
Şekil 4.22. Yüksek KLA sentezleme yeteneğine sahip bakterilerin CCL-221 hücre hattı üzerindeki antikanserojenik etkisi	85
Şekil 4.23. Yüksek KLA sentezleme yeteneğine sahip bakterilerin fibroblast hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi.....	86

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. (a) <i>Lactobacillus</i> spp. bakterisinin a) ışık mikroskobu b) elektron mikroskobu görüntüleri.....	15
Resim 2.2. <i>Bifidobacterium</i> spp. bakterisinin a) ışık mikroskobu b) elektron mikroskobu görüntüsü	17
Resim 2.3. <i>P. freudenreichii</i> bakterisinin elektron mikroskobu görüntüsü	19
Resim 4.6. Klasik tanımlamada kullanılan bazı biyokimyasal testler.	49
Resim 4.7. API CH 50 sonuçları.....	51
Resim 4.8. API 20A sonuçları.	51
Resim 4.9. API 20E sonuçları.....	52
Resim4.10. <i>Propionibacterium</i> spp.’ ler için tasarlanmış 3 primerle çoğaltılan PCR ürünleri ve molekül ağırlıkları	53
Resim 4.11. <i>B. breve</i> A28 suşu için Fruktoz-6-fosfat fosfoketolaz (F6PPK) enzim testinin sonuçları.....	61
Resim 4.12. DPPH radikali giderim etkisi.....	75
Resim 4.13. Fe ⁺² şelatlama aktivitesi.....	77
Resim 4.14. Lipid peroksidasyonunun inhibisyonu.....	79
Resim 4.15. Suşların Caco-2 hücre hattında adezyon yeteneği	81
Resim 4.16. Suşların CCL-221 hücre hattında adezyon yeteneği.....	82
Resim 4.17. Suşların CCL-221 hücre hattında adezyon yeteneği,.....	83

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklama
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
µL	Mikrolitre
Kısaltmalar	Açıklama
API	Analitik Profil İndeks
Cfu	Colony forming unit (Koloni oluşturan birim)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
FBS	Fetal Bovine Serum
KLA	Konjuge Linoleik Asit
LA	Linoleik Asit
MRS	Man, Rogosa and Sharpe
OD	Optical Density (Optik Yoğunluk)
rpm	Devir Sayısı
spp.	Species (Türleri)
ssp.	ubspecies (Alttür)
TE	Trypsin Edta
YEL	Yeast Extract Sodium Lactate

1. GİRİŞ

Son yıllarda ortaya çıkan sağlık sorunlarının başında gelen kalp-damar rahatsızlıkları, kanser, obezite, diyabet gibi hastalıkların oluşumunda trans yağların ve doymuş yağ asitlerinin payı büyüktür. Bu hastalıklar yağların fazla tüketimi sonucu oluşa da sağlıklı ve dengeli beslenme için yağlar gereklidir. Bununla beraber çoklu doymamış yağ asitlerinin (ω -3, linoleik asit, konjuge linoleik asit) beslenme ile ilişkili birçok hastalığın önlenmesinde elzem rolü vardır [Bayaz ve Mehenktaş., 2005]. Linoleik asit [LA (18:2n-6)] çift bağ içeren, 18 karbonlu esansiyel bir yağ asidi olup insan vücudunda sentezlenemediği için diyetle birlikte alınması gerekir. Konjuge linoleik asit (KLA), linoleik asidin pozisyonel ve geometrik izomerleridir [Bhattacharya ve ark.,2006]. Yapılan çalışmalar KLA'nın antikanserojenik, antiaterojenik, antioksidan etkilerinin olduğunu, vücut yağ birikimini önleyip kas gelişimini arttırdığını, immün sistemi düzenlediğini göstermiştir. Bu faydalarının keşfedilmesiyle KLA' ya olan ilgi artmış, KLA sentezleme ve KLA' nın hastalıklar üzerindeki etkileri ile pek çok çalışma yapılmaya başlanmıştır [Wahle ve ark., 2004; Wilson ve ark., 2000]. Ülkemizde bu konuyla ilgili yapılmış kapsamlı çalışmalara rastlanılamamıştır.

KLA besinlerle alınabildiği için besinlerdeki miktarlarının artırılmasına yönelik araştırmalara yoğunlaşmıştır. KLA tamamen organik sentezle üretilebildiği gibi; fermentasyon, enzimatik izomerizasyon ve genetik mühendisliği/biyomühendislik ile de üretilebilir. Organik sentez ya hayvan yemlerine LA ilave edilerek ya da rumenlerine doğrudan LA veya KLA verilerek onlardan elde edilecek gıdalardaki KLA miktarını arttırmayı hedefler. Bu yöntem maliyetli ve uzun bir süreç gerektirir ayrıca oluşan KLA karışıktır. Genetik mühendisliğiyle istenilen KLA izomeri ucuza elde edilebilir fakat genetik özelliklerin ve olası zararlarının keşfi için uzun zaman ve çalışma gereklidir. Yüksek seçiciliğe sahip olmaları nedeniyle KLA sentezinde mikroorganizmalar ve saf enzimlerin kullanılması büyük avantajlar sağlamaktadır. LA' nın KLA' ya dönüşmesinde linoleik asit izomeraz enzimi rol almaktadır [Bayaz ve Mehenktaş, 2005; Lin ve ark., 2003]. Probiyotik olarak bilinen bakterilerden

bazıları bu enzimi içermekte ve KLA sentezleyebilmektedir. KLA sentezleyebilen bu probiyotik bakteriler hem kendi sahip oldukları yararlı etkileri hem de sentezledikleri KLA ile konakçının sağlığı üzerinde olumlu etkiler gösterecektir. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* spp. türleri probiyotik olarak en sık kullanılan bakterilerdir [Yılsay ve ark., 2000; Akalın ve ark., 2003]. Bunlar gıda endüstrisinde starter kültür olarak yoğun olarak kullanılmaktadır. Bu bakterilerin KLA sentezleyebilen suşlarının seçilip gıda endüstrisinde kullanılmaları ile gıdalardaki KLA miktarı arttırılabilir ve tüketilmeleriyle sağlığa fayda gösterebilirler. Probiyotik çalışmaları yoğunluklu olarak *Lactobacillus* spp. ve *Bifidobacterium* spp. kültürleriyle yapılmaktadır. Oysa yapılan çalışmalar *Propionibacterium* spp. kültürlerinin bu iki tür kadar etkili olduğunu ve birçok alanda bu kültürler gibi kullanılabilceğini göstermektedir.

Yüksek miktarlarda KLA içermesi ile peynir süt ürünleri içerisinde önemli bir yere sahiptir. Bu açıdan peynirin olgunlaşmasında, kendine özgü aromasını almasında rol oynayan propiyonibakteriler süt ve süt ürünlerinde KLA sentezlemede kullanılabilir uygun bakterilerdir. Tek başlarına kullanılabildikleri gibi bifidobakteri ve laktobasil kültürleriyle birlikte kullanılarak probiyotik etkilerinin yanı sıra bu kültürlerinin gelişmelerini düzenlemektedirler [Wang ve ark., 2007].

Gıdalardaki KLA miktarının arttırılması dışında sentetik besiyerlerinde saf LA kullanılarak bakterilere KLA sentezlettirilebilir [Sieber ve ark., 2004; Barrett ve ark., 2007]. KLA sentezi yapılırken pH, sıcaklık, inkübasyon süresi, LA miktarı gibi koşullardan en iyileri belirlenerek sentezlenecek KLA miktarı en yüksek seviyeye çıkarılabilmektedir [Wang ve ark.,2006; Coackley ve ark.,2003]. Oluşan KLA ya da KLA sentezleme yeteneğindeki suşlar direk kullanılarak antioksidan, antikanserojen, kolesterol düşürücü etkilerine bakılabilir. Çok iyi sonuç veren suşlarla sonraki aşamalarda insan kaynaklılar probiyotik uygulamalarda, gıda kaynaklılar gıda uygulamalarında kullanılarak KLA sentezi gerçekleştirilebilir ve bu senteze bağlı yararlı etkilerin açığa çıkarılması sağlanabilir. Ayrıca linoleik asidi KLA çevirme yeteneği yüksek bakterilerin probiyotik olarak kullanımında sindirim sisteminde benzer yararları sağlayabilecektir. Bu suşlar hem linoleik asitçe zengin besinlerle

beslenen kişilerde sindirim esnasında bu besinlerin KLA' ya çevrilmesinde katkı sağlayacak ve sentezle özellikle zararlı etkisi olabileceği düşünülen yağ asitlerini insan sağlığına yararlı forma (yani KLA) dönüştürebilecektir. Bu şekilde bağırsakta sentezlenen KLA antioksidan, antikolesterol ve antikanserojenik etkilerini gösterebilecektir.

Dünyada *Propionibacterium* spp. kültürleri ile ilgili çok fazla çalışmaya rastlanılmamaktadır. KLA sentezleme çalışmalarında daha çok *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* gibi çok çalışılan probiyotik bakteriler kullanılmaktadır. Antioksidan, antikanserojen çalışmalarda ise ticari KLA kullanılmaktadır. Bu çalışma bu düzeydeki ilk çalışma olarak daha sonraki araştırmalar için kaynak olarak kullanılabilir. Bu çalışmada;

- (i) Geleneksel el yapımı peynirlerden *Propionibacterium* izole edilip, biyokimyasal ve moleküler olarak tanımlanması,
- (ii) İzole edilen *Propionibacterium* spp. kültürlerinin ve kültür koleksiyonumuzda öne çıkmış *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* kültürlerinin KLA sentezleyebilme yeteneklerinin belirlenmesi ve propiyonibakterilerin diğer bakterilerle kıyaslanması,
- (iii) Madde i ve ii'de belirtilen doğal kaynaklı izolatlar kullanılarak farklı kaynaklı suşların ve türler arası farklılığın KLA sentezi açısından etkisinin ortaya konulması,
- (iv) KLA sentezleme kapasitesi en yüksek suşların seçilip farklı sıcaklık, pH, süre ve LA konsantrasyonu denenerek sentezlenen KLA miktarının en yüksek seviyeye çıkarılması,
- (v) Seçilen suşların kolesterol giderim etkisinin belirlenerek KLA sentezinin bu giderim etkisini artırıp artırmadığının belirlenmesi,
- (vi) Seçilen suşların antioksidan yeteneğinin belirlenerek bu kapasiteyle KLA sentezi arasındaki ilişkinin tespit edilmesi,
- (vii) Seçilen suşların Caco-2 ve CCL-221 hücre hatlarındaki tutunma yeteneğinin belirlenmesi ve KLA sentezinin tutunmayı artırıcı özelliği olup olmadığının belirlenmesi,

- (viii) KLA sentezi ile antikanserojenik ve sitotoksik etki arasındaki ilişkinin ve tutunma yeteneği ile antikanserojenik etki arasında bağlantı olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

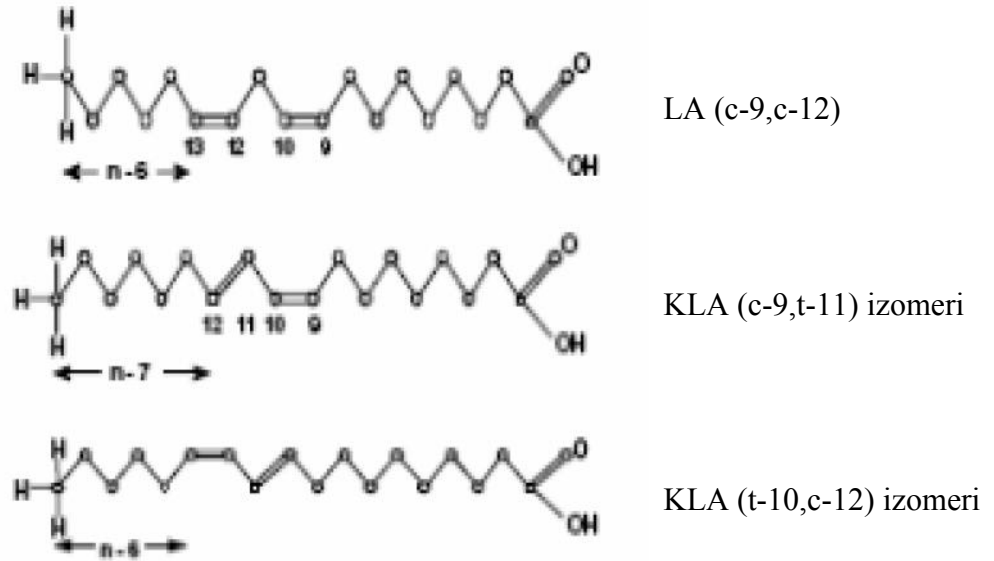
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Konjuge Linoleik Asit (KLA)

Konjuge linoleik asit (KLA), çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) içerisinde bulunur [Bhattacharya ve ark.,2006]. Esansiyel bir omega-6 yağ asidi olan, 18 karbon atomu ve 2 çift bağ içeren linoleik asidin (LA, C18:2, cis-9,cis-12) konjuge olmuş pozisyonel ve geometrik izomerlerinin genel adıdır [Pariza ve Hargraves, 1985; Bölükbaşı ve ark., 2006; Köknaroğlu, 2007; Çelebi ve Kaya, 2008]. KLA, geniş getiren hayvanlardan üretilmiş et ve fermente gıdalardan diyetle alınmaktadır. Ayrıca bazı mikroorganizmaların linoleik asidi biyosentezle KLA' ya çevirebildiği bilinmektedir. Yapılan çalışmaların KLA' nın immün sistemi düzenleyici, obeziteyi, kalp krizini önleyici, antioksidan ve antikanserojen özelliğe sahip olduğunu göstermesiyle KLA' ya olan ilgi artmış bu konuda pek çok çalışma yapılmıştır. [Barrett ve ark., 2007].

2.1.1. Konjuge Linoleik Asidin (KLA) yapısı

Konjuge linoleik asit, 18 karbon atomu ve konjuge olmuş 2 çift bağ içerir (Bkz. Şekil 2.1). Cis (c) ve trans (t) konfigürasyon gösteren çift bağlar çoğunlukla 8 ve 10, 9 ve 11, 10 ve 12 veya 11 ve 13. karbonlar arasında bulunur. KLA' da çift bağlar arasında LA' daki gibi metilen grup bulunmaz. 28 farklı izomeri bilinmekle birlikte sağlığa faydası açısından esasen iki izomer üzerinde durulmaktadır; cis-9, trans-11 (c-9,t-11) ve trans-10, cis-12 (t-10,c-12) [Bhattacharya ve ark., 2006].



Şekil 2.1. Linoleik asit ve konjuge c-9,t-11 ve t-10,c-12 izomerlerinin yapısı [Wahle ve ark.,2004].

2.1.2. Konjuge Linoleik Asit (KLA) kaynakları

Konjuge linoleik asit (KLA) izomerleri doğal olarak değişik miktarlarda birçok gıdada bulunmakla birlikte, insan diyeti için ana kaynağı ruminant hayvanlardan elde edilen et ve özellikle peynir, tereyağı, yoğurt, krema, dondurma, ayran gibi fermente süt ürünleri oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalar hayvan ve insan bağırsağında bulunan bazı mikroorganizmaların LA' dan çok sınırlı düzeyde KLA sentezleyebildiğini göstermiştir. Diyette alınan doğal gıdalardaki KLA' nın % 90'ını c-9,t-11 izomeri oluşturmaktadır [Çelebi ve Kaya, 2008].

Çizelge 2.1. Gıdalarda bulunan KLA miktarı (mg/g) [Chin ve ark.,1992; Kurban ve ark., 2006]

Gıda	Toplam KLA (mg/g)	Cis9-trans11 izomeri (%)
Et		
Sığır kıyma	4,3	85
Dana eti	2,7	84
Kuzu eti	5,6	92
Beyaz et		
Tavuk	0,9	84
Hindi	2,5	76
Süt ürünleri		
Homojenize süt	5,5	92
Beyaz peynir	4,5	-
Çedar peyniri	3,6	93
Mozarella peyniri	4,9	95
Tereyağı	4,7	88
Krema	4,6	90
Yoğurt	4,8	84
Dondurma	3,6	86
Bitkisel yağlar		
Ayçiçeği	0,4	38
Kanola	0,5	44
Mısır	0,2	39
Deniz ürünleri		
Somon	0,3	Te*
Alabalık	0,5	Te*

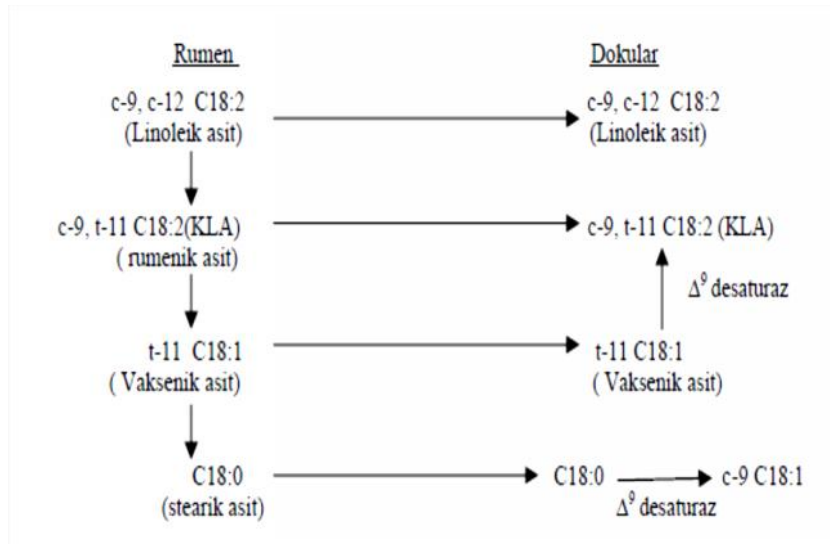
* Te: tespit edilemedi

2.1.3. Konjuge Linoleik Asidin (KLA) biyosentezi

Ruminant hayvanların ürünlerindeki KLA izomerleri iki yolla meydana gelmektedir. Birinci yol; geviş getiren hayvanların rumenlerinde linoleik asit gibi çoklu doymamış yağ asitlerinin son ürünü stearik asit olan biyohidrogenasyonda ara ürünler olarak doğal yollarla meydana gelirler. Biyohidrogenasyon 3 basamakta meydana gelir;

- 1- İlk olarak rumen bakterilerindeki (özellikle *Butyrivibrio fibrisolvens*) LA izomeraz enzimi LA'nın 12. karbon atomunda bulunan çift bağı 11. karbon atomuna taşır ve c/c konfigürasyonu c/t konfigürasyonuna dönüştürür ve c9,t11 KLA izomeri ara ürün olarak sentezlenmiş olur.
- 2- Oluşan c-9, t-11 KLA izomerinin bir kısmı dokulara taşınır. Dokulara taşınmayan izomerlerse KLA redüktaz enzimi ile redükte edilerek c18:1, t-11 trans vaksenik aside dönüştürülür.
- 3- Oluşan trans c18:1, t-11 vaksenik asidin de bir kısmı dokulara taşınır. Kalanlar mikrobiyal aktiviteyle stearik aside dönüştürülür.

İkinci yol; LA'nın biyohidrogenasyonu sırasında oluşan trans vaksenik asidin bir kısmı bağırsaklarda emilerek adipoz dokularda ya da memeli salgı bezinde desaturaz enzimi ile c9,t11 KLA'ya dönüştürülür. KLA biyosentezini anlatan şema Şekil 2'de verilmiştir. [Kepler ve Tove, 1967; Kepler ve ark., 1966; Coakley ve ark., 2002; Demirok ve Kolsarıcı, 2009].



Şekil 2.2. Konjuge Linoleik Asit (KLA) Sentezi [Çelebi ve ark., 2008].

KLA' nın biyosentezi, doymamış yağ asitlerinin konsantrasyonu, rumen pH'sı, rumenin iyonik gücü ve düşük miktarda diyet lif tüketimi gibi etmenlerden etkilenmektedir.

2.1.4. Konjuge Linoleik Asidin (KLA) sağlık açısından önemi

KLA' ya ilgi, ilk kez 1979 yılında Pariza ve arkadaşları tarafından pişirilmiş sığır etinde antikarsinojenik ve antimutajenik etkilerinin keşfiyle başlamıştır. Daha sonra bu etkilerine ek olarak vücut yağ birikimini azaltıcı etkisi, antidiyabetik etkileri, arteriosklerozis riskini azaltıcı, kemik mineralizasyonunu artırıcı ve immün sistemi kuvvetlendirici etkilerinin keşfine ek olarak son zamanlarda fonksiyonel gıda üretiminde rol oynamasıyla dikkat çekmektedir [Çelik, 2006].

Değişik süt ve et ürünlerinde bulunan KLA, süt yağı tüketiminin artışına paralel olarak insan yağ dokusunda ve anne sütünde artış göstermektedir. KLA izomerleri içerisinde özellikle cis 9, trans 11 (c-9, t-11) izomeri sağlık üzerine olumlu etkilerinden dolayı önemli bir ilgi odağı haline gelmiştir. Bu izomerin etkinliğinin en yüksek düzeyde olduğu kabul edilmektedir. Yine KLA antiatherojenik özelliği ile kalple ilgili sorunların tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır. Plazma kolesterol

seviyesini düşürmekte, aort damarı plaka kalınlığını olumlu yönde etkilemektedir. KLA' nın vücut yağını azaltıp yağsız kas oluşumunu arttırdığı tespit edilmiştir. KLA yağ dokusunu azaltırken kasları da geliştirerek vücut gelişiminde çok önemli bir kaynak olarak karşımıza çıkmaktadır. KLA bağışıklık sistemini güçlendirme ve canlı ağırlık kaybını engelleme açısından da önemli bir role sahiptir. Ayrıca antidiyabetik etkisi nedeni ile tip 2 şeker hastalığını iyileştirici özelliği belirlenmiştir [İrkin ve Eren, 2008]. Linoleik asitle kıyaslanarak yapılan çalışmalar KLA' in antioksidan etkiye de sahip olduğunu göstermiştir [Wilson ve ark., 2000].

Çizelge 2.2. KLA' nın bildirilmiş sağlığa faydalı/hastalıklardan koruyucu etkileri [Wahle ve ark., 2004].

• Antikanser	Tümör gelişimi/metastas inhibisyonu - hayvanlarda Kanser hücrelerinin çoğalmasının inhibisyonu- hücrelerde Anjiyogenez inhibisyonu- hayvanlarda
• Antiaterosklerozis	Plak formasyonunun azaltılması- hayvanlarda Adezyon molekül ifadesinin azaltılması- hücrede Sitokin formasyonunun inhibisyonu- hayvanlarda Anjiyogenez inhibisyonu- hayvanlarda
• Antiobezite	Yağ depolanmasının azaltılması- hayvanlarda/insanda Diyebetin azaltılması- hayvanlarda
• Bağışıklığın düzenlenmesi	İnflamatuar sitokinlerin üretilmesinin inhibisyonu- hayvanlarda/insanda Antikor formasyonunun geliştirilmesi -hayvanlarda/insanda

KLA' nın sağlığa başlıca etkileri;

Antikanserojen ve Antioksidan Etkisi

Antikanserojenik etkinin antioksidan özellik ile bağlantılı olduğunu söyleyen Wilson ve arkadaşları (2000) yaptıkları in vitro çalışmalarda KLA' nın E vitamini ve BHT kadar etkili antioksidan özellik gösterdiğini ve KLA' nın oksidasyona LA' dan daha dayanıklı olduğunu göstermişlerdir.

Konjuge linoleik asidin kanser üzerindeki olası etki mekanizmalarının,

- Kanser hücrelerini apoptosize indükleme
- Metastazı inhibe etme
- Hücre siklusunu etkileyerek hücreyi G0/G1 fazında tutma şeklinde olduğu düşünülmektedir.

Konjuge linoleik asitle yapılan çalışmalar majör iki izomer üzerinde yoğunlaşmıştır. c-9,t-11 KLA ve t-10,c-12 KLA izomerlerinin lipid metabolizması ve onkogenlerin regülasyonunda farklı etkileri olduğu için tümör büyümesini farklı mekanizmalarla düzenledikleri düşünülmektedir. t-10,c-12 izomeri apoptetik genlerin ekspresyonunu artırırken c-9,t-11 izomerinin pek çok çalışmada apoptozisi arttırmadığı görülmüştür. Hücre hatları üzerinde yapılan çalışmalarda genellikle Caco-2 hücre hattı kullanılmıştır. Murphy ve arkadaşları (2007), KLA izomerlerinin bağırsaklarda çok etkili bir biyoaktif bileşik olduğunu, çeşitli mekanizmalarla dolaylı ya da doğrudan intestinal sistemi etkilediğini söylemişlerdir. İnsan bağırsak epitelyum benzeri Caco-2 hücre hatları ile yaptıkları apoptozun kalsiyum emilimi ile ilgili olabileceğini bunun da t-10,c-12 izomeri ile etkilendiğini söylemişlerdir. Başka bir kolon kanser hücre hattı olan HT-29 ile yapılan bir çalışmada t-10,c-12 izomerinin DNA replikasyonunda ve hasar onarılmasında rol oynayan p21 protein seviyesini düşürerek hücrelerinin gelişimini engellediğini c-9,t-11 izomerinde etki görülmediğini söylemişlerdir [Lim-do ve ark., 2005]. Kolon hücreleri dışında in vitro çalışmalar t-10,c-12 izomerinin meme, kolorektal, gastrit, prostat ve hepatoma kanser hücre hatlarının büyümesini inhibe ettiği, meme ve bağırsak tümörlerinin düzelmesinde olumlu etki ettiğini göstermiştir [Kurban ve Mehmetoğlu., 2006; Kelley ve ark., 2007]. İnsan meme kanser hücre hattı MCF-7 üzerinde sitotoksik, insan melanoma kanser hücre hattı üzerinde antiproliferatif etkisi olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [MacDonald, 2000].

Diyetle alınan yağlar ile pek çok kanser türü arasındaki ilişkinin gösterilmiş olması dışında, bazı çalışmalarda bazı yağların prokarsinojenik etki gösterirken, omega-3 ve balık yağı gibi yağların ise antikarsinojenik etkili olduğu belirtilmiştir. Hayvanlarda yapılan çalışmalarda diyetle alınan KLA'nın prostat ve kolon kanserlerinde antikanserojen ve akciğer metastazında antimetastatik etkisi bulunduğu

gösterilmiştir. Ip ve arkadaşları (1995), dişi ratların diyetlerine sırasıyla %0, 0,5, 1,0, 1,5 düzeylerinde KLA ilave ederek yaptıkları bir çalışmada diyete KLA ilavesinin meme kanserini stimüle eden Dimetilbenz(a)antraken (DMBA)'ni önemli derecede azalttığını ve KLA seviyesine bağlı olarak meme tümörlerini sırasıyla, % 32, 56 ve 60 düzeylerinde azalttığını bildirmişlerdir.

Kalp Damar Hastalıklarını Önleme ve Kolesterol Düşürücü Etkisi:

Hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalar, diyetsel KLA' in kalp damar hastalıkları riskini önemli derecede azalttığını ve bunu plazma toplam kolesterol (T-KOL), Trigliserid (TG), düşük dansiteli lipoproteinlerin (LDL) düşürerek sağladığını bildirmişlerdir [Nicolosi ve ark.,1997]. Aynı zamanda KLA izomerleri yüksek dansiteli lipoproteinlerin (HDL) konsantrasyonunu arttırma ve karaciğerdeki kolesterol konsantrasyonunu azaltma özelliği ile de kalp damar hastalıklarında etkilidir.

De Deckere ve arkadaşları (1999) KLA ile ratlar üzerinde yürüttükleri bir araştırmada özellikle t-10, c-12 KLA izomerinin plazma toplam kolesterol ve LDL düzeylerini önemli derecede düşürdüğünü rapor etmişlerdir [Çelebi ve Kaya, 2008]. Diyetlerine LA, KLA, LN (linolenik asit) ve KLN (konjuge linolenik asit) eklenen hamsterlarda yapılan deneylerde KLA grubunun kolesterol tutumunda (non-HDL kolesterol) , karaciğer kolesterol seviyesinde, plazma total kolesterolünde azalma olduğu görülmüş [Kurban ve Mehmetoğlu, 2006].

Obeziteye Etkisi:

Erciyes Üniversitesi Sağlık Meslek Yüksek Okulu'nda, yaşları 24-48 arasında 24 obez kadın iki gruba ayrılarak, birinci grup normal diyetle, ikinci grup ise günde 1,8g KLA verilerek 8 hafta yürütülen araştırmada KLA verilen kadınların vücut ağırlığı, beden kitle indeksi, bel ve kalça çevresi ölçümlerinde diğer gruba göre önemli azalmaların sağlandığı ayrıca plazmadaki T-KOL, TG, LDL ve VLDL düzeylerinin düştüğü bildirilmiştir [İnanç, 2006].

İmmün Sisteme Etkisi:

Sitokinler, hücre sel büyüme, doku onarımı gibi biyolojik olaylarda rol oynayarak bağışıklık sistemini kontrol eden glikoproteinlerdir. Sitokinler tarafından lenfosit çoğalması uyarılarak makrofajlar tarafından immün sistemin hormonları sentezlenmekte ve serbest bırakılmaktadır [Weis ve ark.,2004]. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalar KLA'nın tümör oluşumunu destekleyen serbest radikallerin ve inflamatuvar sitokinlerin olumsuz etkilerine karşı bağışıklık sistemini koruduğunu, hücreler arası uyarı iletimini sağladığını ve ekosanoid ürünlerin oluşumunu azalttığını göstermiştir [Lee ve ark., 2006; Hwangbo ve ark.,2006].

2.2. Probiyotikler

Probiyotikler, insan ve hayvanların doğal mikroflorasına ait özellikleri geliştiren, tüketimleri sonucunda ağızda, sindirim sisteminde, üst solunum yollarında ya da ürogenital kanallarda yararlı etkileri ile konakçının sağlığını koruyan, buralarda oluşan enfeksiyonların iyileşmesine katkıda bulunan, tek veya karışık mikroorganizma kültürleridir [Marteau ve ark., 2002 ; Fuller,1989].

Probiyotik bakterilerin insan sağlığına faydalı etkileri arasında; patojenlerle epitel hücreye tutunma için yarışa girerek normal mikrofloranın düzenlenmesi, salgıladığı aktif biyoaktif moleküller ya da hücre duvarı komponentleri aracılığı ile antikanserojenik ve antioksidan aktivite, barsak mukozal bariyerinin korunması, barsak epitel hücresi-barsak mukozal immün hücreleri ile iletişime girerek immün sistemin düzenlenmesi, laktoz intoleransının düşürülmesi, B12 gibi bazı vitaminlerin sentezlenmesi sıralanabilir.

Probiyotik olarak kullanılan başlıca mikroorganizmalar; *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* türlerine ait cinsler, *Aspergillus niger*, *A. Oryza* gibi bazı küflerdir. [Yılsay ve ark., 2000; Akalın ve ark., 2003].

Bir mikroorganizmanın probiyotik olabilmesi için belirli özellikleri taşıması gerekmektedir. Probiyotik özellik için belirlenmiş bir kriter olmamasına karşın,

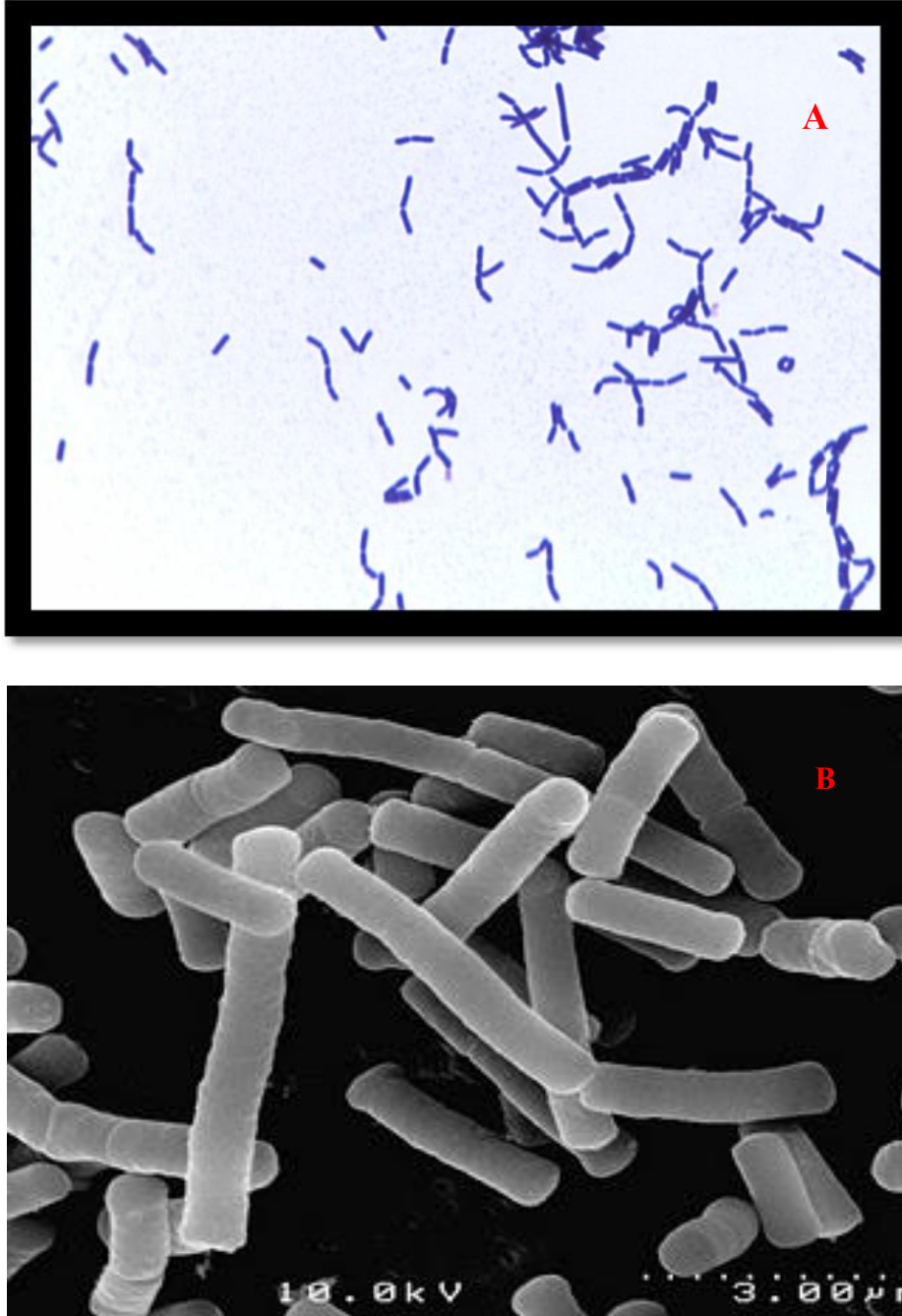
probiyotik olarak izole edilecek ya da tanımlanacak suşun aşağıdaki özellikleri taşıması gerekmektedir:

- a) Safra tuzu, asit, enzim ve oksijene karşı stabil kalması,
- b) İntestinal mukozaya tutunabilmesi,
- c) Gastrointestinal kanalda kolonize olabilmesi,
- d) Antimikrobiyal maddeler üreterek patojen bakterilerin gelişimini engelleyebilmesi
- e) Etkin ve güvenli olması [Kailasapathy ve Chin, 2000].

Laktik Asit Bakterileri

Laktobasiller, *Lactobacillaceae* familyasına ait olup laktik asit bakterileri grubundandır. Türe göre değişim göstererek süt ve süt ürünlerinde, insan ve diğer canlıların sindirim sistemleri, vajina, diş ve ağız, ayrıca bazı iç organlar gibi farklı habitatlarda rastlanılabilmektedir.

Laktobasiller Gram pozitif (Gr +), hareketsiz, spor oluşturmeyen bakterilerdir. Türlerinin çoğu mikroaerofilik olmakla birlikte anaerob ortamda daha iyi kolonize olurlar. Çoğu çubuk (basil) şeklinde olup ancak bazı türleri koko-basil şeklindedir. 35-40 °C sıcaklık ve pH 6,5-6,8'de optimal gelişim gösterirler.



Resim 2.1. (a) *Lactobacillus* sp. bakterisinin A) ışık mikroskobu B) elektron mikroskobu [www. dribrook.blogspot.com] görüntüleri.

Canlı mikrobiyal gıda katkı maddeleri olarak probiyotiklerin en iyi bilinenleri laktik asit bakterileridir. Mide asidine ve safra tuzlarına dayanıklı olması besinlerle alındığı zaman canlı olarak bağırsaklara geçebilmesini sağlamaktadır. Probiyotik olarak kullanılan *Lactobacillus* spp. türleri; *L. cellebiosus*, *L. delbrueckii*, *L. lactis*, *L.*

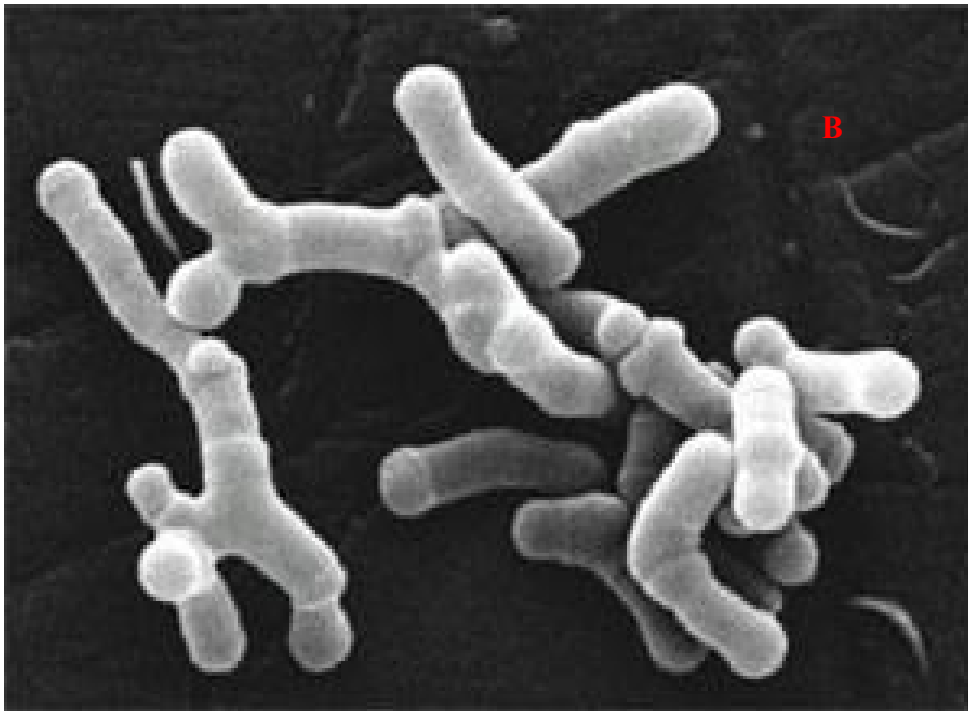
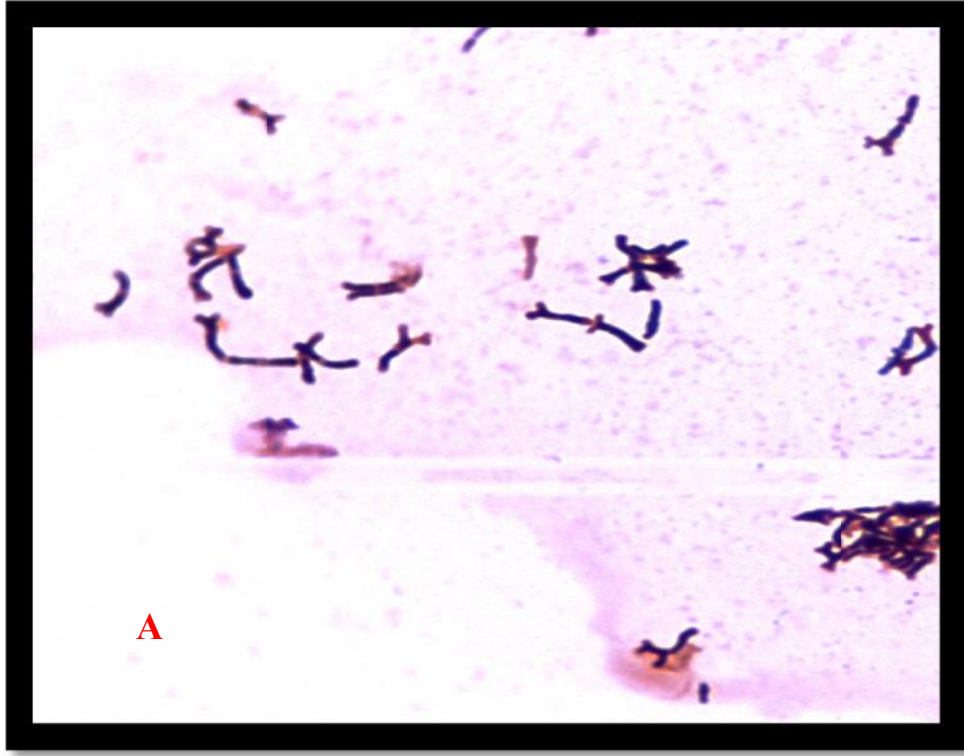
acidophilus, *L. bulgaricus* ve *L.reuteri*'dir. Yoğurt yapımında *Lactobacillus delbruecki* ssp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* birlikte kullanılmaktadır. Laktobasillerin antimikrobiyal, serum kolestrolünü düşürücü, immün sistemi güçlendirici, antikanserojen etkilerinin olduğunu gösteren pek çok çalışma mevcuttur [Ljungh ve ark., 2006].

MRS besiyerine 0 – 0,05 – 0,1 – 0,2 ve 0,5 mg/ml ve sterilize edilmiş süte 0,2 mg/ml LA katılarak insan bağırsağı kaynaklı *L. acidophilus* ve *L. casei* bakterilerinin KLA sentezleyebilme yeteneklerine bakan Alonso ve arkadaşları (2003) her iki bakterinin de KLA sentezleyebildiği göstermiştir. Lin ve arkadaşları (2003) ise LA' nın KLA' ya dönüşümünde rol oynayan linoleik asit izomeraz enzimini *Lactobacillus acidophilus* (CCRC 14079) suşundan ekstrakte ederek çalışmış ve KLA sentezlemişlerdir.

Bifidobakteriler

Bifidobakteriler, *Actinomycetaceae* familyasına ait olup, ekolojik orijinlerine göre gruplanmış 29 tür içermektedirler. Bifidobakteriler mide-bağırsak sistemi, vajina ve diş çürükleri gibi farklı habitatlarda bulunmaktadır. Özellikle insanların ve hayvanların mide-bağırsak sistemlerinin büyük bir kısmını kapsamaktadırlar [Rada ve Petr, 2002; Fooks ve ark., 1999]. Yeni doğmuş bebeklerin bağırsağında 3. gün görülmeye başlayıp 5. günden itibaren baskın olarak bulunur (% 95), yetişkinlerde ise toplam mikrobiyal popülasyonun % 25' ini oluşturur [Beasley, 2004].

Bifidobakteriler, Gram pozitif (Gr +), hareketsiz, spor oluşturmeyen, sıklıkla düzensiz dallanıp Y ve V şeklinde çubuklar olarak bulunan anaerobik mikroorganizmalardır. Bununla birlikte, normal habitatlarında sıklıkla çubuklar halinde olmalarına karşın, besiyeri şartları pleomorfizm göstermelerine sebep olmaktadır. Plak yüzeyinde ise mukoid kremi veya menekşe renginde görünüme sahiptirler [Leahy ve ark., 2005; Poupard ve ark, 1973]. 36-37 °C sıcaklık ve pH 6,5-7,0 aralığında optimal gelişim gösterirler [Leahy ve ark., 2005].

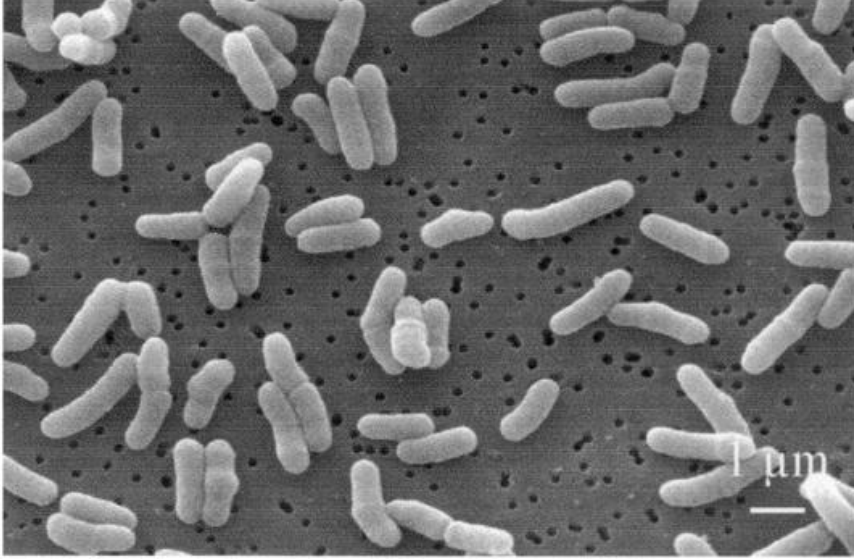


Resim 2.2. *Bifidobacterium* spp. bakterisinin A) ışık mikroskobu B) elektron mikroskobu [www.microbewiki.kenyon.edu] görüntüsü

Bifidobakteriler probiyotik mikroorganizmalar içinde önemli bir yere sahiptir. Probiyotik olarak kullanılan *Bifidobacterium* spp. türleri; *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*'dur. Yapılan çalışmaların bifidobakterilerin bağırsaklardaki faaliyetlerinin insan sağlığı için çok önemli olduğunu göstermesiyle süt teknolojisinde yoğun olarak kullanılmaya başlanılmışlardır. Bununla birlikte bifidobakterilerin immün sistemi düzenlediği [Garsse ve ark., 2003], serum kolesterolünü düşürdüğü [Klaver ve Meer, 1993], antikanserojenik [Rowland, 1998] etkilerinin olduğunu gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır.

Oh ve arkadaşları (2003), fekal örneklerden izole edip tanımladıkları bifidobakterileri 0,01- 0,05 mg/ml LA ve 0,1- 0,5 mg/ml Tween 80 içeren sisteinli MRS besiyerinde 12, 24, 36, 48 ve 60 saat inkübe ederek inkübasyon sonunda süpernatant ve pelletlerde oluşan KLA miktarlarını spektrofotometre ve gaz kromatografisi (GC) ile ölçmüşlerdir. Total KLA dönüşümü 36. saatte *Bifidobacterium breve*' de % 78, *B. pseudocatenulatum*'da % 69 oranında bulunmuştur Başka bir çalışmada 0,55 mg/mL LA içeren besiyerinde *B. breve* türünün LA ' i % 65 oranında KLA' e çevirebildiği görülmüştür [Coakley ve ark., 2002]. *B. breve*, *B. dentium* ve *B. lactis* yüksek miktarda KLA oluştururken diğer bifidobakterilerin yüksek miktarda KLA oluşturmadığı belirlenmiştir. Majör olarak oluşan izomer c-9,t-10 KLA bulunmuştur [İrkin ve Eren, 2008].

Propiyonik Asit Bakterileri



Resim 2.3. *P. freudenreichii* bakterisinin elektron mikroskobu görüntüsü [Leverrier ve ark., 2003]

Propiyonik asit bakterileri, *Actinobacteria* sınıfının *Propionibacteriaceae* familyasında yer almaktadır. 16S rRNA/DNA homolojilerine göre yüksek oranda % G+C (% 59 - 67) içeriğine sahiptirler. Propiyonik asit bakterilerinin % G + C içeriği türlere göre % 65 – 67 arasında değişmektedir. Genom büyüklüğü ise $1,6 - 3,2 \times 10^6$ baz çifti arasında değişmektedir [Deborde, 2003].

Propiyonik asit bakterileri, genel olarak Gram pozitif (Gr +), sporsuz, hareketsiz, çubuk şeklindedirler. Pleomorfik şekilli hücreleri vardır ve pleomorfik basil formundayken $0,5 - 0,8 \mu\text{m}$ çapında, $1 - 5 \mu\text{m}$ uzunluğundadırlar. Bazı kültürlerde hücrelerin kokkoid, elongad, bifid veya dallı görünüşü vardır. Bilinen hücreler tekli, ikili V veya Y şeklinde zincir veya Çin alfabesi harflerini andırır. Hücrelerin morfolojileri ve düzeni suşa, kültürün inkübasyon süresine ve kültürdeki besi ortamına göre değişmektedir [Gautier, 2004]. Gelişmiş kolonileri beyaz, gri, pembe, kırmızı, sarı veya turuncu renkte olabilmektedir [Cummunis ve Johnson, 1986]. Propiyonik asit bakterileri mesofilik bakterilerdir. Optimum gelişmeyi $25 - 30 \text{ }^\circ\text{C}$ sıcaklıkta ve pH $6,0 - 7,5$ arasında gösterirler. [Gautier, 2004; Deborde, 2003].

Propionibacterium cinsinin üyeleri yaşadıkları habitata göre, ‘Cildi ve ‘Klasik’ *Propionibacterium* olmak üzere iki temel gruba ayrılır. Cildi propiyonibakteriler insan derisinin mikrobiyal popülasyonun hakim üyeleridir. Klasik propiyonibakteriler genel olarak sütte ve fermente süt ürünlerinde bulunurlar. Az da olsa anaerobik sindirim yollarında rastlanılmaktadır [Turgay ve ark., 2011; Tilsala-Timisjärvi ve ark. 2001, Malik ve ark., 1986]. Son yapılan çalışmalarda bozulmuş portakal suyu, zeytin yapımında oluşan atıksu ve granulardan oluşan sığır lezyonları gibi yeni biotoplardan *P. cyclohexanicum*, *P. microaerophilum* ve *P. australiense* olarak tanımlanan üç farklı türü izole edilmiştir. 16S rRNA sekansları *P. cyclohexanicum* ve *P. australiense*’ in filogenetik olarak *P. freudenreichii*’ ye, *P. microaerophilum* ise *P. acidipropionici*’ ye benzer olduğunu göstermiştir. Ancak bu üç yeni türün hiçbirine süt ürünlerinde rastlanılmamıştır [Meile ve ark., 2008, Carvalho ve ark., 1995].

Çizelge 2.3. *Propionibacterium* spp. kültürleri

Klasik Türler	Cildi Türler
<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i>	<i>P. acnes</i>
<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	<i>P. avidum</i>
<i>P. jensenii</i>	<i>P. granulosum</i>
<i>P. thoenii</i>	<i>P. lymphophilum</i>
<i>P. acidipropionici</i>	<i>P. propionicus</i>
<i>P. australiense</i>	
<i>P. microaerophilum</i>	
<i>P. cyclohexanicum</i>	

Propiyonik asit bakterileri, gastrointestinal sistemdeki olumlu etkileri, B12 vitamini üretmeleri, antitümör etkisi gibi birçok özelliğiyle probiyotik mikroorganizmalar içinde yer almıştır. Ayrıca fermente süt ürünleri endüstrisinde de önemli yere sahiptirler. Bazı türleri (genellikle *P. freudenreichii*) genellikle homofermentatif laktobasiller ve streptokoklar ile birlikte İsviçre tipi peynirlerin üretiminde starter kültür olarak kullanılmaktadır. Peynirlere aroma vermekte ve oluşturdukları CO₂ sonucu peynirlerdeki delikli yapının oluşmasına neden olmaktadır [Tilsala-Timisjärvi ve ark. 2001; Fernandez Espla ve Fox, 1998; White ve ark., 2003].

Gıdalarda kullanılan bu bakterilerin KLA sentezleme yeteneklerinin de olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. MRS besiyerinde LA ile yapılan çalışmalarda birçok propiyonik asit bakterisinin KLA oluşturabildiği gözlenmiştir. Serbest linoleik asit konsantrasyonunun 10 µg/mL'den 1500 µg/mL' e artırılmasıyla bu suşların gelişiminin durduğu saptanmıştır [İrkin ve Eren, 2008]. Ayçiçek yağı yüksek konsantrasyonda LA (% 60- 70) içeren ekonomik bir linoleik asit kaynağıdır. Yapılan çalışmalar *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *freudenreichii* ve *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* türlerinin ayçiçek yağındaki LA' yı KLA' ya çevirebilme özelliğine sahip olduğunu göstermiştir [Wang ve ark., 2007]. Propiyonik asit bakterilerinin bazı suşlarının serbest linoleik asitten KLA üretme potansiyellerinden ötürü peynirlerde KLA miktarını arttırabilme olasılığı olduğu araştırmacılar tarafından düşünülmektedir. [Rainio ve ark., 2002].

2.3. Probiyotik Kültürlerle Konjuge Linoleik Asit (KLA) Sentezlenmesi

Probiyotik olarak bilinen *Lactobacillus*, *Propionibacterium* ve *Bifidobacterium* türlerinin sentetik besiyerlerinde ve sütte KLA sentezleme yeteneğinde olduğu saptanmıştır [Sieber ve ark., 2004; Barrett ve ark., 2007]. Oh ve arkadaşları (2003), fekal örneklerden izole edip tanımladıkları bifidobakterileri 0,01- 0,05 mg /ml LA ve 0,1- 0,5 mg/ml Tween 80 içeren sisteinli MRS besiyerinde 12, 24, 36, 48 ve 60 saat inkübe etmişler. İnkübasyon sonunda süpernatant ve pelletlerde oluşan KLA miktarlarını spektrofotometre ve gaz kromatografisinde (GC) ölçmüşlerdir. Total KLA dönüşümü 36. saatte *Bifidobacterium breve*'de % 78, *B. pseudocatenulatum*'da % 69 oranında ölçülmüştür. Başka bir çalışmada 0,55 mg/mL LA içeren besiyerinde *B. breve* türünün LA ' yı % 65 oranında KLA' ya çevirebildiği görülmüştür [Coakley ve ark., 2002]. MRS besiyerine 0, 0,05, 0,1, 0,2 ve 0,5 mg /ml ve sterilize edilmiş süte 0,2 mg/ml LA katarak insan bağırsağı kaynaklı *Lactobacillus acidophilus* ve *L. casei* bakterilerinin KLA sentezleyebilme yeteneklerine bakan Alonso ve arkadaşları (2003) her iki bakterinin de KLA sentezleyebildiği göstermiştir. Lin ve arkadaşları (2003) ise LA' in KLA' e dönüşümünde rol oynayan linoleik asit izomeraz enzimini *L. acidophilus* (CCRC 14079) suşundan ekstrakte ederek çalışmış ve KLA sentezlemişlerdir. Ayçiçek yağı yüksek konsantrasyonda LA (% 60- 70) içeren

ekonomik bir linoleik asit kaynağıdır. Yapılan çalışmalar *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *freudenreichii* ve *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* türlerinin ayçiçek yağındaki LA' i KLA' e çevirebilme özelliğine sahip olduğunu göstermiştir [Wang ve ark., 2007]. Özellikle fermente süt ürünlerinde laktik asit bakterileri, propiyonik asit bakterileri gibi birçok probiyotik mikroorganizma starter kültür olarak kullanılmaktadır. Peynir 1 gramında yaklaşık olarak 3-9 mg arasında KLA içermesi bakımından süt ürünleri içinde önemli konjuge linoleik asit kaynağıdır. Yağsız süt tozu içeren ortamlar kullanıldığında laktobasil, laktokok ve streptokok' lar % 10 oranında, propiyonik asit bakterileri ise % 90 oranında serbest linoleik asidi KLA' ya dönüştürdüğü görülmüştür [İrkin ve Eren, 2008]. Gıdalara starter kültür olarak KLA sentezleyebilen probiyotik bakterilerin katılması hem gıdalardaki KLA miktarının artırılmasıyla hem de sahip oldukları probiyotik özellikleriyle sağlığa olumlu etkiler gösterecektir.

İnkübasyon süresi, sıcaklık, ph ve linoleik asit miktarı gibi parametrelerde denemeler yapılarak optimal koşullar bulunup bakterilerce sentezlenen KLA miktarı artırılabilir.

Bunların yanı sıra prebiyotiklerin de KLA miktarının artırılmasında etkili olabileceği düşünülmektedir. Prebiyotikler, başlıca oligosakkaritler olup bağırsak sisteminde bir veya sınırlı sayıda probiyotik bakterilerin gelişimini ve aktivitesini teşvik ederek, insan ve hayvan sağlığını olumlu yönde etkileyen gıda bileşenleridir [Perrin ve ark., 2001]. Çalışmalarda sıklıkla inülin prebiyotiği kullanılmaktadır.

2.4. KLA Sentezleyebilen Probiyotik Kültürlerin Kolesterol Düşürücü Etkisi

Kolesterol, lipidlerin ayrı ve özelleşmiş bir grubu olup insanlarda en fazla bulunan steroldür. Kolesterolün, bütün hücre zarlarının yapısına katılmak, safra tuzları, steroid hormonlar ve D vitaminin öncül maddesi olmak gibi önemli görevleri vardır. Bu önemli görevleri ile beraber yüksek miktarlarda bulunması koroner kalp hastalıkları ve damar sertliği gibi hastalıklara neden olmaktadır [Champe ve Harvey, 1997; Walker ve Gilliland, 1993].

Kolesterol, genellikle beslenme yoluyla dışarıdan alınmasına rağmen, aslında vücut, ihtiyaç duyulan tüm kolesterolü üretebilme kabiliyetindedir. Kolesterol karaciğerdeki kolesterol havuzuna bazı kaynaklardan gelir: Bunlar; diyetle alınan kolesterol, ekstrahepatik dokularda sentezlenen kolesterol ve karaciğerde de novo sentez sonucu oluşan kolesteroldür. Kolesterol esasen, karaciğer ve bağırsaklarda, yağ, protein ve karbonhidrat parçalarından sentezlenir. Vücuttaki kolesterolün yarısından çok az bir kısmı de novo biyosentez yoluyla elde edilir. Günlük kolesterol sentezinin yaklaşık olarak %10'u karaciğerde, %15'i ise bağırsaklarda gerçekleşir [Champe ve Harvey, 1997; Walker ve Gilliland, 1993; Ma, 2004, url1; Tok, 2007].

Kolesterol karaciğerden safra aracılığıyla atılır ve bir kısmı ince bağırsak tarafından geri alınır. Yapılan çalışmalar bağırsak florasında bulunan probiyotik bakterilerin çeşitli mekanizmalarla kolesterol miktarını azalttığını göstermiştir. Bu mekanizmalardan başlıcaları:

- *Diyetle alınan kolesterolün bağırsaklardan emiliminin azaltılması:* Kolesterolün bakterilerce asimile edilmesi ya da bakteri hücre zarında tutunması gibi çeşitli yollarla azaldığı düşünülmektedir. Gilliland ve arkadaşları, 1985 yılında yaptıkları bir in vitro çalışmada, belirli *L. acidophilus* suşlarının anaerobik koşullar altında ve safra varlığında, besiyerindeki kolesterol miktarını azaltabildiğini göstermişlerdir.

- *Safra tuzlarının dekonjugasyonu:* Yapılan çalışmalar bağırsaklarda bulunan probiyotik özellikteki bakterilerin safra tuzlarını dekonjugasyona uğratması ile serum kolesterol seviyelerini düşürebildiğini göstermiştir. [Corzo ve ark., 1999]. Dekonjuge olmuş (serbest) safra asitlerinin çözünürlüğü daha azdır ve bunlar bağırsak kanalından konjuge safra tuzlarına kıyasla daha az emilirler. Bu sebeple, ince bağırsakta, safra tuzlarının dekonjugasyonu, bağırsak kanalından daha fazla safra asidinin atılmasına yol açar. Safra asitlerinin daha fazla atılmasıyla enterohepatik sirkülasyon ile karaciğere dönen safra asidi miktarı azalır. Meydana gelen bu eksiği tamamlamak için, karaciğer, vücuttaki mevcut kolesterolü kullanarak daha çok safra asidi sentezler. Böylece, daha fazla safra asidinin üretilmesi için, safra asitlerinin

öncül maddesi olan kolesterolün kullanımı artar ve dolayısıyla serum kolesterol seviyesinde bir azalma meydana gelir [Ahn ve ark., 2003; Pereira ve Gibson, 2002]

Bu mekanizmalara ilave olarak son yıllarda KLA' nın da serum kolesterolünü düşürdüğünü gösteren çalışmalar yapılmaktadır. Fakat bakterilerce sentezlenen KLA' nın kolesterol düşürmedeki etkisi üzerine çalışmalara rastlanılmamakta, çalışmalarda ticari KLA kullanılmaktadır. KLA' nın kolesterol giderimi için çeşitli mekanizmalar ileri sürülmüştür. Hayvan modelleri ve insanlar üzerinde yapılan bilimsel araştırmalar, diyetsel KLA izomerlerinin vücutta yağ dokusunu azaltıp, protein, mineral ve su birikimini artırarak yağsız kas dokusunu yükselttiğini rapor etmiştir. Bu etkinin mekanizması net olarak bilinmemekle birlikte, KLA izomerlerinin, vücutta yağların depolanmasını sağlayan lipoprotein-lipaz enziminin aktivitesini engelleyerek vücutta yağların depolanmasını azalttığı bildirilmektedir. Trans-10, cis-12 (t-10,c-12) izomerinin kolesterol üzerinde en etkili izomer olduğu tespit edilmiştir. Bu izomer ve/veya metabolitleri stearoyl-CoA desaturase (SCD) ve lipoprotein lipaz (LPL) enzimlerini inhibe ederek adiposit dokulardaki lipit miktarını azaltmaktadır. Bir diğer çalışmada KLA' nın intestinal açil koenzim A: kolesterol açil transferaz (ACAT) aktivitesine bakılmış, KLA' nın ACAT aktivitesini engelleyerek karaciğer dokusundaki kolesterol miktarını azalttığı gösterilmiştir [Barrett ve ark., 2007; Çelebi ve Kaya, 2008].

2.5. KLA Sentezleyebilen Probiyotik Kültürlerin Antioksidan Aktivitesi

Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan kimyasal türlerdir. Eşleşmemiş bu elektronlar genellikle yüksek reaktiviteye sahiptir ve kimyasal reaksiyonlar içinde yer alma eğilimleri fazladır [Kong ve Lin, 2010]. Organizmada biyolojik olarak önemli 3 tip serbest radikal vardır. Bunlar; oksijen türleri, süperoksit O_2^- , hidroksil radikali $OH\cdot$, ve reaktif nitrojen türleridir $NO\cdot$. Süperoksit radikal anyonu (O_2^-), hidroksil radikali ($OH\cdot$) ve diğer reaktif oksijen türleri canlı hücrelerdeki tüm biyomakromoleküllerle reaksiyona giren yüksek oksidanlar olarak bilinmektedir [Blois, 1958; Decker, 1990]. Besinlerin gastrointestinal sistemden geçişi sırasında reaktif oksijen türleri (ROT) oluşmaktadır.

ROT üretimi ve hücreleri koruyan antioksidan savunması arasında hassas bir denge vardır. Bu dengenin bozulması pek çok kanser çeşidi, DNA mutasyonları, damar sertliği, Alzheimer, Parkinson gibi hastalıklara sebep olabilmektedir [Muller ve ark., 2007, Grajek ve ark., 2005].

Yapılan çalışmalar probiyotiklerin farklı mekanizmalarla antioksidan ve antikanserojen etkileri olduğunu göstermiştir. KLA sentezi de bu mekanizmalar arasındadır [Wilson ve ark., 2000]. Probiyotik mikroorganizmaların antioksidan etkilerinin belirlenmesi için genel olarak DPPH serbest radikali giderme, metal iyonlarını şelatlama ve lipid peroksidasyonunu inhibe etme özellikleri analiz edilmektedir [Lin ve Chang, 2000; Ebrahimzadeh ve ark., 2008, Kodali ve Sen., 2008].

2.6. KLA Sentezleyebilen Probiyotik Kültürlerin Adezyon Yeteneği

Bir bakterinin probiyotik sayılabilmesi için taşınması gereken önemli özelliklerden biri de tutunma yeteneğidir. Probiyotik kültürlerin bağırsağa varması halinde, peristaltik hareketler ile bağırsaktan kayıp gitmemesi için bağırsak lümenini örten mukus tabakasına ve epitel hücrelerine tutunması gerekmektedir. Probiyotikler, patojenlerin kolonizasyonunu azaltma, immün sistemi düzenleme, zarar gören mukozanın daha hızlı iyileşmesini sağlama gibi sağlığa faydalı etkilerini ancak tutunup kolonize oldukları zaman gösterebilirler. [Ouwehand ve ark., 2001, Kirjavainen ve ark. 1998].

Probiyotik mikroorganizmaların intestinal hücrelere adezyon kapasitesi türden türe değişmektedir. Adezyon kapasitesinin bakteri yoğunluğu, pH gibi faktörlerden de etkilendiği gösterilmiştir [Vesterlund ve ark., 2005]. Laktobasillerin insan bağırsak hücrelerine yapışmasının, bakteri yüzeyinde bulunan protein ve karbohidratların farklı kombinasyonlarından oluşan mekanizmadan kaynaklandığı düşünülmüştür [Tuomola ve ark., 1999]. Bifidobakterilerin epitel yüzeylere yapışmasında proteinaceous olarak adlandırılan bir protein bileşiğin aracılık ettiği bulunmuştur. Bifidobakterilerin yapışkan-benzeri proteinlerinin türe özgü olduğu gösterilmiştir

[Bernet ve ark., 1993]. Propiyonibakterilerin bağırsak hücrelerine tutunmasında, bakteri yüzey hidrohobisitesinin etkili olduğu ve aralarında pozitif bir korelasyon olduğu düşünülmüştür.

Özellikle insanda, *in vivo* olarak bakteriyel yapışma çalışmaları sırasında karşılaşılabilecek zorluklar nedeniyle, insan bağırsak hücrelerine bakteriyel yapışma için *in vitro* model sistemi geliştirilmiştir. Bakteriyel çalışmalarda çoğunlukla kullanılan hücrelerden biri Caco-2 hücresidir. Caco-2 hücreleri normal ince bağırsak villus hücrelerinin özelliklerine sahip olduğu için yapışmaya yönelik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Caco-2 hücreleri yalnızca normal mikroorganizmaların yapışma mekanizmasıyla ilgili çalışmada değil aynı zamanda bu bakterilerin patojenler ile aynı ekosistem için nasıl rekabete girebildiklerini gösteren çalışmada da kullanılmıştır [Bernet ve ark., 1993]. Ouwehand ve arkadaşları (2002), sınırlı sayıdaki propiyonibakteri suşunun tutunma yeteneğinde olduğunu söylemişlerdir. Huang ve Adams (2003), elektron mikroskopu kullanarak yaptıkları çalışmada 6 suş içinden sadece *P. jensenii* suşlarının adezyon yeteneği gösterdiğini belirtmiştir. Bifidobakteriler ve laktobasiler, propiyonibakterilerle birlikte kültüre edildiklerinde farklı miktarlarda olmakla birlikte hücrelere daha fazla tutunabildikleri gösterilmiştir. Yapışma yeteneğindeki bu artışın koagreasyonla ilgili olabileceği ileri sürülmüştür [Arthur ve ark., 2002].

2.7. KLA Sentezleyebilen Probiyotik Kültürlerin Antikanserojenik Etkisi

Diyetlerinde yoğurda yer veren kişilerin bazı kanserlere yakalanma riskinin daha az olduğuna dair geçmiş yılların gözlemleri ve son yılların epidemiyolojik verileri dikkatleri probiyotikler üzerine çekmiştir. Mekanizması tam anlaşılamamakla beraber son yıllarda yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar probiyotik kültürlerin antikanserojenik etkilerinin olduğunu göstermiştir. Probiyotiklerin, antitümoral madde sentezleyerek, karsinojenleri aktive eden enzimleri inhibe ederek, karsinojenlerin yapısını bozarak ve bağışıklık sistemini uyararak antikanserojenik etki gösterdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [Gültekin, 2001]. Baricault ve arkadaşlarının (1995) laktik asit bakterileri ile yaptığı çalışmada, bakterilerin kolon

kanser hücre hattının (HT-29) gelişimini önemli derecede engellediği görülmüştür. *Propionibacterium acidipropionici* suşu ile yapılan bir çalışmada, fermentasyon sonucu oluşan kısa zincirli yağ asidi propiyonat ve asetatın mitokondri üzerine etki ederek HT-29 ve Caco-2 hücre hatlarının gelişimini inhibe ettiği bulunmuştur. Sonuçlar caspas-3 kullanılarak yapılan western blot çalışması ile doğrulanmıştır [Jan ve ark., 2002].

Bakteriyel kültürlerin sentezlediği KLA ile yapılan çalışmalar bulunmamakla birlikte KLA izomerleri ile yapılmış pek çok çalışma bulunmaktadır. Kolon kanser hattı Caco-2 ve HT-29, göğüs kanser hattı MCF-7 ve MBA-MB 231, prostat kanser hattı PC-3 üzerinde yapılan çalışmalarda antikanserohjenik etki farklı mekanizmalarla açıklanmış, genel olarak t10, c12-CLA izomerinin çok daha etkili olduğu söylenmiştir [Kelley ve ark., 2009].

2.8. Konjuge Linoleik Asit (KLA) Sentezleyebilen Probiyotik Bakterilerin Gıdalarda Kullanılması

Sağlıklı yaşam dengeli beslenmeyle doğrudan ilişkilidir. Vücudumuz gerek fiziksel gerekse zihinsel fonksiyonlarını yerine getirebilmek için ihtiyaç duyduğu enerjiyi besinlerle sağlar. Son yıllarda bazı besinlerin doğal yollardan hastalıkların önlenmesi ve tedavisindeki etkinliğinin bilimsel olarak ortaya konulması sağlığımızın korunmasında beslenme desteğinin önemini artırmıştır. Bu nedenle fonksiyonel besinler ve doğal sağlık ürünleri daha fazla tüketilmeye başlamıştır. Fonksiyonel besinler, besleyici özellikleri dışında vücudumuza fizyolojik yararlar sağlayan ve kronik hastalık riskini azaltabilen besinlere denilmektedir. Bu fonksiyonel gıdalardan biri de sağlığa faydalarıyla ilgi odağı haline gelen KLA' dır [Çelebi ve Kaya, 2008]. KLA tamamen organik sentezle üretilebildiği gibi; fermentasyon, enzimatik izomerizasyon ve genetik mühendisliği/biyomühendislik ile de üretilebilir [Bayaz ve Mehenktaş, 2005].

Geleneksel organik sentezle yapılan çalışmada, Holstein sığırlarının abomasumlarına doğrudan % 0, 50, 100 ve 150 g/gün KLA vererek yürütülen bir çalışmada hayvanlara KLA verilmesinin süt proteinleri ve süt verimi üzerine önemli bir etkisinin olmadığını, ancak sütteki yağ oranını azalttığını ve süt yağındaki KLA içeriğini çok önemli ölçüde etkileyerek, KLA oranını % 6,8'den % 63,8'e kadar yükselttiğini belirtmişlerdir.

Biyomühendislik ile istenilen KLA izomeri daha ucuza elde edilebilmektedir. Bu yöntemin dezavantajları ise istenilen genetik özelliklerinin keşfinin ve olası zararlarının belirlenebilmesinin uzun zaman almasıdır.

Linoleik asit izomeraz içeren mikroorganizmaların LA' yı konjugeye çevirebildiğinin fark edilmesi KLA sentezini mikrobiyal yöntemlere kaydırmıştır. Ayrıca saflaştırılmış enzimler de kullanılabilir [Bayaz ve Mehenktaş, 2005]. Özellikle fermente süt ürünlerinde laktik asit bakterileri, propiyonik asit bakterileri gibi birçok probiyotik mikroorganizma starter kültür olarak kullanılmaktadır. Peynir 1 gramında yaklaşık olarak 3 - 9 mg arasında KLA içermesi bakımından süt ürünleri içinde önemli konjuge linoleik asit kaynağıdır. Yağsız süt tozu içeren ortamlar kullanıldığında laktobasil, laktokok ve streptokok lar % 10 oranında, propiyonik asit bakterileri ise % 90 oranında serbest linoleik asidi KLA' e dönüştürmüşlerdir [İrkin ve Eren, 2008].

Mikroorganizmalarla yapılan bu çalışmalar diğer gıdalara da uygulanabilir. Gıdalara katılacak probiyotik bakteriler hem KLA sentezlemeleriyle gıdaların kalitelerini arttıracak hem de sahip oldukları probiyotik özelliklerle sağlığa olumlu etkileri olacaktır. Sonraki aşamalarda KLA açısından zengin gıdaların alımıyla kanser, obezite gibi sağlık sorunlarının iyileştirilmesi yönünde araştırmalar yapılabilir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Materyal örnekleri

Araştırmada *Propionibacterium* spp. izolasyonu için Türkiye'nin farklı yerlerinden temin edilmiş delikli yapıya sahip 78 adet el yapımı peynir kullanılmıştır. KLA standart eğrisinin çıkarılmasında ticari saf KLA (Sigma), KLA sentezi için ticari saf LA (Sigma) kullanılmıştır.

3.1.2. Araştırmada kullanılan bakteriler

Bu çalışmada peynirlerden izole edilmiş *Propionibacterium* spp. kültürleri kullanılmıştır. Ayrıca Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan tanımlanmış 3 adet *Lactobacillus* spp. ve 2 adet *Bifidobacterium* spp. kültürleri ve standart DSMZ propiyonibakter kültürleri ile çalışılmıştır (Bkz. Çizelge 4.3).

3.1.3. Bakterilerin geliştirilmesi için kullanılan besiyerleri

Propiyonik asit bakterilerinin geliştirilmesi için YEL (Yeast Extract Lactat) besiyeri kullanılmıştır. Peynirlerden *Propionibacterium* spp. izolasyonu için YEL besiyerine nalidiksik asit antibiyotiği ilave edilerek *Propionibacterium* spp.'ler için seçici olan YELN agar kullanılmıştır.

Araştırmada kullanılan YEL (Yeast Extract Lactat) sıvı besiyeri içeriğinde yer alan maddeler Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. *Propionibacterium* spp.'ler için kullanılan YEL besiyeri

Maddeler	g/L
Yeast Ekstrakt	5,00
Sodyum Laktat	20,00 ml
Pepton from casein (Pankreatik Enzimlerle Parçalanmış)	2,00
Dipotasyum hidrojen fosfat (K ₂ HPO ₄)	10,00
Hemin	10,00 ml
Tween 80	1,00 ml

Maddeler tartılıp distile su ile 1000 ml'ye tamamlanıp, pH' sı 7,2 ± 0,02' ye ayarlanmıştır. Daha sonra 121 °C' de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Katı besiyeri elde etmek için sıvı besiyerine % 1,5 g agar ilave edilmiştir.

Seçici YELN agar için, % 0,02 g nalidiksik asit distile su ve 0,1 M NaOH (1/1) ile çözülerek hazırlanmıştır. Sterilize edilmiş YEL agar 40-45°C'ye geldiğinde, antibiyotik çözeltisi 0,45 µm por çaplı filtreden geçirilerek steril edilmiş ve YEL agar besiyerine aktarılmıştır.

Çalışmada kullanılan laktobasillerin geliştirilmesi için MRS (De Man Rogosa and Sharpe) ve bifidobakterilerin geliştirilmesi için MRSc (sisteinli MRS) besiyerleri kullanılmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. *Lactobacillus* spp. ve *Bifidobacterium* spp.'ler için kullanılan MRS ve MRSc besiyeri

Maddeler	g/L
Pepton	10,00
Tri Amonyum Sitrat	2,00
Beef Ekstrakt	10,00
Magnezyum Sülfat (MgSO ₄ . 7H ₂ O)	0,20
Yeast Ekstrakt	5,00
Manganez Sülfat (MnSO ₄ . 4H ₂ O)	0,05
Glikoz	20,00
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	2,00
Sodyum Asetat	5,00
Tween 80	1,00 ml

Maddeler tartılıp distile su ile 1000 ml' ye tamamlanmıştır. pH' sı 6,8 ± 0,02' ye ayarlanmıştır. Katı besiyeri hazırlamak için besiyerine % 1,5 oranında agar ilave edilmiştir. Besiyeri 121°C' de 15 dk. otoklavda steril edilmiştir.

Araştırmada kullanılan Sisteinli-MRS (MRSc) sıvı besiyerinin hazırlanmasında Çizelge 3.2.'de verilen MRS besiyeri içeriğine ek olarak 1,00 g/L olacak şekilde L-sistein ilave edilmiş ve 1000 ml' ye distile su ile tamamlanmıştır (pH $6,8 \pm 0,02$).

3.1.4. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları

Propionibacterium spp.' lerin geliştirilmesi ve aktifleştirilmesinde YEL sıvı besiyeri kullanılmıştır. Propiyonibakteriler, karbondioksitli inkübatörde (SANYO, MCO-18AIC) % 5 CO₂ ve $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ' de geliştirilmiştir. İnkübasyon süresi sıvı besiyerinde gelişen kültürler için 3 - 5 gün, agarda geliştirilen kültürler için ise pigment oluşumunun tamamlanması için 7 - 10 gün olarak belirlenmiştir. [Britz ve Riedel,1994; Thierry ve Medec, 1995; Drinan ve Cogan, 1992].

Lactobacillus kültürlerinin geliştirilmesinde MRS Broth ve MRS Agar besiyerleri kullanılmıştır. Kültürler 37°C 'de 24 saat geliştirilmiştir [Man ve ark., 1960; Ronald ve ark.,1997].

Bifidobacterium kültürlerinin geliştirilmesi ve aktifleştirilmesinde % 0,1 L-sistein (Merck) içeren Sisteinli-MRS Broth (MRSC) ve Agar kullanılmıştır. Kültürler $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de % 10 CO₂ salınımını sağlayan anaerobik kit kullanılarak (Oxoid, Anaerobic generating kit) anaerobik jar (Oxoid, Anaerojar) içerisinde geliştirilmiştir. Sıvı besiyerinde 2, agarda 3 gün inkübe edilmiştir [Beerens, 1990]. Tüm çalışmalarda iki kez aktifleştirilmiş kültürler kullanılmıştır.

3.1.5. Araştırmada kullanılan hücre hatları

Çalışmada ŞAP Enstitüsünden temin edilmiş kolon karsinoma hücre hattı (Caco-2) ve Hacettepe PEDİ-STEM'den temin edilmiş kolorektal kanser hücre hattı (CCL-221) kullanılmıştır. Kontrol amaçlı olarak Gülhane Askeri Tıp Akademisi'nden (GATA) alınmış sağlıklı hücre hattı gingival fibroblast kullanılmıştır. Hücre çalışmaları Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde (MOBAM) yapılmıştır.

3.1.6. Hücrelerin geliştirilmesi için kullanılan besiortamları ve gelişme şartları

Hücreler %10 fetal sığır serumunda (FBS, Gibco), % 1 penisilin/streptomisin antibiyotiği (Sigma) ve % 40 MCDB (Sigma) içeren DMEM (İnvitrogen) besiortamında 37°C'de % 5 CO₂'li inkübatörde geliştirilmiştir. Her 3 günde bir besiortamı değiştirilmiştir. Kültür kaplarında % 80 yayılma gösteren hücreler Tripsin/EDTA çözeltisi ile kaldırılarak sayılmıştır. Sayılan hücreler yapılacak deneye göre geliştirilmeye ya da kriolarda muhafazaya alınmıştır [Morita ve ark., 2002].

3.2. Metot

3.2.1. Propiyonik asit bakterilerinin izolasyonu

Türkiye'nin farklı bölgelerinden delikli yapıya sahip el yapımı yöresel peynirler temin edilmiştir. Temin edilen peynir kalıplarının iç kısımlarından 25 g peynir steril koşullarda alınıp, steril edilmiş 225 ml serum fizyolojik (SF, % 0,9 NaCl) içerisinde iyice ezilip homojenize edilmiştir. Tüplere hazırlanmış 9 ml SF'lerde 10⁻⁵'e kadar dilüsyon yapıp YELN agar besiyeri içeren plaklara 3 paralelli ekimleri yapılarak, anaerobik ortamda 30°C' de 7 - 10 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda krem, kahverengi, turuncu, kırmızı koloniler seçilerek YEL sıvı besiyerine alınıp geliştirilmiştir. Seçilip YEL sıvı besioratmında geliştirilen kolonilerin Gram boyamaları yapılarak morfolojileri ışık mikroskopisinde incelenmiştir. *Propionibacterium* olması muhtemel suşlara identifikasyon testler uygulanmıştır [Britz ve Riedel, 1994; Cummins ve Johnson,1986].

3.2.2. Bakterilerin muhafazası

Kültürler kendileri için uygun besiortamında art arda iki kez aktifleştirilmiştir. 1 ml gliserol (Merck) kapaklı cryo tüpler içerisinde 121 °C' de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Aktifleştirilen kültürlerden 1 ml alınarak steril gliserol içeren ortama ilave edilip, -80 °C' de muhafazaya alınmıştır. Muhafazaya alınan stoklar altı ayda bir yenilenmiştir [Baer and Ryba, 1992].

3.2.3. Peynirlerden izole edilen propiyonik asit bakterilerinin tanımlanması

İzolatların ilk olarak koloni morfolojileri, renk ve pigmentasyonu, hücresel morfolojileri, gram reaksiyonlarına bakılmıştır. Muhtemel izolatlar katalaz ve oksidaz ile muamele edilerek ön tanımlamaları gerçekleştirilmiştir.

İzolatların mikroskopik, kültürel ve biyokimyasal tanımlamaları

2 kez aktifleştirilmiş kültürler 2 kere % 0,9'luk SF ile yıkanıp 600 nm' de yaklaşık OD 0,6'ya ayarlanmıştır. Ayarlanan bakteriler ile 23 adet şekerin (amigdalin, arabinoz, sellobioz, eskülin, fruktoz, galaktoz, glukoz, gliserol, inülin, laktoz, maltoz, mannitol, melezitoz, rafinoz, ramnoz, riboz, salisin, sorbitol, sorboz, nişasta, sükroz, ksiloz, trihaloz) fermentasyonu ayrıca % 2, 4, 6,5 ve 10 tuz dirençliliği, indol, eskulin hidrolizi, arjinin hidrolizi, glukozdan gaz oluşturma, triple sugar iron (TSI), sitrat, hareketlilik, asetoin, nitrat redüksiyonu, lizin dekarboksilaz biyokimyasal testleri yapılmıştır. İzolatların kültürel ve biyokimyasal tanımlamaları Bergey's Manual of Determinative Bacteriology esas alınarak değerlendirilmiştir. [Britz ve Riedel, 1994; Arda, 2006].

İzolatların ileri biyokimyasal tanımlamaları

İzolatların ileri biyokimyasal tanımlamalarında API test kitleri; API 50CH, API 20E ve API 20A (API Sistem, Bio-Merieux, France) kullanılmıştır. İzolatların yoğunlukları kullanılan API testine göre ayarlanarak kitte belirtilen prosedüre göre ekimleri gerçekleştirilmiştir [EK1: API kitlerinin metodolojisi]. 7 gün inkübasyon sonrasında renk değişimlerine göre değerlendirmeler yapılmıştır [EK2: API kitlerinin değerlendirilmesi]. İzolatların API sonuçları, standart DSMZ suşlarının API sonuçları ile NTSYSpc2.0 programıyla değerlendirilmiş, izolatlarımızın bu suşlara yakınlık-uzaklıkları belirlenmiştir.

İzolatların moleküler tanımlamaları

Moleküler çalışmaların tamamı ve DNA dizi analizleri Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (MOBAM) yapılmıştır.

a) DNA İzolasyonu

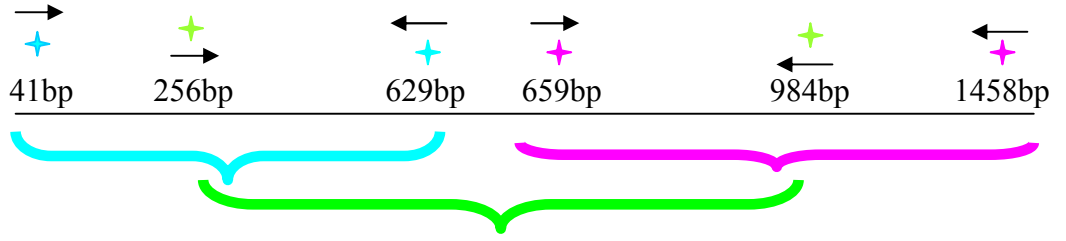
2 kez aktiflenip yıkanmış bakteriler Fermentas Genomic DNA Purification Kit'i ile izole edilmiştir. Take3 nanodrop cihazı (BIOTEK) ile DNA'ların miktar ve saflıkları hesaplanmıştır. A_{260}/A_{280} değeri 1,8 - 2,1 olan örneklerle çalışılmıştır.

b) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Elde edilen DNA'ların 16S rDNA sekansları Prof. Dr. Belma Aslım tarafından tasarlanan *Propionibacterium* spp.'ler için özgü 3 primer (BASP 210-211, BASP 131-132 ve BASP 501-502) ile çalışılmıştır (Çizelge 3.3). Üç primerin birleştirilmesi ile toplamda 1417 bp uzunluğunda bir bölge çoğaltılmıştır. Çoğaltılan bölge Şekil 3.1 ile şematize edilmiştir. Saflığı (OD 260/280) 1,8 - 2,1 olan DNA'lardan, DNA miktarı 20 ng/µl olacak şekilde PCR yapılmıştır (Verity thermal cycler, Applied Biosystems). PCR ürünleri elektroforez ile görüntülemeye alınmış hemen çalışılmayacak örnekler -20°C'ye kaldırılmıştır.

Çizelge 3.3. Primer sekansları, optimal annealing sıcaklıkları ve hedeflenen bölgeler

Primerler	Dizi	Tm sıcaklığı (°C)	Çoğaltılan Bölge
✦ BASP 210 (upper) ✦ BASP 211 (lower)	5'- GGC GTG CTT AAC ACA TGC AAG-3' 5'- TTC ACT TCC GAC GCG ATC AAC-3'	59,8 59,8	588 bp
✦ BASP131 (upper) ✦ BASP132 (lower)	5'- ATG GAC TCG CGG CCT ATC AGC-3' 5'- CAT GCT CCG CCG CTT GTG C-3'	60,0 62,1	728 bp
✦ BASP 501 (upper) ✦ BASP 502 (lower)	5'- CGA TAC GGG TTG ACT TGA GGA AG-3' 5'- CAT GAC TTG ACG GGC GGT GTG-3'	58,6 60,2	799 bp



Şekil 3.1. Propiyonibakteriler için tasarlanmış 3 primer ile çoğaltılan toplam bölgenin şematize görüntüsü

c) PCR Ürünlerinin Elektroforezi

PCR ürünleri % 2' lik agaroz jelde, 1x TAE (Tris Asetat) tamponu kullanılarak yürütülmüştür. Jeller Bio Spectrum Imaging System, Model 310 (UVP) cihazı ile görüntülenmiş ve bantlar fotoğraflanmıştır.

d) DNA Dizi Analizi

Sekans analizi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (MOBAM), Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) cihazı ile yapılmıştır. Analiz sonuçları blast fonksiyonu ile NCBI DNA Gen Bankası'nda taranarak moleküler tanımlama yapılmıştır.

3.2.4. Bakterilerinin konjuge linoleik asit (KLA) sentezleme yeteneğinin belirlenmesi

Bakterilerinin besiyortamına eklenen linoleik asitten (LA), konjuge linoleik asit sentezlemesinin belirlenmesinde Oh ve ark. (2003)'ün metodu kullanılmıştır. LA ana stoğunun (30 mg/ml) hazırlanması için, 150 mg linoleik asit 5 ml distile suda % 2 ml Tween 80 eklenerek çözülüp 0,45 µm'lik filtreden geçirilmiştir. Hazırlanan stoktan 0,5 mg/ml olacak şekilde besiyerlerine eklenmiştir. İki kez aktiveleştirilmiş izolatların yoğunluğu OD 600 nm ≈ 0,600 olacak şekilde ayarlanmış ve linoleik asit içeren uygun sıvı besiyerine % 2 oranında inoküle edilerek inkübasyona

bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda sentezlenen konjuge linoleik asit miktarının belirlenebilmesi için Barrett ve ark. (2007)'nin spektrofotometrik yöntemi kullanılmıştır. Örnekler 13,000 rpm' de 15 dk. santrifüj edilip 1ml süpernatant alınmıştır. Alınan 1 ml süpernatantın üzerine 2 ml isopropanol eklenip vortekslenmiştir. 30 saniye sonra 1,5 ml n-heksan eklenip vortekslenip 30 saniye beklenmiştir. Üst tarafta oluşan oluşan heksan tabakası 233 nm'de spektrofotometrik (Digilab Hitachi U-1800) olarak körve karşı okunmuştur.

Konjuge linoleik asit (KLA) üretim miktarlarını belirlemek için ticari KLA kullanılmıştır. 20 - 160 µg/ml arasında değişen oranlarda ticari KLA kullanılarak standart bir eğri çıkarılmıştır. Bu standarda göre örneklerin KLA sentezleme miktarları µg/ml olarak belirlenmiştir.

3.2.5. Konjuge linoleik asit (KLA) sentezinin optimize edilmesi

Bakteriler tarafından sentezlenen KLA miktarının arttırılabilmesi için inkübasyon süresi, sıcaklık, pH, linoleik asit miktarı ve inülin prebiyotiği gibi parametrelerde denemeler yapılmıştır. İnülin (Sigma) prebiyotiğinin bakterilerin gelişimine etkisini Kaplan'ın (2000) metodunda modifikasyonlar yapılarak çalışılmıştır. % 5 oranında inülin ilave edilmiş uygun besiyerine, OD 600 nm ≈0,600 ayarlanmış bakterilerden % 2 ekilerek inkübasyona bırakılmış, inkübasyon sonrasında OD 600nm'de optikal yoğunluğu ölçülerek inülin içermeyen ortam ile mukayese edilmiştir.

3.2.6. Bakterilerin kolesterol giderim yeteneğinin belirlenmesi

Kolesterol giderimi miktarlarının belirlenmesinde Gilliland ve ark. (1985) tarafından modifiye edilen Rudel ve Morris (1973) 'in "o-fitalaldehit" metodu, üzerinde bazı değişiklikler yapılarak kullanılmıştır. 30 ml sıvı besiyerlerine 100 µg/ml olacak şekilde kolesterol eklenmiştir. Konjuge linoleik asidin etkisinin belirlenmesi için kolesterollü besiyerlerinin bir kısmına linoleik asit eklenmiştir. İki kez aktifleştirilmiş kültürler OD 600 nm ≈0,600'e ayarlanıp % 2 oranında inoküle edilerek, her bakteri kendi için uygun koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Bakteri

ekilmemiş 100 µg/ml oranında kolesterol içeren ve 100 µg/ml oranında kolesterol ve 500 mg/ml LA içeren sıvı besiortamları kontrol olarak kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler 10,000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucunda elde edilen berrak kısma serbest hücre ekstraktı (SHE) adı verilmiştir. Hücre pelleti orijinal besiortamına eşit hacimde distile su ile süspanse edilmiştir. SHE ve distile su ile süspanse edilen hücre pelletindeki kolesterol miktarının belirlenmesi için örneklerden 0,5 ml alınarak temiz tüplere dağıtılmıştır. Örneklerin üzerine 3 ml % 95'lik etanol eklenerek iyice karıştırılmıştır. Daha sonra örneklere 2 ml % 50'lik potasyum hidroksit (KOH) eklenip karıştırılmıştır. Örnekler 10 dk 60°C'lik su banyosunda bekletilip ve ardından soğutulmuştur. Soğuyan örneklerin üzerine 5 ml hekzan eklenerek 20 sn boyunca vorteks ile iyice karışması sağlanmıştır. Örneklerin üzerine 3 ml distile su eklenerek tekrar karıştırılmıştır. Fazların ayrımını sağlamak için örnekler oda sıcaklığında 15 dk bekletilmiştir. Fazların ayrılması sonucunda üst kısımda oluşan hekzan tabakasının 2,5 ml'si temiz test tüplerine alınmıştır. Tüplerdeki hekzan tamamen buharlaşana kadar örnekler 60°C'lik su banyosunda bekletilmiştir. Hekzan tamamen uçtuktan sonra her bir tüpün üzerine 4 ml o-fitalaldehit çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir (o-Fitalaldehit çözeltisi; 0,5 mg o-phthaldialdehyde /1 ml glasiyel asetik asit). Sonra yavaşça 2 ml sülfürik asit eklenerek vorteks ile iyice karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 10 dk bekletildikten sonra örnekler 550 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür [Somkuti ve Johnson,1990; Önal, 2010].

Kolesterol giderimi miktarlarını belirlenmesi için 10–150 µg/ml arasında değişen oranlarda kolesterol etil alkolde çözülerek standart bir eğri çıkarılmıştır. Bu standarda göre örneklerdeki kolesterol miktarları µg/ml olarak belirlenmiştir.

Suşların % kolesterol giderimi değerleri hesaplaması

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

A: Kolesterolün giderimi (%).

B: İnokülasyon yapılan besiortamındaki kolesterol miktarı (µg).

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

3.2.7. Bakterilerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi

Bakterilerinin antioksidan etkinliğinin belirlenebilmesi için;

a) 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini giderme etkisi [Blois, 1958; Lin, 2000 metotlarında modifikasyon yapılarak]

b) Fe^{+2} iyonu şelatlama aktivitesi [Decker ve Welch, 1990]

c) Plazma lipid peroksidasyonunun inhibe edilmesi [Rodriguez ve Ruiz, 1992] çalışılmıştır.

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini giderme etkisinin belirlenmesi

İki kez aktifleştirilmiş kültürler OD 600 nm \approx 0,600'e ayarlandıktan sonra linoleik asit eklenmiş ve linoleik asit eklenmemiş sıvı besiyerine aktarılıp uygun koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örnekler PBS ile 13,000 rpm'de 15 dakika 2 kere yıkanmıştır. Yıkanmış pellet 10 ml PBS içerisinde McFarland 5'e (11 log cfu/ml) ayarlanıp 13,000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant dökülüp pellet 1 ml PBS ile süspanse edilmiştir. Süspanse edilen örneklerin üzerine 1 ml DPPH eklenerek, örnekler karanlık ortamda 30 dakika bekletilmiştir. Bekleme sonunda örnekler 13,000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatantlar 517 nm'de spektrofometrik olarak ölçülmüştür [Blois, 1985; Lin ve Ghang, 2000]. LA içeren deney grubunun kontrolü LA'lı ortam ile yapılmıştır.

Demir (Fe^{+2}) iyonu şelatlama aktivitesinin belirlenmesi

İki kez aktifleştirilmiş kültürler OD 600 nm \approx 0,600'e ayarlandıktan sonra linoleik asit eklenmiş ve linoleik asit eklenmemiş sıvı besiyerine aktarılıp uygun koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örnekler PBS ile 13,000rpm'de 15 dakika,2 kere yıkanmıştır. Yıkanmış pellet 10 ml PBS içerisinde McFarland 5'e (11 log cfu/ml) ayarlanıp 13,000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası 562

nm'deki absorbansı PBS içeren körve karşı okunmuştur. Demir iyonu şelatlama yüzdesi; $1 - \frac{OD2}{OD1} \times 100$ formülüne göre hesaplanmıştır. (OD2: kontrol; OD1: örnek). Deney; 3 tekrarlı, 2 paralelli yapılmıştır [Decker ve Welch, 1990]. LA içeren deney grubunun kontrolü LA'lı ortam ile yapılmıştır.

Plazma lipid peroksidasyonunun inhibe edilmesinin belirlenmesi

Çalışma Rodriguez-Martinez ve Ruiz Torres'in (1992) önerdiği metoda göre yapılmıştır. Linoleik asit içeren ve içermeyen sıvı besiyerinde geliştirilen kültürlerin yoğunluğu PBS içerisinde McFarland 5'e (11 log cfu/ml) ayarlanmıştır. Süpernant ve yoğunluğu ayarlanan bakterilerden 400 µl alınarak, 400µl plazma, 100 µl FeSO₄ ve 100 µl hidrojen peroksit (H₂O₂) içeren ortamda 12 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında yapay oksidan olan butilhidroksitoluen (BHT) ortama eklenmiş ve buzda bekletilmiştir. İndikatör tiobarbitürik asit (TBA) eklenip 100°C su banyosunda 30 dk bekletilmiş ve soğuduktan sonra 532 nm dalga boyunda spektrofometrik olarak okunmuştur. LA içeren deney gruplarının kontrolleri de LA'lı ortam ile yapılmıştır.

3.2.8. Bakterilerin adezyon yeteneğinin belirlenmesi

Bakterilerde yapılabilecek tüm hücre çalışmaları Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (MOBAM), Hücre Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda kullanılan tüm hücreler MOBAM hücre kültür koleksiyonundan sağlanmıştır.

Hücreler Madde 3.1. anlatıldığı gibi geliştirilmiştir. Kültür kaplarında % 80 yayılma gösteren hücreler Tripsin/EDTA çözeltisi ile kaldırılarak sayılmış ve içinde lamel bulunan 6 kuyulu mikropklara 4×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde aktarılmıştır. Gelişen hücrelerin üzerine LA içeren (KLA) ve içermeyen (kontrol) ortamda geliştirilmiş bakterilerin McFarland 5'e (11 log cfu/ml) ayarlanmış süspanse bakteri pelletinden eklenerek inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücreler giemsa

boyası ile boyanıp fazla boyanın gitmesi için PBS ile yıkanmıştır. Lameller kuyulardan çıkarılarak kurumaya alınmıştır. Tutunma kapasitesi ışık mikroskopunda 2 paralel preparatta, ayrı ayrı 100 farklı alanda yapılan sayımın ortalama değerinin hesaplanması ile belirlenmiştir [Morita ve ark., 2002].

3.2.9. Bakterilerin antikanserojenik etkisinin belirlenmesi

Bakterilerin antikanserojenik yeteneklerinin belirlenmesinde tripan mavisi ile boyama yöntemi kullanılmıştır. Yöntem hücrelerin tripan mavisi ile muamele edildiğinde ölü hücrelerin maviye boyanması esasına dayanmaktadır.

Hücreler Madde 3.1. anlatıldığı gibi geliştirilmiştir. % 80 - 90 yayılma gösteren hücreler tripsin/EDTA ile kaldırılarak sayımları yapılmış ve her kuyuda 2×10^5 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu mikrolakalara alınıp gelişmeye bırakılmıştır. Hücreler yayılma gösterdikten sonra LA içeren ve içermeyen (kontrol) ortamda geliştirilmiş bakterilerin yoğunluğu McFarland 5'e (11 log cfu/ml) ayarlanmıştır pellet süspansiyonları ve süpernatantlar ile muamele edilerek 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında kuyulara 50 µl % 0,4 tripan mavisi çözeltisi eklenmiş ve 15 dk 37°C'de % 5 CO₂'li ortamda inkübe edilerek ölü hücreler boyanmıştır. Fazla boya soğuk PBS ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Hücreler 200µl % 10 SDS ile lizis edilerek 590 nm dalga boyunda EPOCH mikrolaka okuyucuda (BIOTEK) analiz edilmiştir. Bakteri kültürleri ile muamele edilmemiş hücreler, kontrol grubu olarak % 100 canlı olarak kabul edilmiş ve sonuçlar bu hesaplamalar üzerinden yapılarak yüzde (%) olarak verilmiştir [Peres ve ark., 2009]. LA içeren deney grubunun kontrolü LA'lı ortam ile yapılmıştır.

3.3. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizlerde SPSS Inc. Software (16.0 Versiyonu; SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılmıştır. Öncelikle örneklerin normal bir dağılıma sahip olup olmadığı tek örneklili Kolmogorov-Smirnov testi ile belirlenmiştir. Daha sonra KLA sentezinde kullanılan linoleik asit ve ayçiçeği yağı arasında, antikanserojenik etki ve adezyon

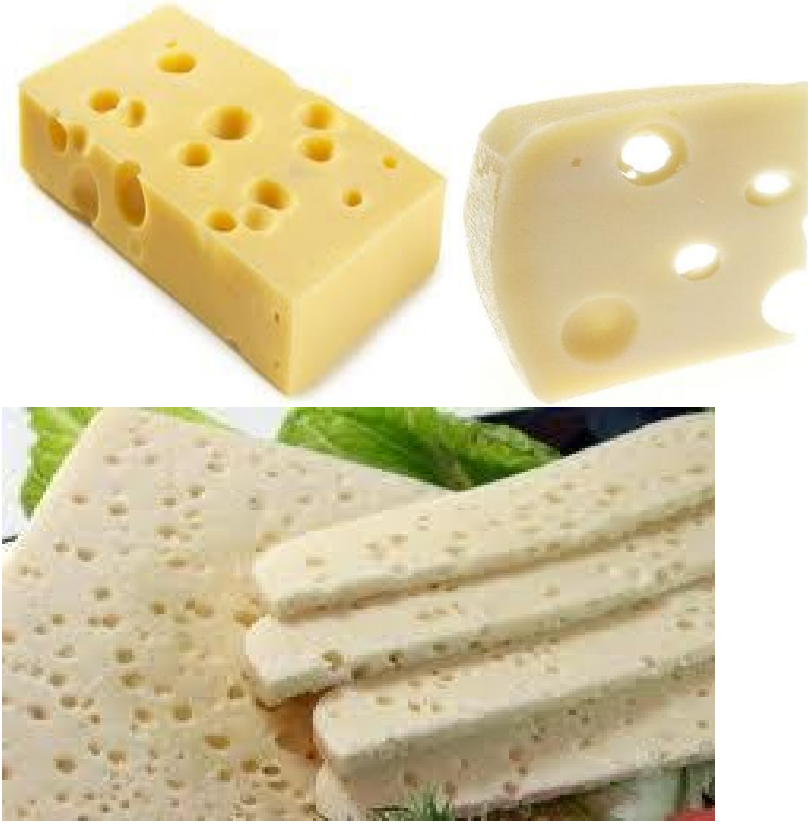
yeteneğinde kullanılan Caco-2 ve CCL-221 hücre hatları arasında, optimizasyon çalışmalarında kullanılan parametrelerdeki artışlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığını belirleyebilmek için parametrik testlerden çift örnekli T testi, nonparametrik testlerden ise Wilcoxon işaret sıra testi ve Friedman testi kullanılmıştır. Pearson'un korelasyonuna göre, pH-yüzde asitlik, sıcaklık-KLA sentezi, pH-KLA sentezi, KLA sentezi-kolesterol giderimi, KLA sentezi-adezyon, KLA sentezi-antikanserojenik etki arasında korelasyon olup olmadığı incelenmiştir.

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. Propiyonik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Bu çalışmada Türkiye'nin farklı yerlerinden temin edilmiş, delikli yapıya sahip 78 adet peynirden YELN agar besiyerine ekim yapılmıştır. İzolatların koloni morfolojileri, gram boyamaları ve ışık mikroskopisindeki hücre morfolojileri incelenerek ilk seçimleri gerçekleştirilmiştir. Peynirlerin gramındaki *Propionibacterium* spp. miktarları hesaplanmıştır. Toplamda 32 tane propiyonik asit bakterisi izole edilmiştir. İzolasyon yapılabilen peynirler, izole edilen suşların kodları ve koloni sayımları (\log_{10} cfu/g) Çizelge 4.1'de verilmiştir.

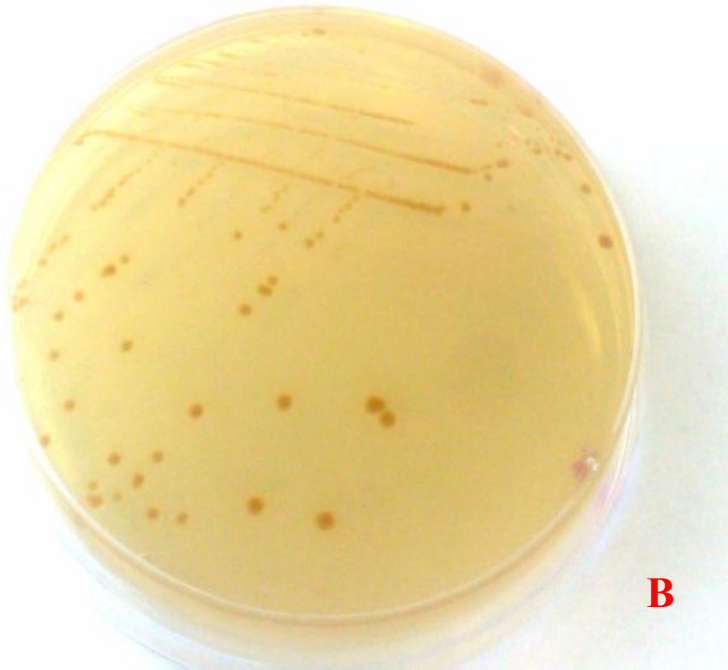
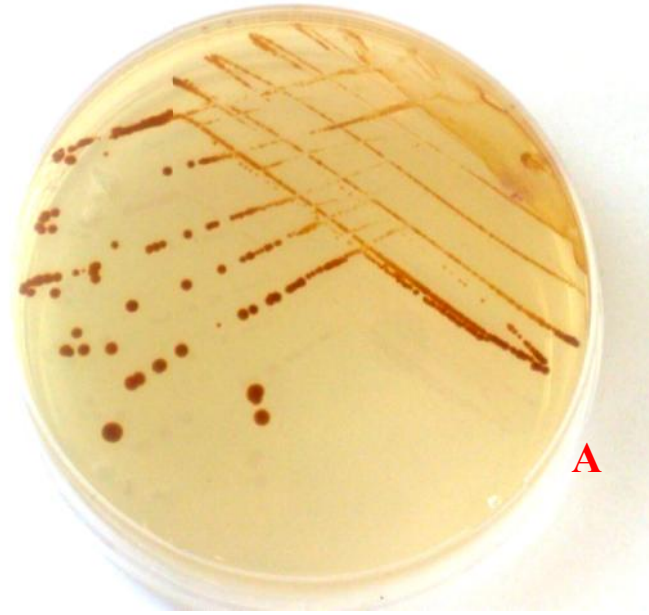
Farklı köy ve kasabalardan temin edilen 78 çeşit peynirden sadece 24 tanesinden propiyonik asit bakterisi izole edilebilmiştir. İzolasyon yapılmak istenilen diğer peynirlerde ağırlıklı olarak maya ve laktobasil bulunmuştur, propiyonik asit bakterisine rastlanılamamıştır. Ağırlıklı olarak İzmir ve Balıkesir'den temin edilen peynirlerden izolasyon yapılabilmiştir. Kalecik köy peynirleri, İzmir köy, İzmir teneke tulum ve Kırşehir künefe peynirlerinden birden fazla propiyonik asit bakterisi izole edilirken diğer peynirlerden birer izolasyon yapılabilmiştir. Koloni morfolojilerinde ufak farklılıklar bulunmakla birlikte izole edilen bu suşlar aynı tür bulunmuştur. Aynı morfolojiye sahip kolonilerden tek izolat alınmıştır. Peynir örneklerindeki propiyonibakter canlılık miktarları (\log_{10} cfu/g) YELN besi ortamında $2,58 \pm 0,1 - 7,25 \pm 0,07$ arasında bulunmuştur (Çizelge 4.1).



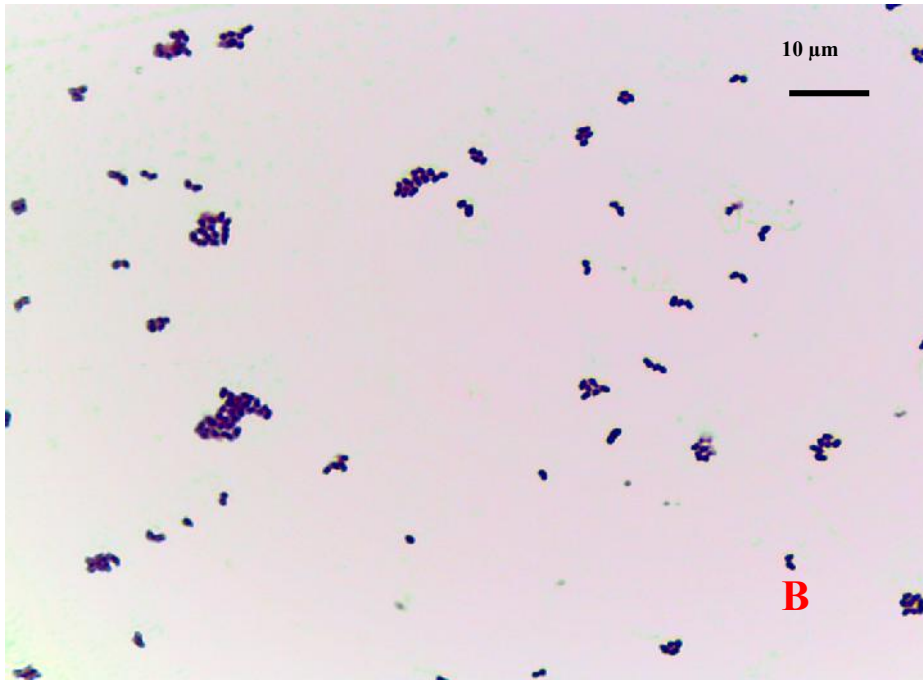
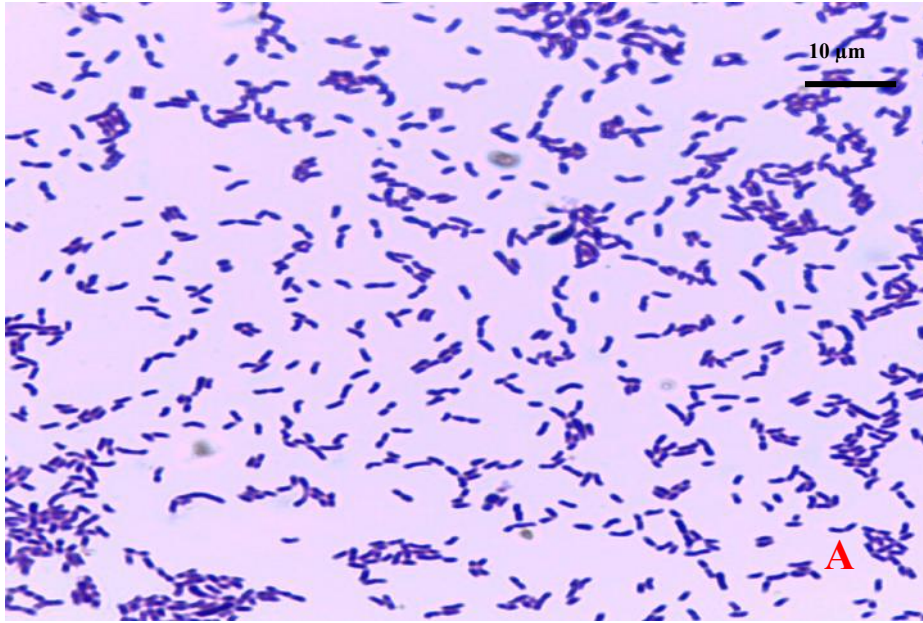
Resim 4.1. Delikli yapıya sahip peynir örnekleri;Swiss peyniri, Emmental peyniri ve Mihaliç kelle peyniri [www.lawyersandsettlements.com ;www.itusozluk.com; www.scn.wikipedia.org].



Resim 4.2. 10 numaralı Kırşehir künefe peyniri



Resim 4.3. *Propionibacterium* spp. kültürlerinin YEL agardaki koloni morfolojileri. a) *P. thoenii* S72 b) *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* S28



Resim 4.4. *Propionibacterium* spp. kültürlerinin ışık mikroskopundaki morfolojileri.
a) *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* S28 b) *Propionibacterium thoenii* S72

Çizelge 4.1. *Propionibacterium* spp. izolasyonu yapılan peynirler, izole edilen suşların kodları ve koloni sayımları (\log_{10} cfu/g)

Peynir No	Çalışılan peynir örnekleri	İzolat Adedi ve Kodu	<i>Propionibacterium</i> spp. (\log_{10} cfu/g)
6	Sepet mihalıç peyniri	1: S6	3,80 ± 0,14
10	Kırşehir künefe peyniri	2: S10-1, S10-2	4,60 ± 0,16
21	Edremit sepet peyniri	1: S21	3,45 ± 0,21
24	Elazığ köy peyniri	1: S24	3,94 ± 0,14
28	Bolu köy peyniri	1: S28	4,69 ± 0,12
30	Kalecik köy peyniri	3: S30-1, S30-2, S30-3, S30-6	7,25 ± 0,07
31	Kalecik köy peyniri (olgun)	2: S31-3, S31-4	4,06 ± 0,08
39	Balıkesir sepet peyniri	1: S39	2,81 ± 0,05
40	Balıkesir Manyas peyniri	1: S40	3,69 ± 0,30
41	İzmir keçi peyniri	1: S41	2,72 ± 0,34
43	İzmir köy peyniri	3: S43-3, S43-4, S43-5	5,17 ± 0,08
45	Bergama tulum peyniri	1: S45	3,65 ± 0,07
56	İzmir teneke tulum peyniri(yağlı)	2: S56-2, S56-3	5,16 ± 0,04
57	İzmir köy peyniri	1: S57	4,32 ± 0,12
58	İzmir tulum peyniri	1: S58	3,64 ± 0,25
61	İzmir keçi peyniri	1: S61	2,58 ± 0,19

Çizelge 4.1. (Devam) *Propionibacterium* spp. izolasyonu yapılan peynirler, izole edilen suşların kodları ve koloni sayımları (\log_{10} cfu/g)

Peynir No	Çalışılan peynir örnekleri	İzolat Adedi ve Kodu	<i>Propionibacterium</i> spp. (\log_{10} cfu/g)
63	Mersin kelle peynir	1: S63	4,11 ± 0,20
71	Çorum tulum peyniri	1: S71	3,56 ± 0,06
72	Çorum kelle peyniri (tuzsuz)	1: S72	5,12 ± 0,03
73	Çorum Karasığır köy peyniri	1: S73	5,89 ± 0,21
75	Afyon teneke peyniri	1: S75	6,34 ± 0,33
76	İzmir teneke tulum peyniri	1: S76	5,23 ± 0,12
77	İzmir tulum peyniri	1: S77	3,12 ± 0,10
78	Kars gravyer peyniri	1: S78	4,75 ± 0,09

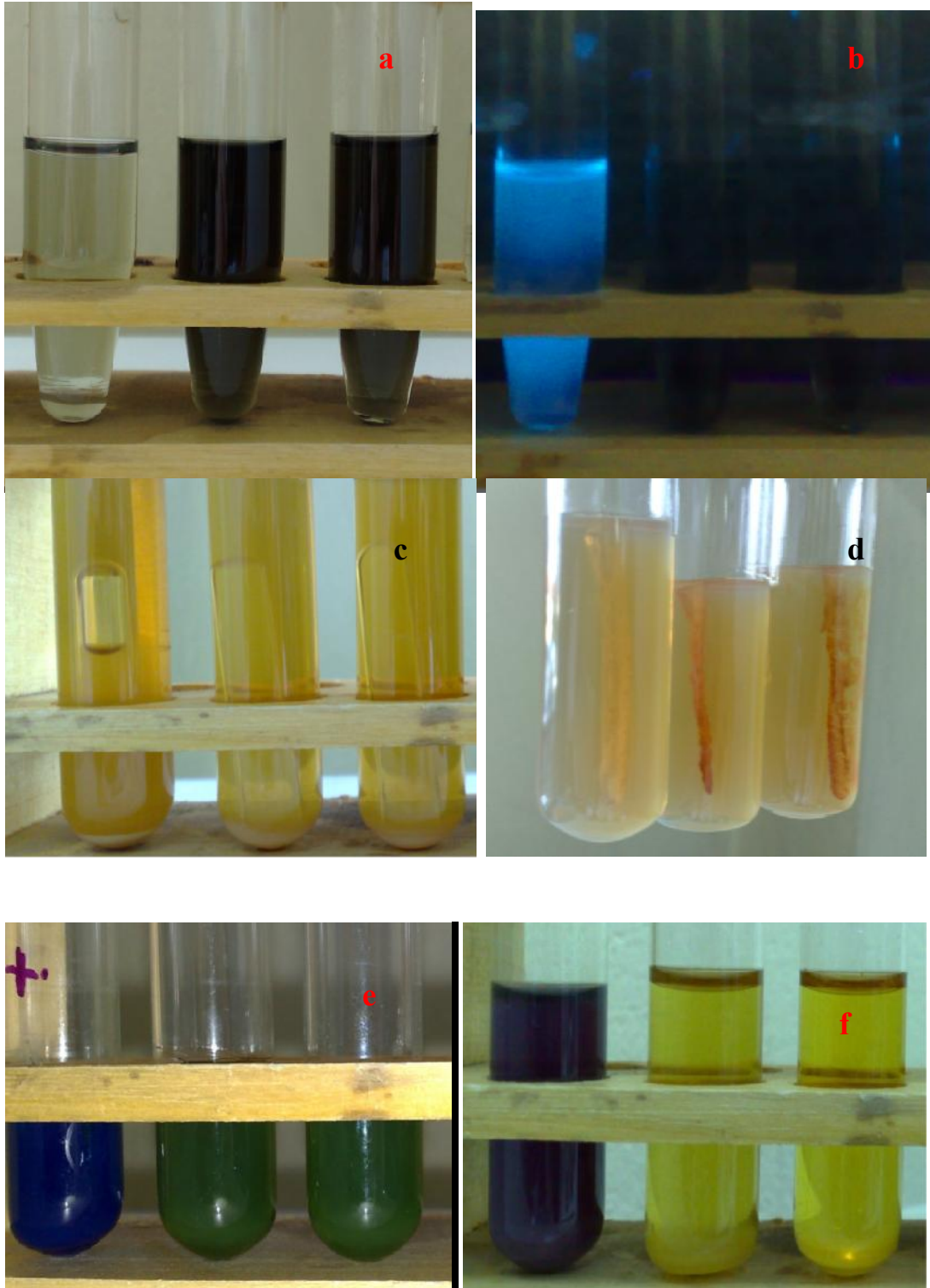
4.2. Peynirlerden İzole Edilen Propiyonik Asit Bakterilerinin Tanımlanması

Delikli yapıya sahip el yapımı peynirlerden koloni ve ışık mikroskobu morfolojilerine göre 32 adet *Propionibacterium* spp. izole edilmiştir. Seçilen izolatlara ön doğrulama için katalaz ve oksidaz testleri yapılmıştır. Bütün suşlar propiyonibakterilerde karakteristik olan katalaz (+) ve oksidaz (-) bulunmuştur. Propiyonik asit bakterileri pleomorfik karakter gösterdiği için testler 3 tekrarlı yapılmış, sonuç olarak ortalamalar alınmıştır.

4.2.1. Klasik tanımlanmaların değerlendirilmesi

32 adet *Propionibacterium* spp. izolatının klasik tanımlamaları için 23 adet şeker testi ve fizyolojik-biyokimyasal testler uygulanmıştır (Resim 4.5). Bütün izolatlar % 2 NaCl içeren ortamda gelişebildiği görülmüştür. Birkaç izolat hariç çoğu suş % 4

- 6,5 NaCl içeren ortamda da gelişebilmiştir. Bütün izolatlarda arjinin hidrolizi, sitrat kullanımı, indol üretimi, H₂S üretimi ve hareketlilik olmadığı görülmüştür. Şeker testlerinde bütün izolatlar arabinoz, L-ksiloz, sorboz, inülin, nişasta şekerlerini kullanamadığı görülmüştür. Eritrol, glikoz, galaktoz, mannoz, eskülin şekerleri bütün izolatlarca kullanılmıştır. Diğer şekerlerin fermentasyonu ve biyokimyasal testlerden glukozdan gaz oluşturma, nitrat redüksiyonu türlere göre farklılık göstermiştir. Sonuçlar Bergey's Manual of Determinative Bacteriology esas alınarak değerlendirilmiştir. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology alttür düzeyine inmeden klasik propiyonibakterileri *P. freudenreichii*, *P. jensenii*, *P. acidipropionici* ve *P. thoenii* olmak üzere 4 tür altında toplamıştır. *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii* ve *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* arasındaki farkın nitrat redüksiyonu ve laktoz fermentasyonu olduğu söylenmiştir. Bu bilgilere göre *P. freudenreichii* bulunan 28 adet suşun 4 tanesi (S6, S10-1, S10-2 ve S77) *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii*, geriye kalan 24 tanesi *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* olarak tanımlanmıştır. Diğer suşlardan 1 adedi *P. jensenii* (S71), 2 adedi *P. acidipropionici* (S73 ve S75) ve 1 adedi *P. thoenii* (S72) olarak tanımlanmıştır. Bergey's esas alınarak yapılan değerlendirmede homoloji % 60 - 86 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3).



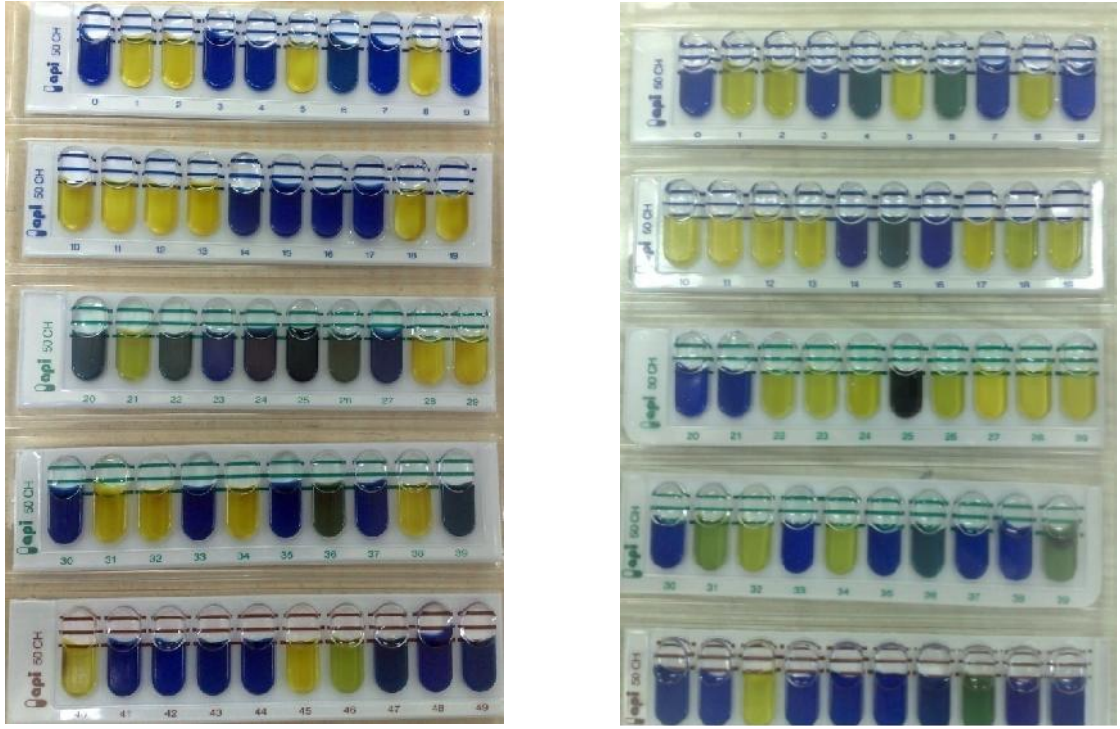
Resim 4.6. Klasik tanımlamada kullanılan bazı biyokimyasal testler. a) Eskülin hidrolizi b) Eskülin hidrolizinin UV 234 nm'de görüntülenmesi c) Glukozdan gaz üretimi d) Hareketlilik e) Sitrat kullanımı f) Lizin dekarboksilaz

4.2.2. İleri biyokimyasal tanımlanmaların değerlendirilmesi

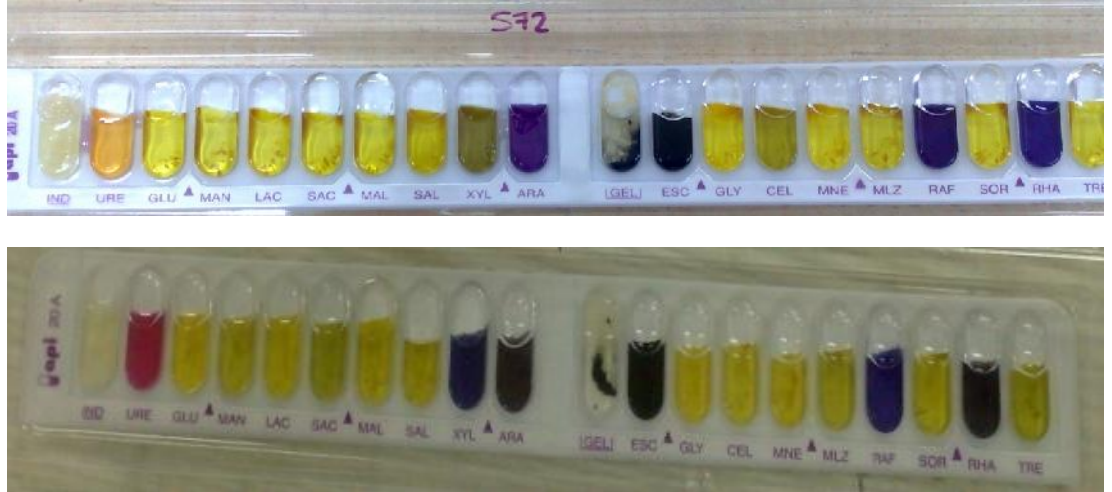
İzolatların ileri biyokimyasal tanımlamaları API test kitleri; API 50CH, API 20E ve API 20A kullanılıp (API Sistem, Bio-Merieux, France) değerlendirmeleri DSMZ kültürüne ait standartlara (Çizelge 4.2) göre NTSYSpc 2.0 programıyla yapılmıştır. API 50CH kitinde kullanılan indikatörlü besiyemi karbon kaynağı içermemektedir. 50 adet kuyunun her birinde negatif kontrol hariç, karbon kaynağı olarak kullanılabilen 49 adet şekerden 1 tanesi bulunmaktadır. Test bakterinin bu şekerleri fermente edip edemediği ayrımını esas almaktadır. Bakteri şekeri fermente edebildiğinde gelişebilecek ve mor besiyemi sarıya dönüşecektir. Mor kalanlar negatif, sarıya dönenler pozitif, yeşilimsi kalanlar kısmi pozitif-negatif olarak belirlenmiştir. API 20E (Resim 4.8) ve 20A (Resim 4.7) kitlerinde, 50CH (Resim 4.6) kitinden farklı olarak şekerlerin yanı sıra biyokimyasal testler de bulunmaktadır. (EK 1: API kit içerikleri). Standart DSMZ kültürlerin API sonuçları ile izolatların API sonuçları aralarındaki yakınlık uzaklık bakımından değerlendirilmiştir. Homoloji % 56 - 88 arasında bulunmuştur. *P. freudenreichii* hariç diğer türlerin % homoloji olarak farklılıklar göstermekle birlikte Bergey's ile uyumlu olduğu görülmüştür. Farklı olarak *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* alttürüne hiç rastlanılmamış, bütün izolatlar *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii* olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 4.2. *Propionibacterium* DSMZ standart kültürleri

	Referans kodu	Tür
1	DSMZ 20235	<i>P. jensenii</i>
2	DSMZ 20270	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>
3	DSMZ 20271	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i>
4	DSMZ 20272	<i>P. acidipropionici</i>
5	DSMZ 20276	<i>P. thoenii</i>



Resim 4.7. API CH 50 sonuçları. *P.thoenii* S72, *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii* S28



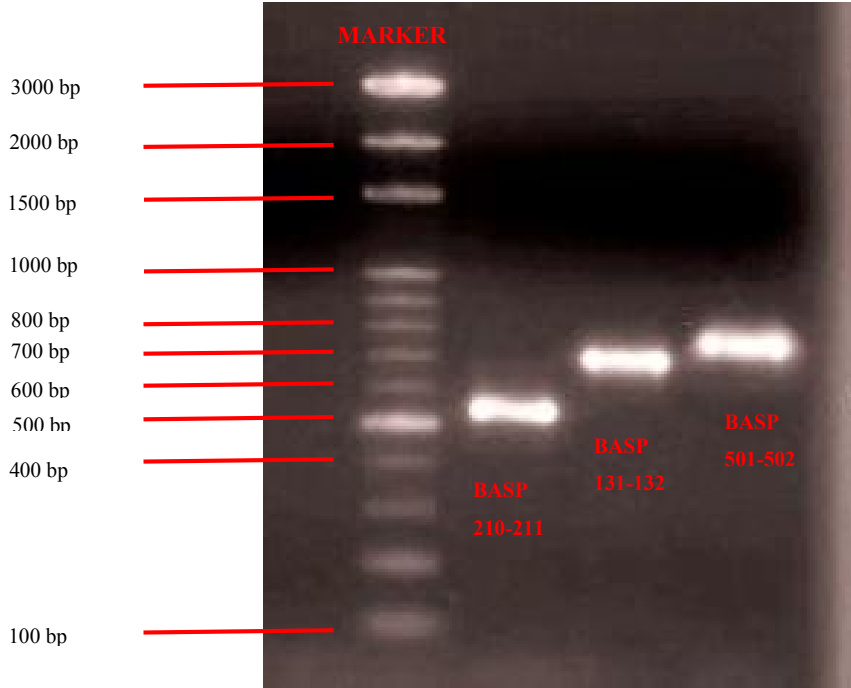
Resim 4.8. API 20A sonuçları. *P.thoenii* S72, *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii* S28



Resim 4.9. API 20E sonuçları. *P.thoenii* S72, *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii* S28

4.2.3. Moleküler tanımlama sonuçlarının değerlendirilmesi

2 kez aktiflenip yıkanmış bakterilerin DNA'ları, Fermentas Genomic DNA Purification Kit'i ile izole edilmiştir. *Propionibacterium* spp.'ler için tasarlanmış 588, 728 ve 799 bp'lik 3 farklı primer ile PCR yapılmış, PCR ürünleri 100 bp' lik marker (GM100, 100 bp DNA ladder) ile yürütülmüştür. Elektroforez sonrası bantlar görüntülenmiştir. İzole edilen suşlar her 3 primerde sonuç vermiştir (Resim 4.9). Elektroforezde görüntülenen PCR ürünlerinin temizlemesi ve dizi analizleri yapılmıştır (MOBAM). Analiz sonuçları NCBI DNA Gen Bankası'nda her bölge için ayrı ayrı ve 3 bölge toplam birleştirilerek 1417 bp uzunluğunda bir alan taranmıştır. Ayrı ayrı taranan ve 3 bölge birleştirilerek bakılan sonuçlar aynı çıkmış olup 3 bölgedeki benzerlik yüzdesi daha yüksek bulunmuştur. *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* olarak tanımlanan suşlar BASP 131/132 primeri ile % 96 - 99 NR_036972.1 *P. freudenreichii* ssp. *shermanii*, üç primer birleştirildiğinde % 98 - 99 Y10819.1 *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* olarak bulunmuştur. Sonuçlar içinde *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii* kültürüne hiç rastlanılmamıştır.

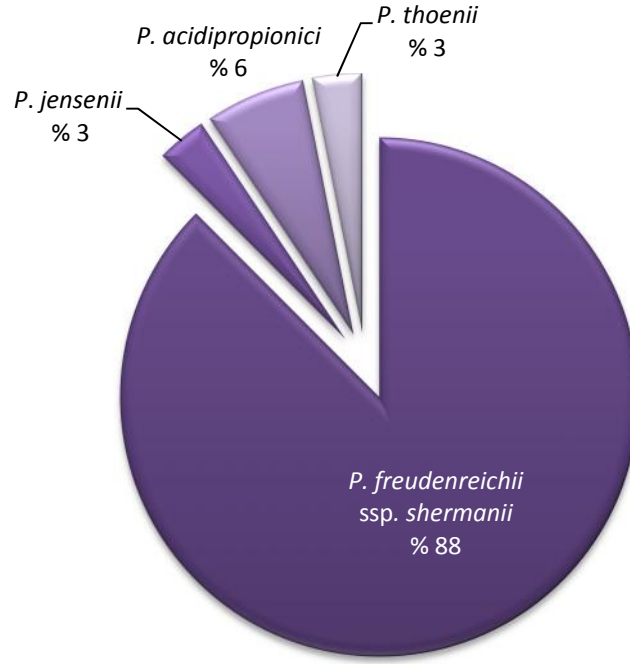


Resim 4.10. *Propionibacterium* spp.' ler için tasarlanmış 3 primerle çoğaltılan PCR ürünleri ve molekül ağırlıkları (BASP 210-211: 588 bp, BASP 131-132: 728 bp ve BASP 501-502: 799 bp).

Moleküler tanımlama sonuçları, biyokimyasal tanımlama sonuçları ile tür bazında uyumlu olup alttürde farklılık göstermiştir. API sonuçlarına göre *P. freudenreichii* ssp. *freudendreichii* olarak tanımlanan türler moleküler tanımlamada *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* (% 96 - 99) olarak tanımlanmıştır. Moleküler tanımlamadaki homoloji daha yüksek olduğundan bu türler *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* olarak kabul edilmiştir. Buna göre izolatlardan 28 adedi *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* (% 88), 1 adedi *P. jensenii* (% 3), 2 adedi *P. acidipropionici* (% 6) ve 1 adedi *P. thoenii* (% 3) olarak kabul edilmiştir. *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii*' ye rastlanılmamıştır. Tanımlama sonuçları Çizelge 4.3' te verilmiştir (EK 2: Sekans dizileri, S28, S72).

Aynı peynirlerden alınan suşlar tür olarak aynı bulunmuştur. Farklı türlere ağırlıklı olarak Çorum peynirlerinde rastlanılmıştır. *P. thoenii* S72, 72 numaralı Çorum kelle (tuzsuz) peynirinden, *P. jensenii* S71, 71 numaralı Çorum tulum peynirinden ve *P.*

acidipropionici S73 ve S75, 73 numaralı Çorum Karasığır köy peynirinden ve 75 numaralı Afyon teneke peynirinden izole edilmiştir.



Şekil 4.1. Peynirden izole edilen *Propionibacterium* spp. türlerinin % dağılımı

Çizelge 4.3. Klasik ve moleküler tanımlama sonuçları ve % homolojileri

Suş	Klasik tanımlama (Bergey's)	İleri biyokimyasal tanımlama (NTSYSpc)	Moleküler tanımlama	
			Tür adı	Gen Bank No
S6	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%60)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i> (%56)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%97)	NR_036972.1
S10-1	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%73)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i> (%86)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%97)	NR_036972.1
S10-2	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%76)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i> (%86)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%97)	NR_036972.1
S21	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%82)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i> (%86)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%98)	NR_036972.1
S24	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%79)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i> (%86)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%98)	NR_036972.1
S28	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%85)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i> (%88)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%98)	NR_036972.1
S30-1	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%79)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i> (%87)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%98)	NR_036972.1
S30-2	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%78)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i> (%88)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%98)	NR_036972.1
S30-3	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%79)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i> (%88)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%98)	NR_036972.1
S30-6	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%81)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i> (%87)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%97)	NR_036972.1
S31-3	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%82)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i> (%82)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%97)	NR_036972.1
S31-4	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%82)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i> (%84)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%97)	NR_036972.1

Çizelge 4.3. (Devam) Klasik ve moleküler tanımlama sonuçları ve % homolojileri

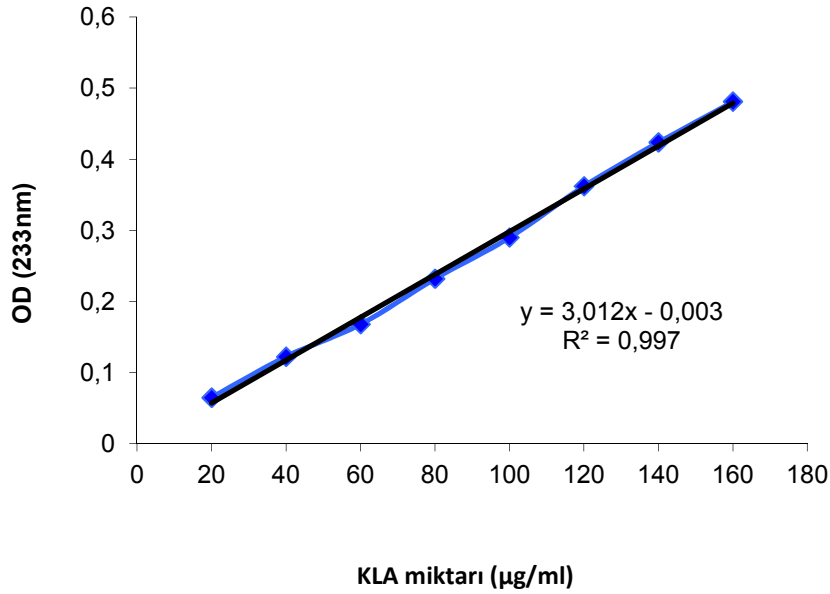
Suş	Klasik tanımlama (Bergey's)	İleri biyokimyasal tanımlama (NTSYSpc)	Moleküler tanımlama	
			Tür adı	Gen Bank No
S39	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%83)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i> (%75)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%96)	NR_036972.1
S40	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%86)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i> (%88)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%98)	NR_036972.1
S41	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%78)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i> (%86)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%99)	NR_036972.1
S43-3	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%80)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i> (%85)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%99)	NR_036972.1
S43-4	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%80)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i> (%85)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%97)	NR_036972.1
S43-5	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%83)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i> (%83)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%97)	NR_036972.1
S45	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%82)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i> (%83)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%98)	NR_036972.1
S56-2	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%85)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i> (%88)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%98)	NR_036972.1
S56-3	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%79)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i> (%81)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%97)	NR_036972.1
S57	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%81)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i> (%75)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%97)	NR_036972.1
S58	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%82)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i> (%88)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%98)	NR_036972.1
S61	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%76)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i> (%88)	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> (%96)	NR_036972.1

Çizelge 4.3. (Devam) Klasik ve moleküler tanımlama sonuçları ve % homolojileri

Suş	Klasik tanımlama (Bergey's)	İleri biyokimyasal tanımlama (NTSYSpc)	Moleküler tanımlama	
			Tür adı	EMBL/ Gen Bank No
S63	<i>P. freudenreichii</i> sp. <i>shermanii</i> (%79)	<i>P. freudenreichii</i> sp. <i>freudenreichii</i> (%87)	<i>P. freudenreichii</i> sp. <i>shermanii</i> (%97)	NR_036972.1
S71	<i>P. jencenii</i> (%85)	<i>P. jencenii</i> (%85)	<i>P. jencenii</i> (%98)	NR_042269.1
S72	<i>P. rhoenii</i> (%86)	<i>P. rhoenii</i> (%88)	<i>P. rhoenii</i> (%99)	X53220.1
S73	<i>P. acidipropionici</i> (%86)	<i>P. acidipropionici</i> (%88)	<i>P. acidipropionici</i> (%97)	FN824489.1
S75	<i>P. acidipropionici</i> (%86)	<i>P. acidipropionici</i> (%88)	<i>P. acidipropionici</i> (%98)	FN824489.1
S76	<i>P. freudenreichii</i> sp. <i>shermanii</i> (%85)	<i>P. freudenreichii</i> sp. <i>freudenreichii</i> (%75)	<i>P. freudenreichii</i> sp. <i>shermanii</i> (%98)	NR_036972.1
S77	<i>P. freudenreichii</i> sp. <i>shermanii</i> (%65)	<i>P. freudenreichii</i> sp. <i>freudenreichii</i> (%88)	<i>P. freudenreichii</i> sp. <i>shermanii</i> (%97)	NR_036972.1
S78	<i>P. freudenreichii</i> sp. <i>shermanii</i> (%60)	<i>P. freudenreichii</i> sp. <i>freudenreichii</i> (%65)	<i>P. freudenreichii</i> sp. <i>shermanii</i> (%97)	NR_036972.1

4.3. KLA Sentezleme Yeteneklerinin Belirlenmesi

Konjuge linoleik asit (KLA) üretim miktarlarını belirlemek için ticari KLA kullanılmıştır. 20 - 160 µg/ml arasında değişen oranlarda ticari KLA kullanılarak standart bir eğri çıkarılmıştır. KLA miktarı, standart eğri esas alınarak µg/ml olarak hesaplanmıştır. KLA standart eğrisi Şekil 4.3' te verilmiştir.



Şekil 4.2. KLA standart eğrisi

Bakterilerin KLA sentezlemeleri madde 3.2.4'te anlatıldığı gibi belirlenmiştir. KLA sentezleme miktarlarını tarama çalışması 500 µg/ml LA ve 10 mg/ml ayçiçeği yağı içeren ortamlarda gerçekleştirilmiştir.

Tüm suşlarda hem LA hem de ayçiçeği yağı içeren ortamda KLA sentezleme gözlenmiş, ancak suşlara bağlı olarak KLA miktarlarında farklılık olduğu belirlenmiştir. LA içeren ortamda sentezlenen KLA miktarları, ayçiçeği içeren ortamdakinden daha fazla bulunmuştur. Suşlar arasında en yüksek KLA sentezi LA içeren ortamda % 30 (150 µg/ml) ile *Bifidobacterium breve* A28'de görülmüştür (Çizelge 4.5).

Bifidobakterilerin KLA sentezleme yetenekleri diğer suşlara oranla daha yüksek bulunmuştur. Laktik asit bakterilerinin KLA sentezleme yetenekleri propiyonibakterilere benzer, bifidobakterilerin ise propiyoniklerden daha iyi olduğu bulunmuştur. LA'lı ortamdaki sentez çok daha yüksek bulunduğu için çalışmanın geri kalan kısımlarında KLA sentezine sadece LA ile devam edilmiştir (Çizelge 4.4).

Propionibakteriler pH 7,2 YEL besiortamında 30°C'de anaerobik olarak 72 saat inkübe edilmiş, 72. saatte KLA miktarı ölçülmüştür. Propionibakterilerin, KLA sentezleme miktarları ayçiçek yağı içeren ortamda yaklaşık % 8 - 12 arası, LA içeren ortamda ise % 14 - 28 arasında tespit edilmiştir. Propionibakteriler içinde en yüksek KLA sentezi *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* S28'de LA'lı ortamda % 28, ayçiçekli ortamda % 12 görülürken, en düşük KLA sentezi *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* S21'de LA'lı ortamda % 14, ayçiçekli ortamda % 8 görülmüştür (Çizelge 4.4)

Çizelge 4.4. *Propionibacterium* spp.'lerin linoleik asit ve ayçiçek yağından % olarak konjuge linoleik asit sentezleme miktarları

Suş kodu	<i>Propionibacterium</i> spp.	KLA sentezleme miktarı (%)*	
		Ayçiçek yağı ^a	Linoleik asit ^b
S6	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	9 ± 1	16 ± 1
S10-1	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	9 ± 1	15 ± 1
S10-2	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	11 ± 1	25 ± 2
S21	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	8 ± 1	14 ± 1
S24	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	9 ± 1	20 ± 1
S28	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	12 ± 1	28 ± 1
S30-1	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	9 ± 1	23 ± 2
S30-2	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	10 ± 1	23 ± 1
S30-3	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	10 ± 1	24 ± 1
S30-6	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	10 ± 1	21 ± 1
S31-3	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	10 ± 1	22 ± 1
S31-4	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	9 ± 1	22 ± 1
S39	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	9 ± 1	18 ± 2

Çizelge 4.4. (Devam) *Propionibacterium* spp.'lerin linoleik asit ve ayçiçek yağından % olarak konjuge linoleik asit sentezleme miktarları

Suş kodu	<i>Propionibacterium</i> spp.	KLA sentezleme miktarı (%)*	
		Ayçiçek yağı ^a	Linoleik asit ^b
S40	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	9 ± 1	14 ± 1
S41	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	10 ± 1	19 ± 1
S43-3	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	9 ± 1	20 ± 1
S43-4	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	10 ± 1	21 ± 1
S43-5	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	10 ± 1	21 ± 1
S45	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	10 ± 1	22 ± 1
S56-2	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	9 ± 1	18 ± 1
S56-3	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	9 ± 1	17 ± 1
S58	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	10 ± 1	22 ± 1
S61	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	8 ± 1	23 ± 1
S63	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	9 ± 1	22 ± 1
S70	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	8 ± 1	17 ± 1
S71	<i>P. jensenii</i>	8 ± 1	23 ± 1
S72	<i>P. thoenii</i>	11 ± 1	25 ± 1
S73	<i>P. acidipropionici</i>	9 ± 1	24 ± 1
S75	<i>P. acidipropionici</i>	8 ± 1	22 ± 1
S76	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	8 ± 1	20 ± 1
S77	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	9 ± 1	19 ± 2
S78	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	9 ± 1	14 ± 1

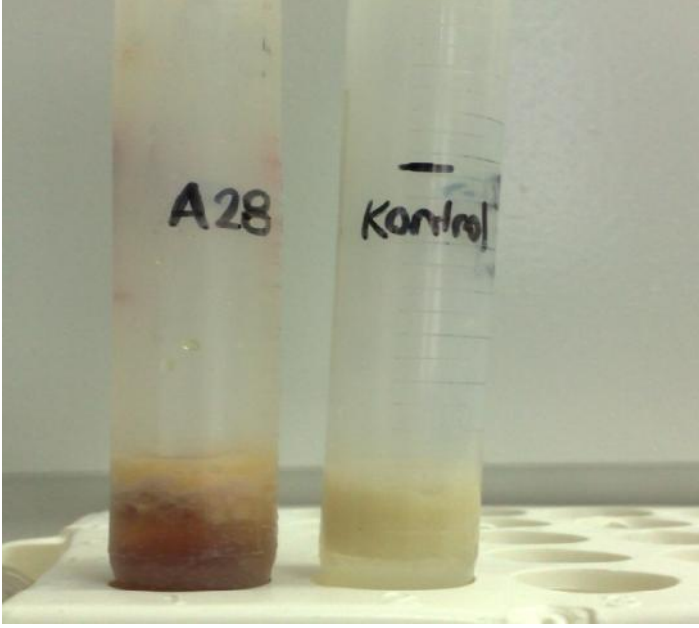
a) 10mg/ml ayçiçeği yağı bulunan ortamdaki KLA sentez miktarı

b) 500µg/ml linoleik asit (LA) bulunan ortamdaki KLA sentez miktarı

* Sıcaklık 30°C, pH 7,2, inkübasyon 72 saat, YEL besiyortamı

Çalışmada Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarında bulunan insan ve gıda kaynaklı 3 *Lactobacillus* ve 2 *Bifidobacterium* cinsine ait farklı türlerin KLA sentezleme kapasiteleri Madde 3.2' de belirtildiği gibi çalışılmıştır. Seçilen bakterilerin KLA sentezleme miktarları ve izolasyon kaynakları Çizelge 4.5'te gösterilmektedir.

Fruktoz-6-fosfat fosfoketolaz (F6PPK) enzim testi bifidobakterileri cins düzeyinde tanımlamada kullanılan bir testtir. Test sonucunda bifidobakteri olan suşlar kiremit rengi, negatif kontrol sarı renk olmaktadır. Çalışmaya başlamadan önce elimizdeki *Bifidobacterium breve* A28 ve *B.bifidum* A10 suşlarını doğrulamak için F6PPK enzim testi yapılmış, bakteriler doğrulandıktan sonra bu örnekler ile çalışılmıştır (Resim 4.10).



Resim 4.11. *B. breve* A28 suşu için Fruktöz-6-fosfat fosfoketolaz (F6PPK) enzim testinin sonuçları

Bifidobakteriler pH 6,8 olan MRSc besiortamında 37°C’de anaerobik olarak 48 saat inkübe edilmiş, 48. saatte KLA miktarı ölçülmüştür. *B. breve* A28 suşu LA içeren ortamda % 30, ayçiçekli ortamda % 14, *B. bifidum* A10 suşu LA içeren ortamda % 26, ayçiçekli ortamda % 11 KLA sentezleyebilmiştir.

Laktobasiller için pH 6,2 olan MRS besiortamı kullanılıp 37°C’de 24 saat inkübasyon sonunda ölçüm yapılmıştır. En yüksek sentez *L. rhamnosus* GD 11 suşunda LA’lı ortamda % 24, ayçiçekli ortamda % 10 olarak bulunmuştur. Gaita (GD11, LA3) ve peynir (SMP) kaynaklı laktobasil izolatları arasında farklılık olmadığı görülmüştür.

Çizelge 4.5. Seçilen *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* kültürlerinin % KLA sentezleme kapasiteleri ve izolasyon kaynakları

İzolasyon kaynağı	Kod	Tür adı	KLA sentezleme miktarı (%)**	
			Ayçiçek yağı ^a	Linoleik asit ^b
Yenidoğan gaitası	GD 11	<i>L. rhamnosus</i>	10± 1	24 ± 1
Yenidoğan gaitası	LA3	<i>L. plantarum</i>	9 ± 1	23 ± 1
Peynir *	SMP	<i>L. rhamnosus</i>	11 ± 1	23 ± 1
Yenidoğan gaitası	A28	<i>B. breve</i>	14 ± 1	30 ± 1
Yenidoğan gaitası	A10	<i>B. bifidum</i>	11 ± 1	26 ± 2

a) 10mg/ml ayçiçeği yağı bulunan ortamdaki KLA sentez miktarı

b) 500µg/ml linoleik asit (LA) bulunan ortamdaki KLA sentez miktarı

* 6 numaralı Sepet Mihaliç Peyniri

** Bifidobakteriler için; sıcaklık 37°C, pH 6,8, inkübasyon süresi 48 saat, MRSc besiortamı
Lakobasiller için; sıcaklık 37°C, pH 6,2, inkübasyon süresi 24 saat, MRS besiortamı

4.4. Konjuge Linoleik Asit Sentezinin Optimize Edilmesi

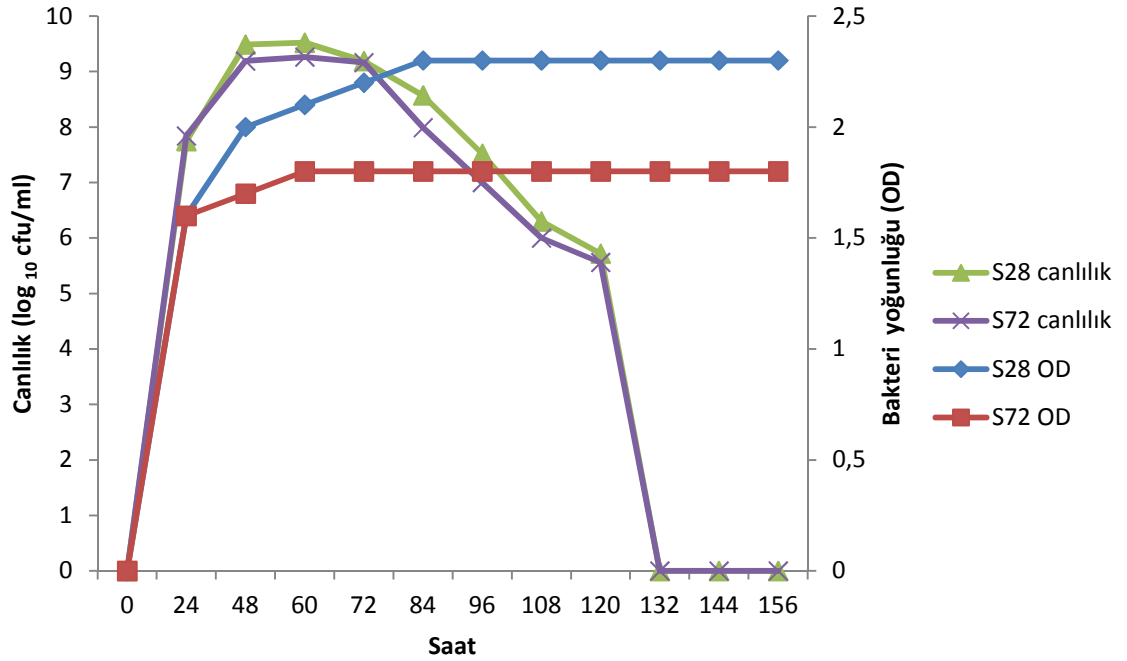
4.4.1. *Propionibacterium* spp. kültürlerinin gelişim eğrilerinin belirlenmesi

KLA sentezinin optimize edilmesinden önce propiyonibakterilerin gelişim eğrileri çıkarılarak logaritmik, durgunluk ve ölüm evreleri belirlenmiştir. Besiyerine inokule edilen bakterilerin süpernatant yoğunluğu, canlılık sayımı ve besiortamının pH ve % asit miktarı 7 gün süreyle takip edilmiştir. 48. saatten sonraki ölçümler 12 saatte bir yapılmıştır. *B. breve* A28 suşunun gelişim eğrisi Gazi Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarında yapılan doktora tez çalışmasında çalışıldığı için tekrarlanmamış, tezdeki sonuçlar baz alınmıştır. *B. breve* A28 için logaritmik fazın 24-48 saat arasında olduğu ve canlılığın en yüksek 48. saatte olduğu söylenmiştir.

Şekil 4.4' te OD olarak belirtilmiş parametrede besiyerinde gelişen bakteri yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülmüş olup canlılığı göstermemektedir. Besiyeri yoğunluğu *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* S28 için 84. saatten sonra, *P.*

thoenii S72 için ise 72. saatten sonra sabitlenmiştir. Bu saatlere kadar bakterilerin gelişimi devam etmiş bu saatlerden sonra gelişim durmaya başlamıştır. Spektrofotometrik ölçüm yapıp canlı - ölü ayırımı yapılmadığı için azalma görülmeyip değerler sabitlenmiştir.

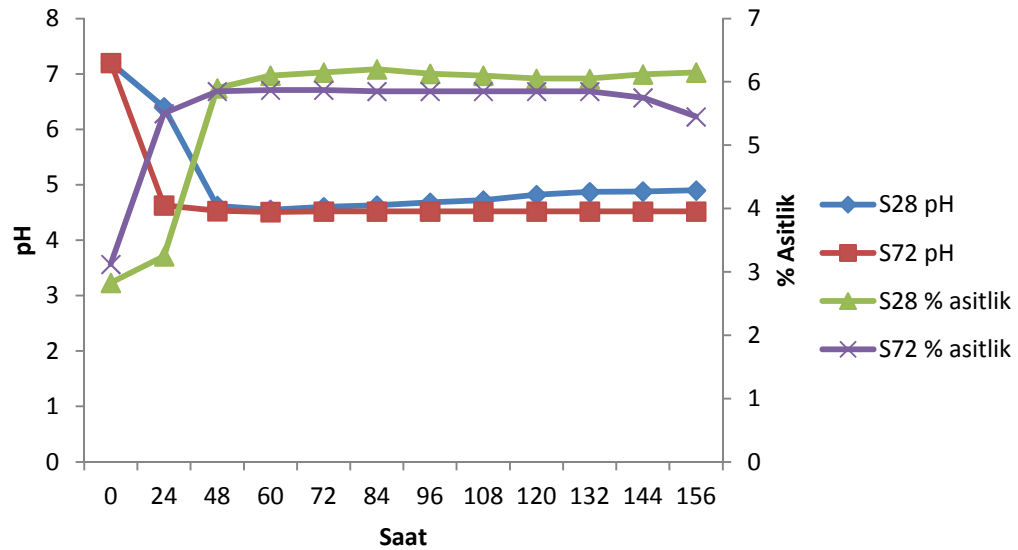
Yapılan canlılık sayımında, her iki bakteri için logaritmik faz aralığının 24 - 48. saatlerde olup, canlılığın en yüksek 60. saatte olduğu belirlenmiştir. 72. saatten sonra durgunluk evresi bitmiş ve ölüm fazına geçilmiştir. İki farklı tür olmasına rağmen gelişim eğrileri benzer bulunmuştur.



Şekil 4.3. Propiyonik asit bakterilerinin gelişim eğrisi, canlılık (log₁₀ cfu/ml) ve besiyeri yoğunluğu (OD)

Gelişim eğrisinin çıkarıldığı süre boyunca besiyerinin pH ve % asitliği de takip edilmiştir. pH'nın saatlere göre gittikçe düştüğü % asitliğin arttığı görülmüştür. Bu durum istatistiksel analizler ile de desteklenmiş olup, pH ve asitlik arasında ($p < 0,01$) korelasyon olduğu belirlenmiştir. pH'daki düşme ve asitlikteki yükselmenin bakteri gelişimi ile alakalı olduğu görülmüştür. Bakterinin karbonhidrat

metabolizması sonucunda sentezlenen asitler % asitliği arttırmış ve ortamın pH'sını düşürmüştür. pH düştükçe bakteri gelişimi de azalmıştır. Canlılığın durması ile birlikte pH-asitlik miktarları 60. saatten sonra sabitlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.4. Propiyonik asit bakterilerinin gelişim süresince pH ve % asitliği

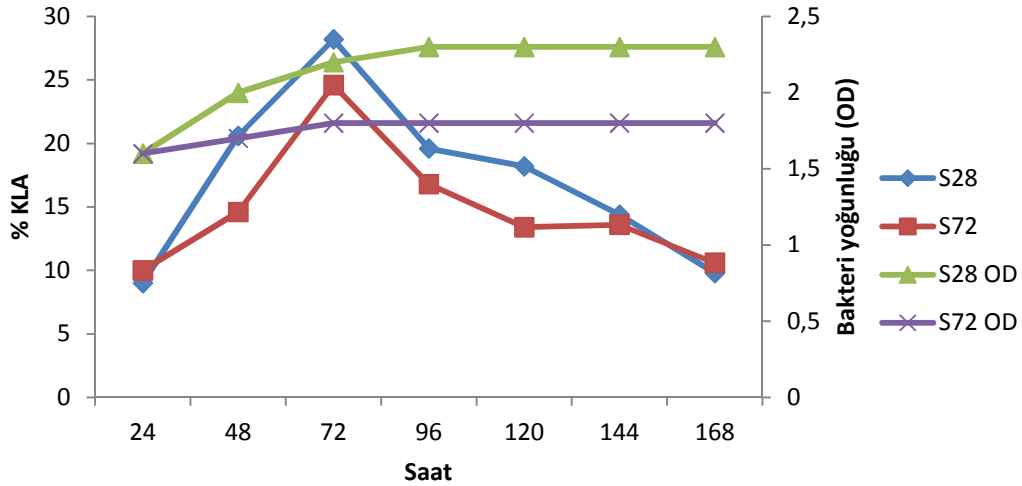
4.4.2. Optimizasyon

Bakterilerince sentezlenen KLA miktarının arttırılabilmesi için inkübasyon süresi, sıcaklık, pH, linoleik asit miktarı ve inülin prebiyotiği gibi parametrelerde denemeler yapılmıştır.

İnkübasyon süresinin etkisi

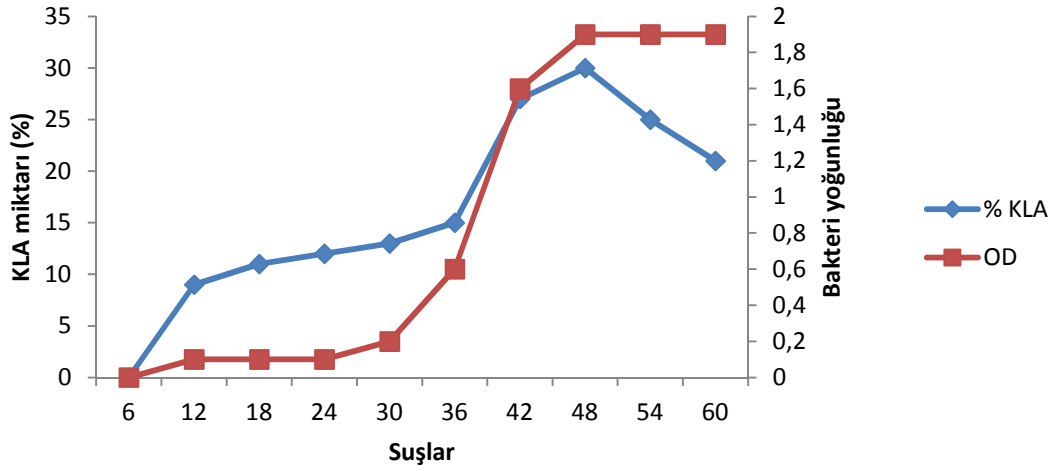
İnkübasyon süresinin KLA sentezine etkisinin araştırılması için kültürler 500 µg/ml LA ve % 0,5 Tween 80 içeren ortamda inkübe edilmiştir. Propiyonibakteriler pH 7,2 olan YEL besiyerinde 30°C'de 7 gün, *B. breve* A28 pH 6,8 olan MRSc besiyerinde 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçlar KLA sentezinin hücre gelişimi ile ilişkili olduğunu göstermiştir ($p < 0,05$).

Propiyonibakterilerin KLA sentezleme yeteneği Şekil 4.3' teki sonuçlara göre değerlendirildiğinde her iki suşta da gelişim ile KLA sentezleme arasında ilişki olduğu belirlenmiştir. Durgunluk fazına kadar fazla olan KLA sentezinin, bakterilerin durgunluk ve ölüm fazına girmesiyle birlikte iki suşta birden hızla azaldığı dikkat çekmiştir. Canlılık en yüksek 60. saatte bulunmakla birlikte KLA sentezinin en yüksek 72. saatte (durgunluk fazı) olduğu görülmüştür. Bununla birlikte en yüksek KLA sentezi iki suş için de 72. saatte S28 suşunda % 28 (141 µg/ml) S72 suşunda % 25 (123 µg/ml) bulunmuştur (Şekil 4.6).



Şekil 4.5. KLA sentezinde ve bakteri gelişiminde inkübasyon süresinin etkisi

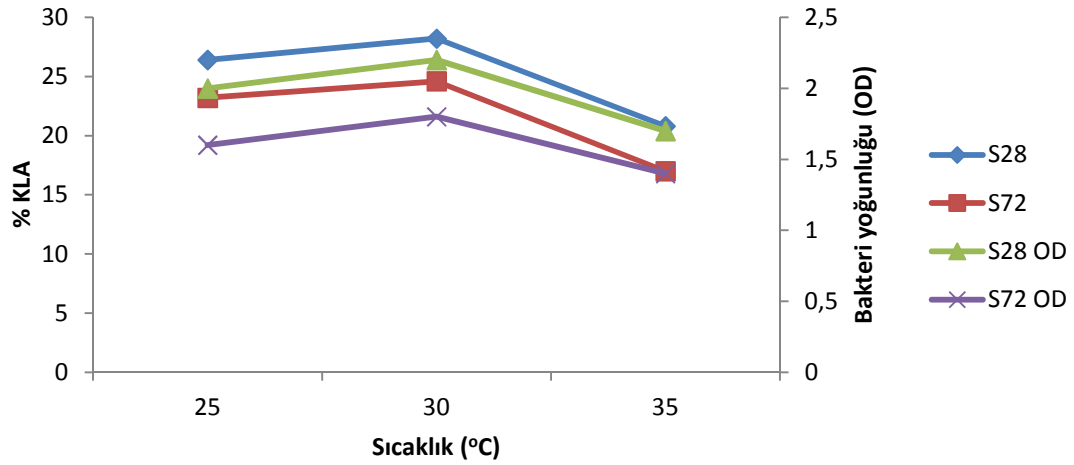
B. breve A28 suşunda canlılığın en yüksek seviyeye ulaştığı 48. saatte gelişime bağlı olarak KLA sentezlemesi de en yüksek seviyeye 150 µg/ml (% 30) ulaşmıştır. Sonuçlar Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



Şekil 4.6. KLA sentezi ve bakteri gelişimde inkübasyon süresinin etkisi.

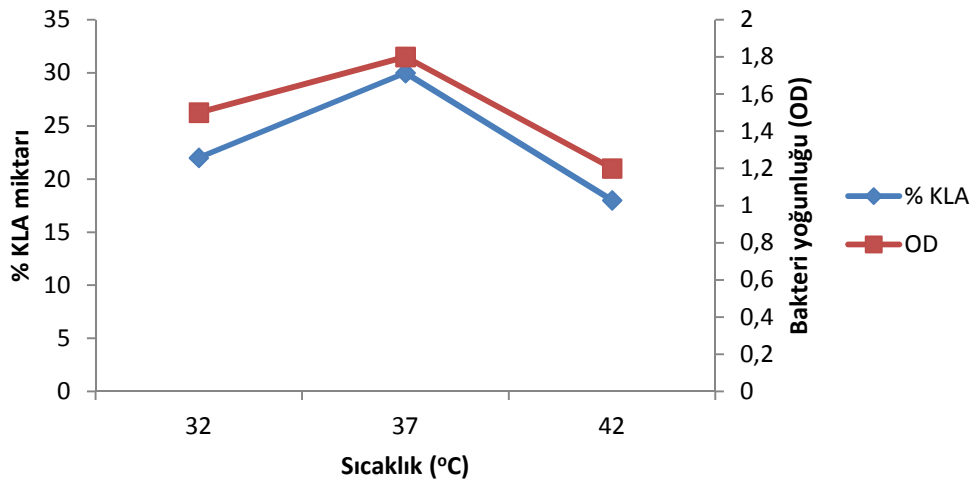
Sıcaklığın etkisi

Sıcaklığın KLA sentezine etkisinin araştırılması için kültürler 500 µg/ml LA ve % 0,5 Tween 80 içeren ortamda inkübe edilmiştir. Propiyonibakteriler pH 7,2’de YEL besiyerine ekilerek 72 saat inkübe edilmiştir. Normal gelişim sıcaklığı 30°C olan propiyonibakter suşları için daha alt ve üst sıcaklıklar seçilerek 25, 30 ve 35°C’lerde KLA sentezine bakılmıştır. Her 3 sıcaklıkta da KLA sentezlemesi gerçekleşmiş olmakla birlikte en yüksek kapasitedeki sentezin iki suş için de *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* S28 (% 28), *P. thoenii* S72 (% 25) bakterilerin normal gelişme sıcaklığı olan 30°C’de olduğu görülmüştür. Sonuçlara göre propiyonibakterilerin 25-30 °C sıcaklıklarında benzer gelişme gösterirken, sıcaklık 35 °C’ye çıkarıldığında daha zor gelişebildikleri görülmüştür. Sıcaklık ile KLA sentezi arasındaki ilişki istatistiksel olarak ($p < 0,01$) doğrulanmıştır. Canlılığın sıcaklık ile bağlantılı olduğu ve KLA sentezinin de canlılık ile doğru orantılı olduğu bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.8).



Şekil 4.7. KLA sentezinde ve bakteri gelişimde sıcaklığın etkisi.

B. breve A28 suşu için pH 6,8 MRSc besiyerine bakteri ekilerek 32, 37 ve 42 °C’lerde 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. KLA sentezinin hücre gelişimi ile bağlantılı olup en yüksek KLA sentezinin 150 µg/ml (% 30) normal gelişim sıcaklığı olan 37°C’de gerçekleştiği görülmüştür (Şekil 4.9).

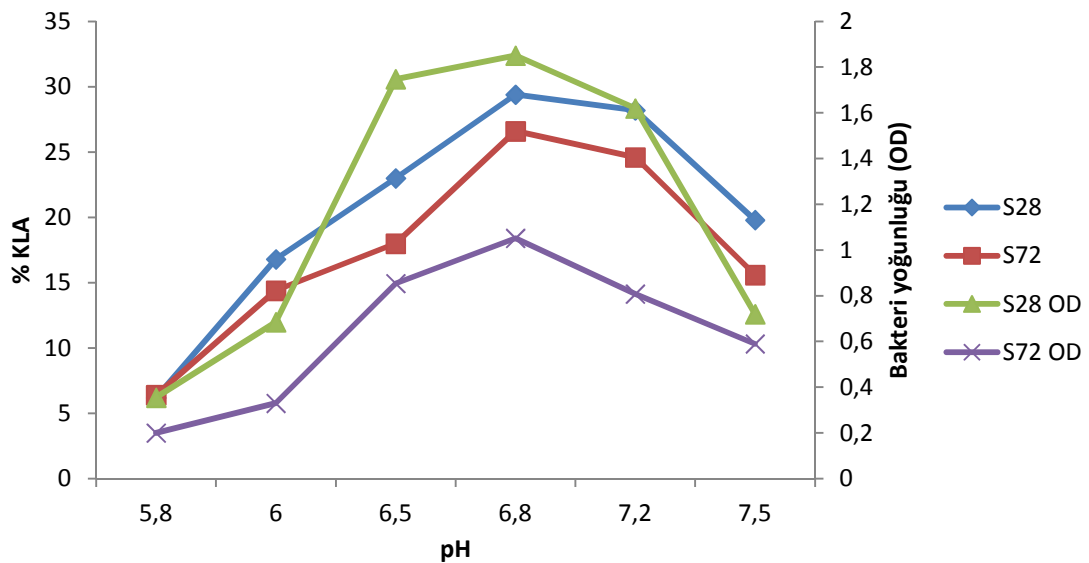


Şekil 4.8. KLA sentezi ve bakteri gelişiminde sıcaklığın etkisi.

pH'nin etkisi

KLA sentezinde pH'nın etkisinin araştırılması için 5,8 - 7,5 arası pH' larda çalışılmıştır. Kültürler 500 µg/ml LA, % 0,5 ve Tween 80 içeren YEL besiyerine

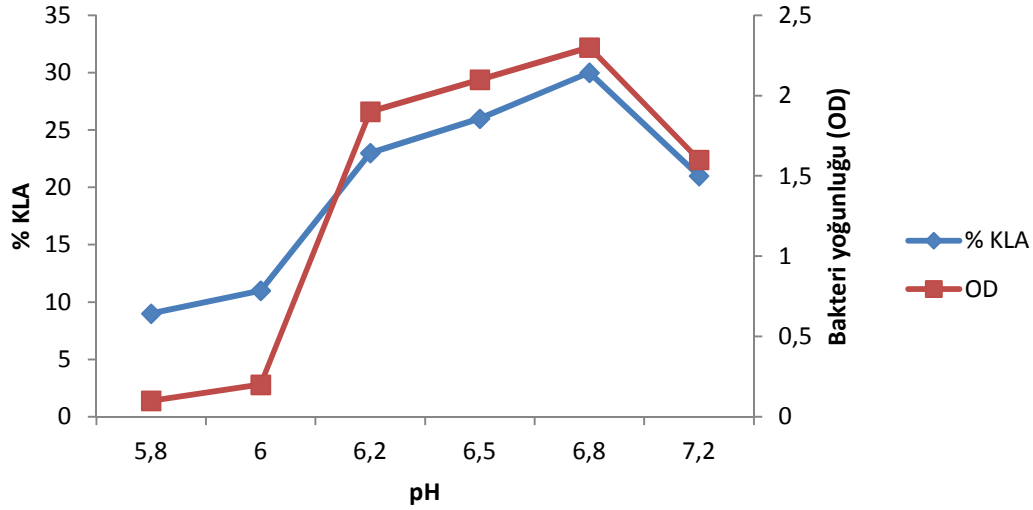
ekilerek 30°C’de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Çalışmada propiyonibakterilerin pH değişimlerinde ciddi derecede etkilendiği, suş bazında farklılık olmadığı görülmüştür. pH farklılığı iki suşun gelişimi üzerinde etki gösterdiği gibi KLA sentezini de etkilediği dikkat çekmiştir. pH’nın bakteri gelişimine ve dolayısıyla KLA sentezine etkisi istatistiksel ($p < 0,05$) olarak da doğrulanmıştır. 5,8- 6,0 gibi asidik ve 7,5’ten yüksek bazik pH aralıklarında propiyonibakteriler zor gelişme göstermiştir. Normal gelişme pH’sı 7,2 olan suşlar en iyi gelişmeyi pH 6,8’de göstermiş ve canlılığa bağlı olarak en yüksek KLA sentezi de pH 6,8’de olmuştur. Sonuçlar pH 6,8’deki KLA sentezinin, pH 7,2 ile yapılan KLA sentezleme yeteneğinin taranmasındaki orandan daha yüksek olduğunu göstermiştir. *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* S28 suşu pH 7,2’de % 28 KLA sentezlerken pH 6,8’de % 29, *P. thoenii* S72 suşu pH 7,2’de % 25 KLA sentezlerken pH 6,8’de % 27 KLA sentezlemiştir. Sonuçlar Şekil 4.10’ da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. KLA sentezinde ve bakteri gelişmesinde pH’nın etkisi.

pH değişiminin bifidobakteriler üzerinde de ciddi etkisi olmuştur. *B. breve* A28 suşunun pH duyarlılığı propiyonibakterilere benzer olduğu görülmüştür. 5,8 - 6,0 gibi asidik ve 6,8’den sonraki bazik pH’lar bakteri gelişimi önemli boyutlarda

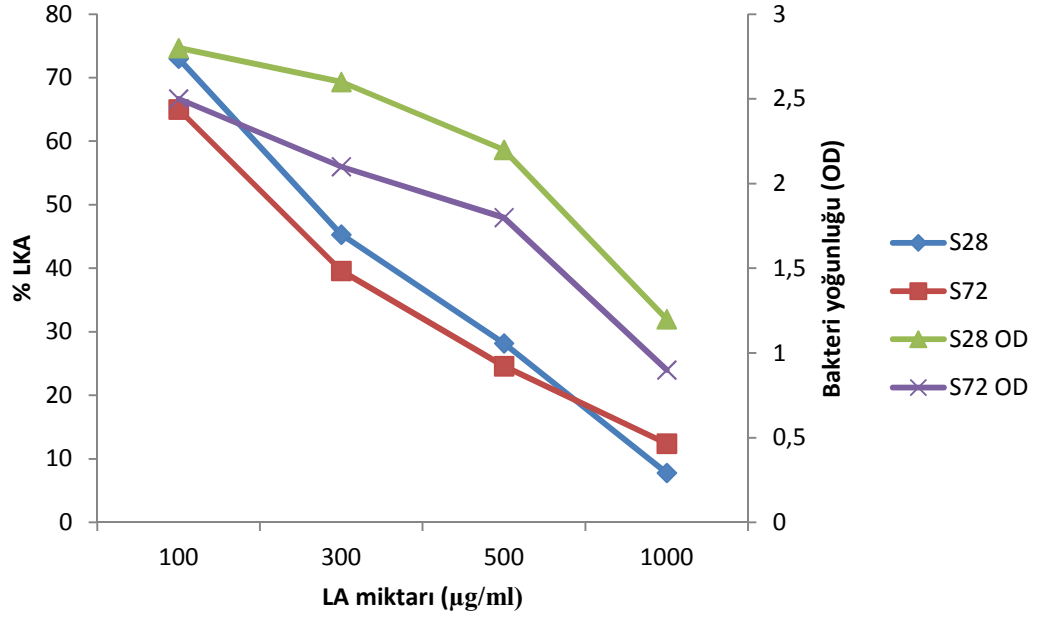
engellemiştir. Bakteri gelişimi ve ona paralel KLA sentezi 150 µg/ml (% 30) için en ideal pH 6,8 bulunmuştur (Şekil 4.11).



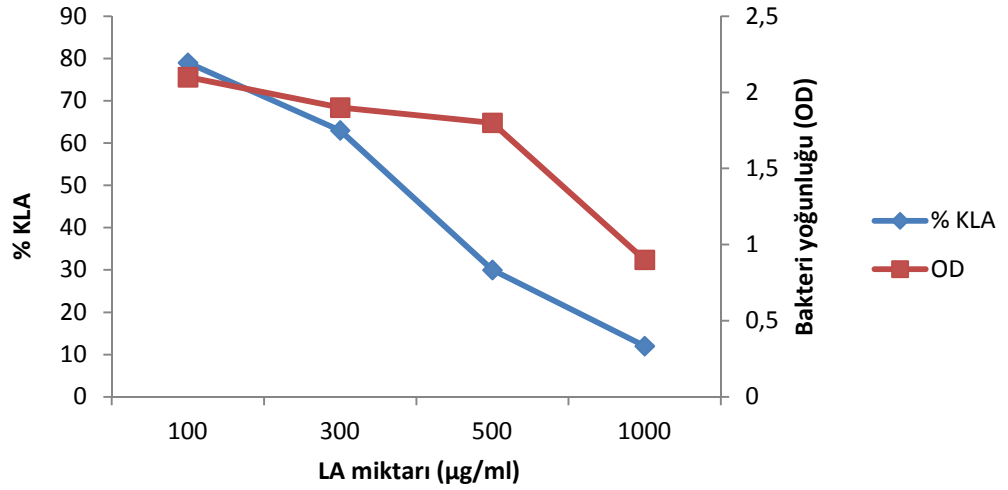
Şekil 4.10. KLA sentezi ve bakteri gelişiminde pH'ın etkisi.

Linoleik asit miktarının etkisi

KLA üretiminde LA'nın etkisinin araştırılması için besiyortamına 100, 300, 500 ve 1000 µg/ml LA olacak miktarda LA inoküle edilmiştir. Propiyonibakteriler 30°C , pH 7,2 olan YEL besiyerinde 72 saat, bifidobakteriler 37°C, pH 6,8 olan MRSc besiyerinde 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Besiyortamındaki LA konsantrasyonunun artması bakterilerin gelişimini ciddi seviyelerde inhibe etmiştir. Buna bağlı olarak sentezlenen KLA miktarı da azalmıştır. Bütün suşlarda en yüksek KLA miktarı 100 µg/ml LA varken gerçekleşmiştir. 100 µg/ml LA bulunan ortamda *P. freudendreichii* ssp. *shermanii* S28 suşu % 73 (73 µg/ml) *P. thoenii* S72, % 69 (69 µg/ml) ve *B. breve* A28 % 79(79 µg/ml) KLA sentezlemiştir. LA miktarı 1000 µg/ml'ye çıkarıldığında bakteri canlılığında ve buna paralel KLA sentezinde ciddi bir düşüş belirlenmiştir. *P. freudendreichii* ssp. *shermanii* S28 suşu % 8 (7,8 µg/ml), *P. thoenii* S72 suşu % 14 (14,2 µg/ml) ve *B. breve* A28 % 12 (12,3 µg/ml) KLA sentezleyebilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.12 ve 4.13'te gösterilmiştir. LA miktarı ile KLA sentezi arasında ($p < 0,05$) ve LA miktarı ile bakteri gelişimi arasında ($p < 0,01$) negatif korelasyon olduğu saptanmıştır.



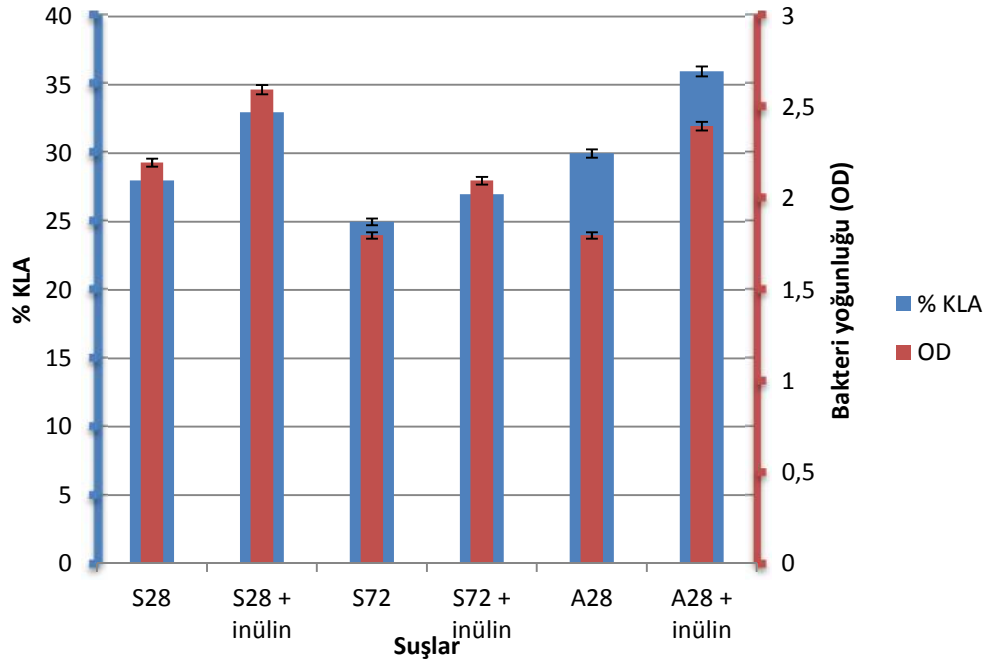
Şekil 4.11. KLA sentezi ve bakteri gelişiminde LA miktarının etkisi.



Şekil 4.12. *B. breve* A28 suşunun KLA sentezi ve bakteri gelişiminde LA miktarının etkisi.

İnülin prebiyotiğinin etkisi

KLA sentezlenmesinde inülin prebiyotiğinin etkisinin araştırılması için 500 µg/ml LA içeren ve içermeyen uygun besiyortamına 5 µg/ml olacak şekilde inülin ilave edilmiştir. Propiyonibakteriler 30°C sıcaklıkta ve pH 7,2’de 72 saat, *B. breve* A28 pH 6,8 ve 37°C sıcaklıkta 48 saat inkübe edilerek sentezlenen KLA miktarı ölçülmüştür. İnülin etkisine bağlı suşların gelişimi ve buna bağlı olarak KLA sentezinin artmış olduğu tespit edilmiştir. İnülinli ortamdaki suşların KLA sentezleme yeteneğinin *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* S28 suşunda % 28’den % 33’e, *P. thoenii* S72 suşunda % 25’ten % 33’e ve *B. breve* A28 suşunda % 30’dan % 36’ya kadar artış gösterdiği belirlenmiştir. İnülin prebiyotiğinin bakteri gelişimini arttırıcı özelliği istatistiksel analizlerle de ($p < 0,01$) doğrulanmıştır. İnülinin KLA sentezine doğrudan değil bakteri gelişimi ile etki ettiği bulunmuştur (Şekil 4.14).

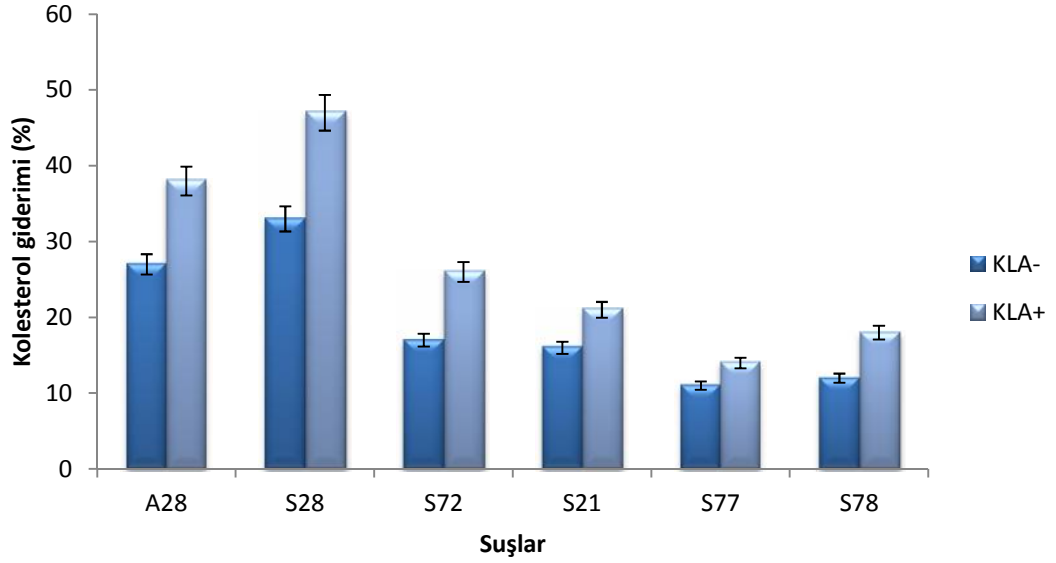


Şekil 4.13. KLA sentezinde ve bakteri gelişiminde inülin prebiyotiğinin etkisi.

4.5. Kolesterol Gideriminin Araştırılması

Bu çalışmada suşlarının yüzde kolesterol giderimleri ve suşlarca sentezlenen KLA'nın kolesterol giderimi üzerindeki etkisi bölüm 3.2.6' da anlatıldığı gibi araştırılmıştır.

Çalışılan bütün suşların kolesterol giderim yeteneğinde olduğu görülmüştür. Kolesterol gideriminin KLA sentezi ile ilişkili olup, suşlarca sentezlenen KLA'nın kolesterol giderim etkisini arttırdığı belirlenmiştir. En yüksek kolesterol giderimi *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* suşunda % 33 olarak belirlenmiş olup KLA sentezine bağlı giderimde % 47'ye kadar artış gösterdiği tespit edilmiştir. İkinci derecede kolesterol giderimi yüksek bulunan *B. breve* A28 suşunda ise KLA sentezine bağlı kolesterol gideriminin % 27'den % 38'e kadar arttığı tespit edilmiştir. KLA sentezi ile gerçekleşen giderim artışı yüksek KLA sentezleyen suşlarda % 9 - 14 oranında görülürken düşük KLA sentezleyen suşlarda bu oranın % 3 – 6 olduğu bulunmuştur. Sonuçlar kolestrerol giderimi ile KLA sentezi arasında bağlantı olduğunu yüksek KLA sentezleyebilen suşların KLA'ya bağlı daha yüksek kolesterol giderebildiğini göstermiştir ($p < 0,01$). Cins düzeyinde bakıldığında *B. breve* A28 suşunun giderim yeteneği % 38 ile S28 hariç diğer propiyonibakterilerden yüksek bulunmuştur. Sonuçlar Şekil 4.15'te verilmiştir.



Şekil 4.14. Kültürlerin kolesterol giderim yeteneği ve KLA sentezinin kolesterol giderimi üzerindeki etkisi

4.6. Antioksidan Etkinin Araştırılması

Çalışmada KLA sentezleme yeteneği yüksek ve düşük *Propionibacterium* suşları ve yüksek KLA sentezleme yeteneğine sahip *Bifidobacterium breve* A28 suşu ile çalışılmıştır. Bakterinin direk etkisinin belirlenebilmesi için pellet ile ve bakterinin üretilen dışarı sentezlemiş olduğu metabolit vs. ürünlerin etkisinin belirlenmesi için süpernatant ile Madde 3.2.7' de anlatıldığı gibi çalışılmıştır.

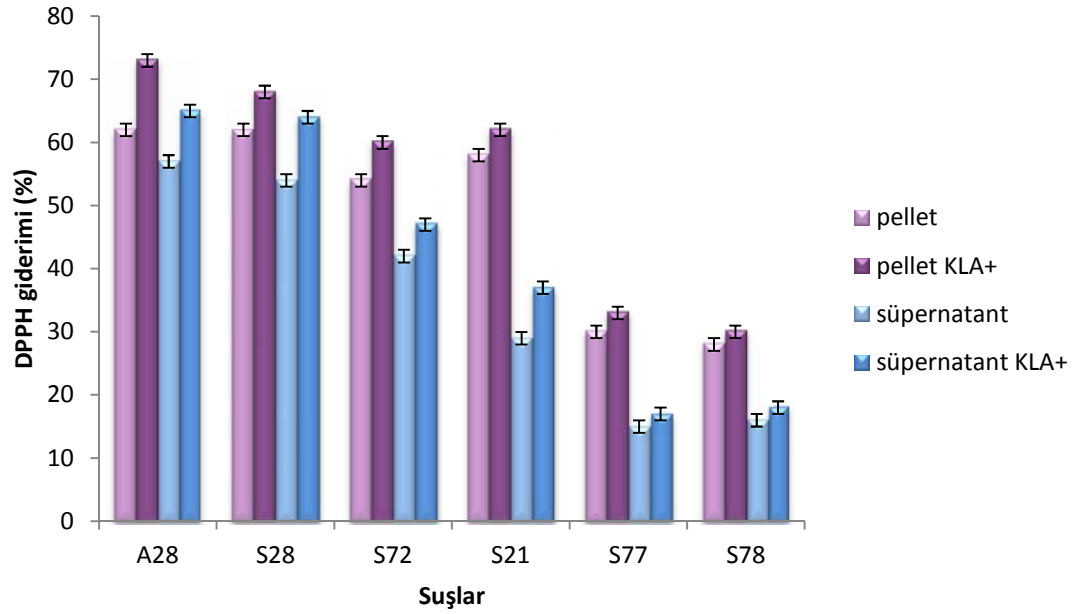
Suşların antioksidan etki gösterdiği, DPPH giderme, Fe^{+2} şelatlama ve lipid peroksidasyonunun inhibisyonu çalışmalarında farklı miktarlarda etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Antioksidan etki ile KLA sentezi arasında tam bir doğru orantı belirlenemezken, inkübasyon süresince bakteri tarafından sentezlenen KLA'nın antioksidan etkiyi farklı oranlarda arttırdığı tespit edilmiştir. Suşlar cins düzeyinde karşılaştırıldığında propiyonibakteriler ile bifidobakteri arasında çok ciddi fark olmadığı gözlenmiştir.

4.6.1. Serbest radikal giderme etkisi

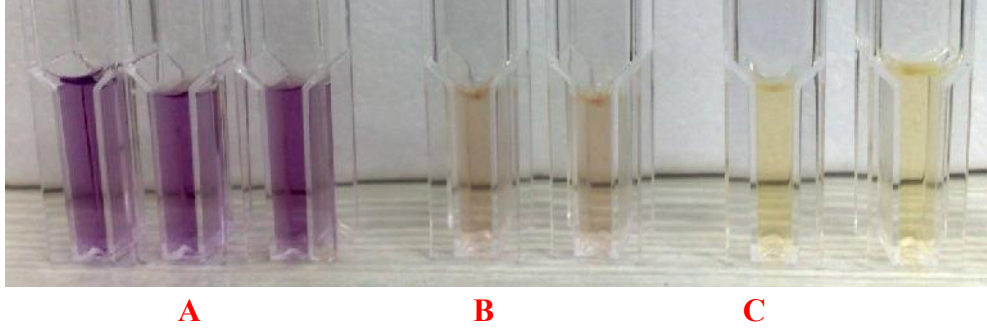
Madde 3.7.1’de belirtilen yöntemle göre çalışma yürütülmüştür. Çalışmada suşların ticari bir radikal olan DPPH serbest radikalini giderim yeteneği ve suşlarca sentezlenen KLA’nın bu giderim üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.16’da gösterilmiştir.

Çalışılan tüm suşların DPPH serbest radikalini giderme etkisine sahip olduğu gözlenmiştir. KLA sentezlenen ortamdaki suşların DPPH giderme yeteneğinin değişen miktarlarda artış gösterdiği ve en yüksek süpürmenin pellette gerçekleştiği belirlenmiştir. KLA sentezleme yeteneği yüksek olan suşlarda KLA sentezine bağlı DPPH gideriminin daha çok arttığı görülmüştür.

DPPH giderimi en yüksek *B. breve* A28 % 62 ve *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* S28 % 62 suşlarının pelletinde, en düşük *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* S78 suşunda % 28 görülmüştür. KLA sentezi ile yüksek KLA sentezleyen suşların DPPH gideriminde % 6 – 11 arası artış gözlenirken düşük yetenekli suşlarda % 2 – 4 arası artış gözlenmiştir. Süpernatantın DPPH giderim aktivitesinde *B. breve* A28 suşu KLA sentezi olan (% 65) ve olmayan (% 57) iki ortam için de en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Sonuçlara göre DPPH gideriminde çok ciddi fark olmamakla birlikte genel olarak *B. breve* A28 suşunun daha etkili olduğu belirlenmiştir. İstatistiksel analizler A28 suşunun en etkili suş olduğu doğrulanmış, yüksek ve düşük yetenekte KLA sentezleyen suşlar arasında dikkate değer bir fark olmadığı göstermiştir.



Şekil 4.15. Kültürlerin DPPH giderim yeteneği ve KLA sentezinin DPPH giderimi üzerindeki etkisi



Resim 4.12. DPPH radikali giderim etkisi. A) Kontrol B) KLA sentezi olmayan örnek C) KLA sentezi olan örnek

4.6.2. Metal iyonu şelatlama aktivitesi

Madde 3.7.2’de belirtilen yöntemle göre çalışma yürütülmüştür. Çalışmada suşların demir iyonu şelatlama yeteneği ve suşlarca sentezlenen KLA’nın şelatlama üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

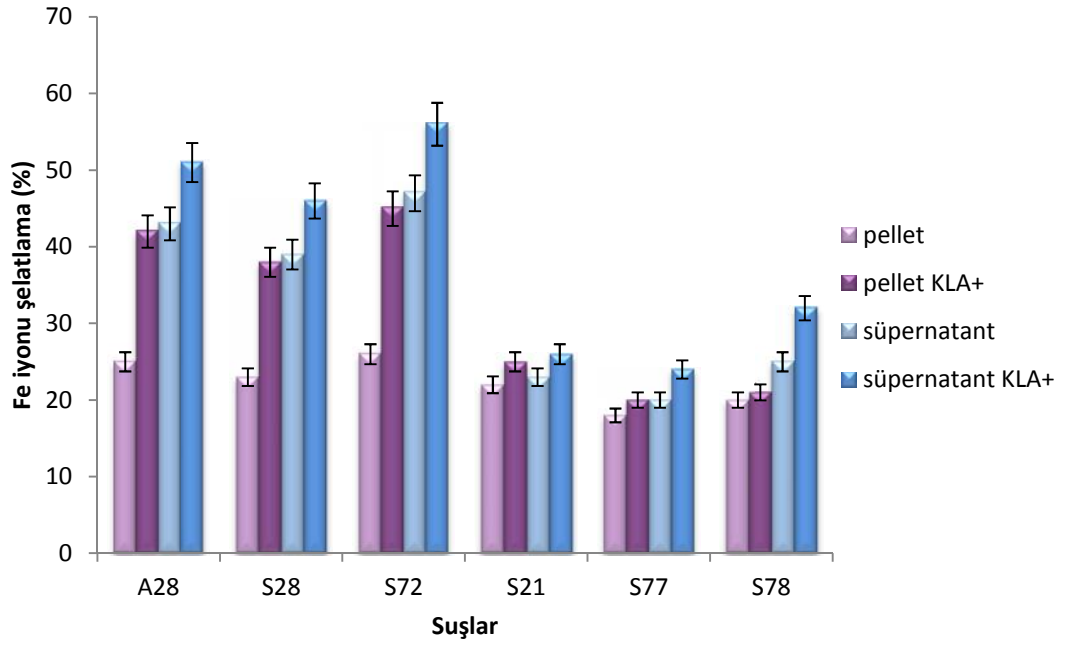
Çalışma ferrozinin Fe^{+2} iyonları ile kompleks oluşturmasına dayanmaktadır. Şelatlama ajanları (antioksidan madde) varlığında, kompleks oluşumu bozulmakta

ve meydana gelen mor renk açılmaktadır. Renkteki açılma antioksidan maddenin şelatlama aktivitesini göstermektedir.

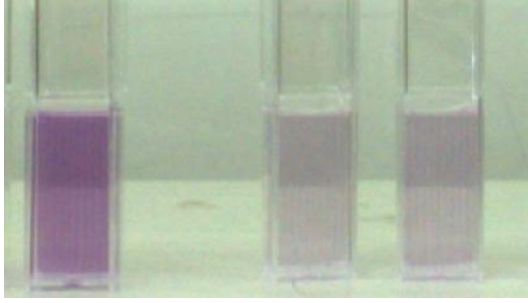
Çalışılan tüm suşların Fe^{+2} şelatlama gösterdiği gözlenmiştir. Ortama LA ilave edilmesi ile bütün suşların şelatlama yeteneği değişen miktarlarda artış göstermiştir. Yüksek ve düşük KLA sentezleme yeteneğindeki bakterilerin KLA sentezi ile şelatlama etkilerindeki artış arasında fark olduğu ($p < 0,01$) istatistiksel olarak da belirlenmiştir. Fe^{+2} şelatlama aktivitesinde genel olarak süpernatantın daha etkili olduğu gözlenmiştir.

Yüksek KLA sentezleyen suşların demir şelatlama aktivitesine bakıldığında en yüksek aktiviteyi pellette % 26 ve süpernatantta % 47 ile *P. thoenii* S72 göstermiştir. Fe^{+2} şelatlama aktivitesindeki artış hücre pelletinde en fazla *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* S28 suşunda (% 23'ten % 38'e), süpernatantta ise *P. thoenii* S72 (% 47'ten % 56'ya) suşunda tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 4.17).

Yüksek ve düşük KLA sentezleme yeteneğine sahip *Propionibacterium* kültürleri arasında yapılan kıyaslamada her iki grupta da Fe^{+2} şelatlama aktivitesi görülmüş olup yüksek KLA sentezleme yeteneğine sahip suşlarda daha fazla olmuştur. KLA varlığında süpernatantta, *P. thoenii* S72 suşunda (% 56) en yüksek, *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* S77 suşunda (% 24) en düşük etki belirlenmiştir.



Şekil 4.16. Kültürlerin Fe^{+2} iyonu şelatlama yeteneği ve KLA sentezinin şelatlama üzerindeki etkisi



Resim 4.13. Fe^{+2} şelatlama aktivitesi. A) Kontrol B) KLA sentezi olan örnek C) KLA sentezi olmayan örnek

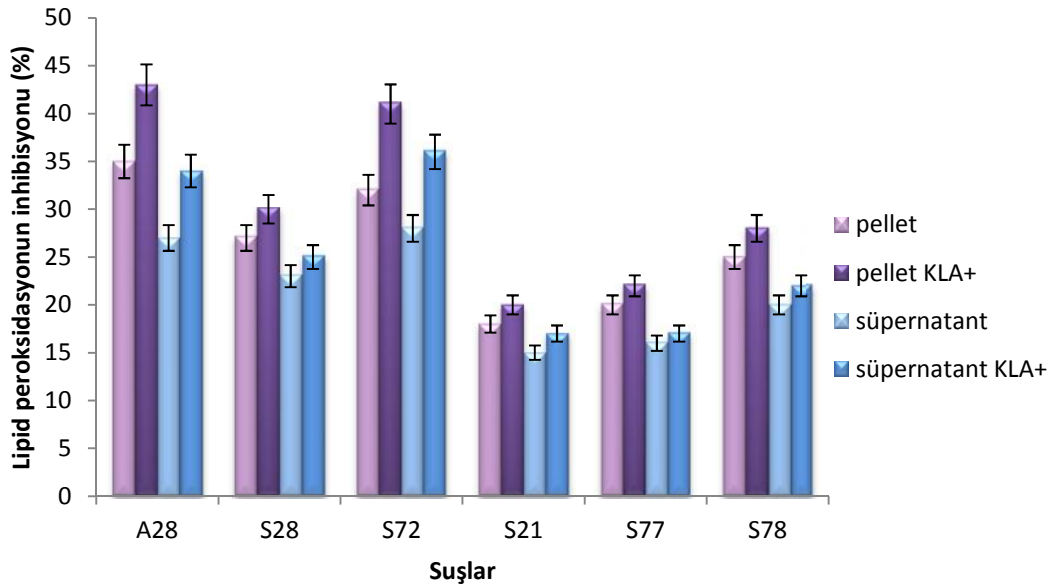
4.6.3. Lipid peroksidasyonunun önlenmesi

Madde 3.2.7.3'te belirtilen yöntemle göre çalışma yürütülmüş, suşların lipid peroksidasyonunu inhibe etme yeteneği ve suşlarca sentezlenen KLA'nın bu inhibisyon üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Çalışma lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan ana ürünlerden biri olan malondialdehitin (MDA) spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bu çalışmada lipid peroksidasyonunun inhibisyonu için, içeriğinde biyolojik lipid bulunan kan plazması kullanılmıştır.

Çalışmada bütün suşların lipid peroksidasyonunu inhibe etme yeteneğinde olduğu belirlenmiştir. KLA sentezi ile ortamda KLA bulunması inhibisyonu değişik miktarlarda arttırmıştır. Lipid peroksidasyonu üzerine en yüksek etki pellette görülmüştür.

En yüksek inhibisyon *B. breve* A28 suşunun pelletinde,% 35, KLA varlığında ise % 43 gözlenmiştir. KLA sentezi ile inhibisyondaki en fazla artış ise hem pellet (% 32'den % 41'e) hem de süpernatantta (% 28'den % 36'ya) *P. thoenii* S72 suşunda olduğu bulunmuştur. Sonuçlar yüksek ve düşük yetenekte KLA sentezleyebilen suşların KLA sentezi ile inhibisyon artışı arasında çok ciddi fark olmadığı göstermiştir. (Bkz. Şekil 4.18).



Şekil 4.17. Kültürlerin lipid peroksidasyonunu inhibe etme yeteneği ve KLA sentezinin inhibisyon üzerindeki etkisi



A **B** **C**
Resim 4.14. Lipid peroksidasyonunun inhibisyonu. A) Kontrol B) KLA sentezi olan bakteri kültürü C) KLA sentezi olmayan bakteri kültürü

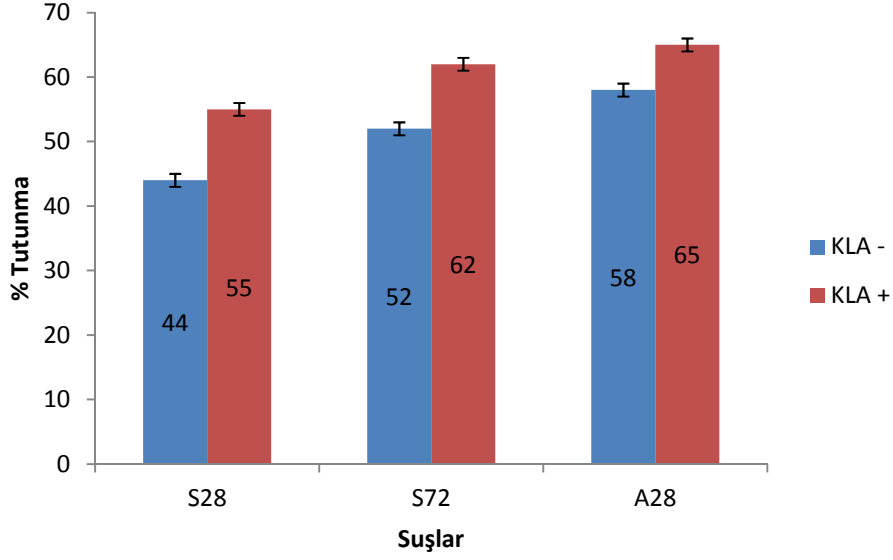
4.7. Kültürlerin Adezyon Yeteneğinin Belirlenmesi

Çalışmada yüksek KLA sentezleme yeteneğine sahip *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* S28, *P. thoenii* S72 ve *B. breve* A28 suşlarının epitel yüzeye tutunma yetenekleri ve KLA sentezinin tutunma yeteneği üzerindeki etkisi Madde 3.2.8'de belirtildiği gibi çalışılmıştır. Suşların tutunma kapasiteleri ışık mikroskopunda yapılan sayım ile belirlenmiştir.

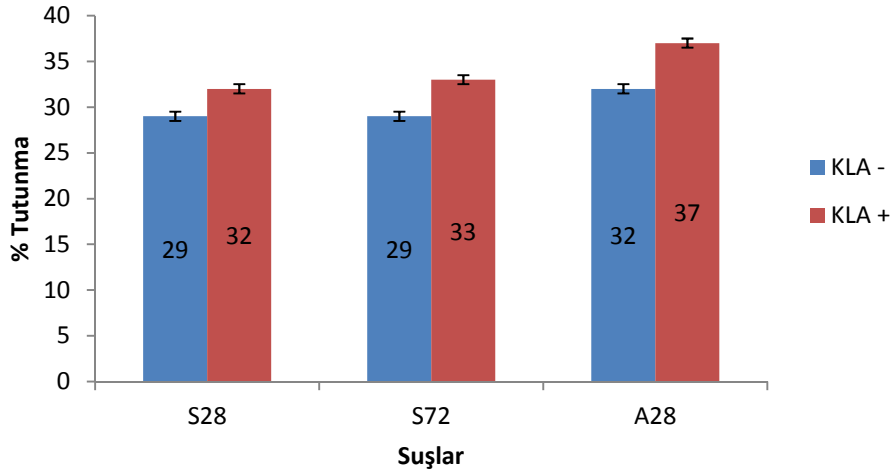
Çalışmada suşların Caco-2 ve CCL-221 hücre hatlarına tutunma yeteneğinde olduğu bulunmuştur. Suşların tutunma kapasiteleri hücre hatları arasında farklılık göstermiştir. Suşlarca sentezlenen KLA'nın tutunma kapasitesini belirli ölçülerde arttırdığı tespit edilmiştir.

Suşların Caco-2 hücre hattında CCL-221 hücre hattına kıyasla daha yüksek oranda tutunabildiği görülmüştür ($p < 0,01$). En yüksek tutunmayı *B. breve* A28 suşu % 58 ile gösterirken *P. thoenii* S72 suşu % 52 ve *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* S28 suşu % 44 tutunabilmiştir. KLA sentezinin olması ile tutunma kapasiteleri A28 suşunda % 65'e, S72 suşunda % 62'ye ve S28 suşunda % 55'e yükselmiştir. KLA sentezi ile tutunmadaki artış Caco-2 hücresinde CCL-221'den daha yüksek olmuştur. KLA sentezi ile tutunma yeteneğininin artışı istatistiksel olarak da ($p < 0,01$) doğrulanmıştır. CCL-221 hücre hattında her üç suş da benzer tutunma (A28 % 32, S28 % 29, S72 % 29) göstermiştir. KLA sentezi olan örneklerin tutunmadaki artışları

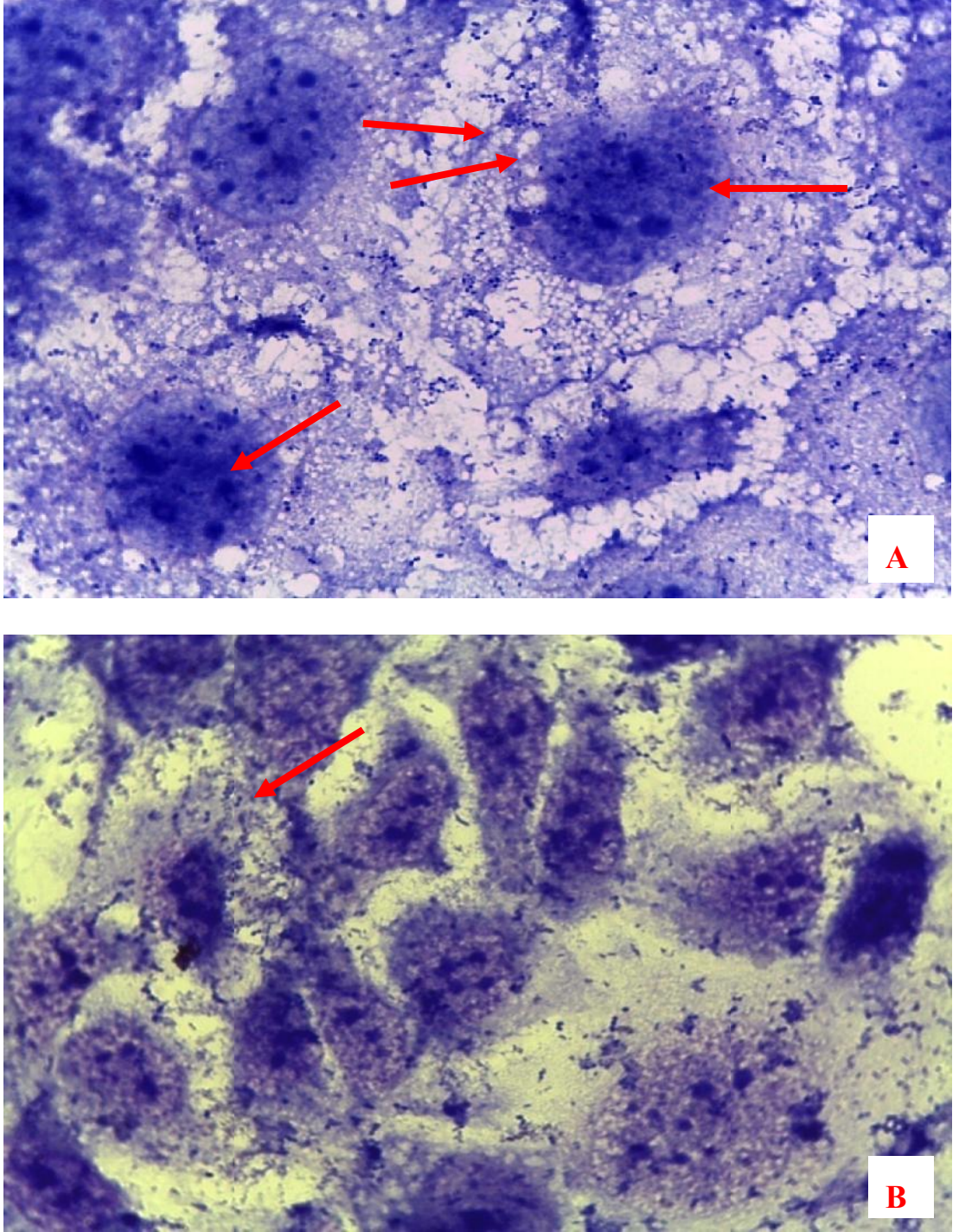
da benzer bulunmuştur (A28 % 35, S28 % 32, S72 % 33). Sonuçlar Şekil 4.19 ve 4.20'de gösterilmiştir.



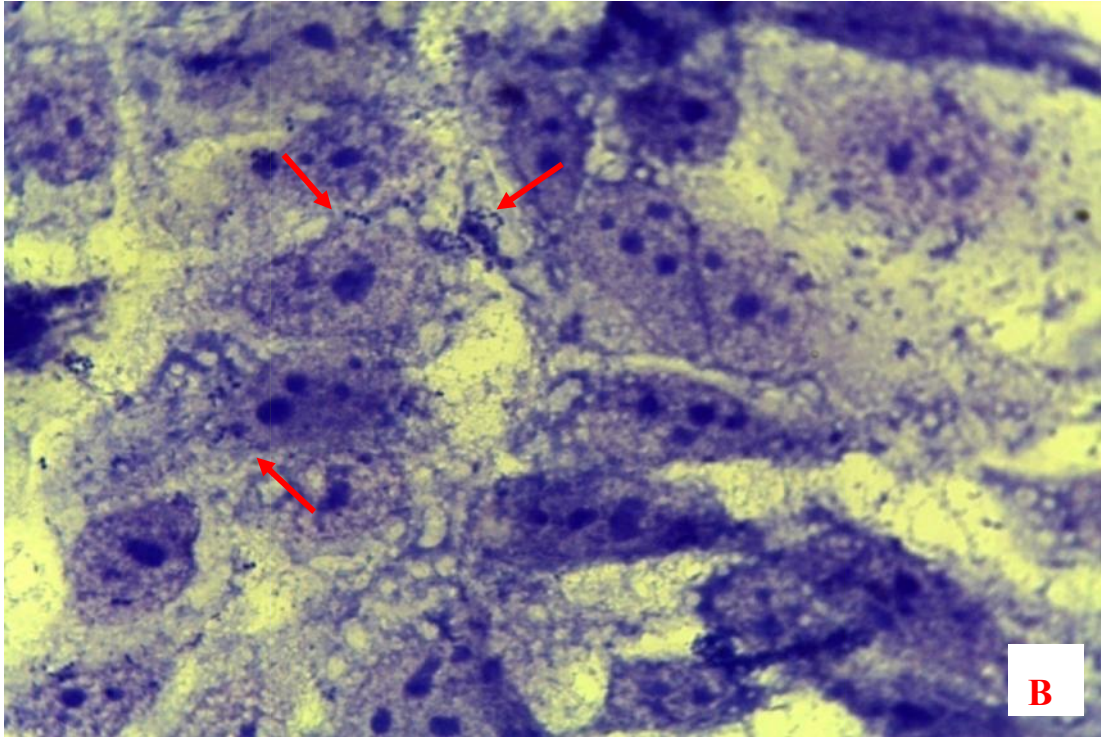
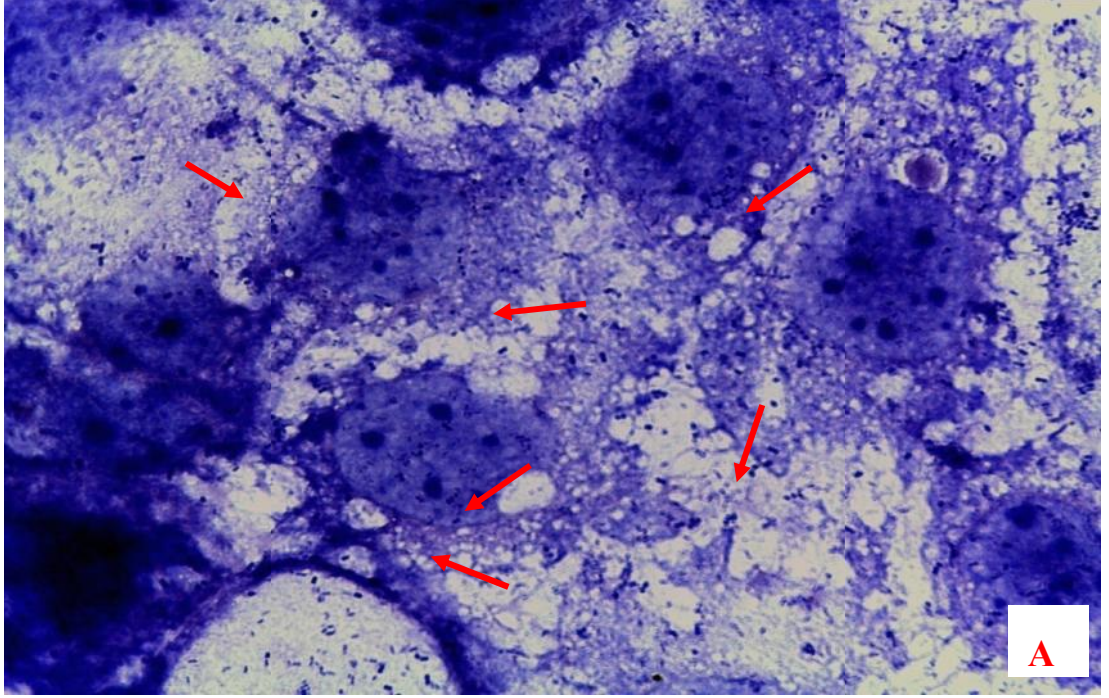
Şekil 4.18. Caco-2 hücre hattına kültürlerin tutunma kapasitesi (%) ■ KLA sentezi olmadığında ■ KLA sentezi olduğunda



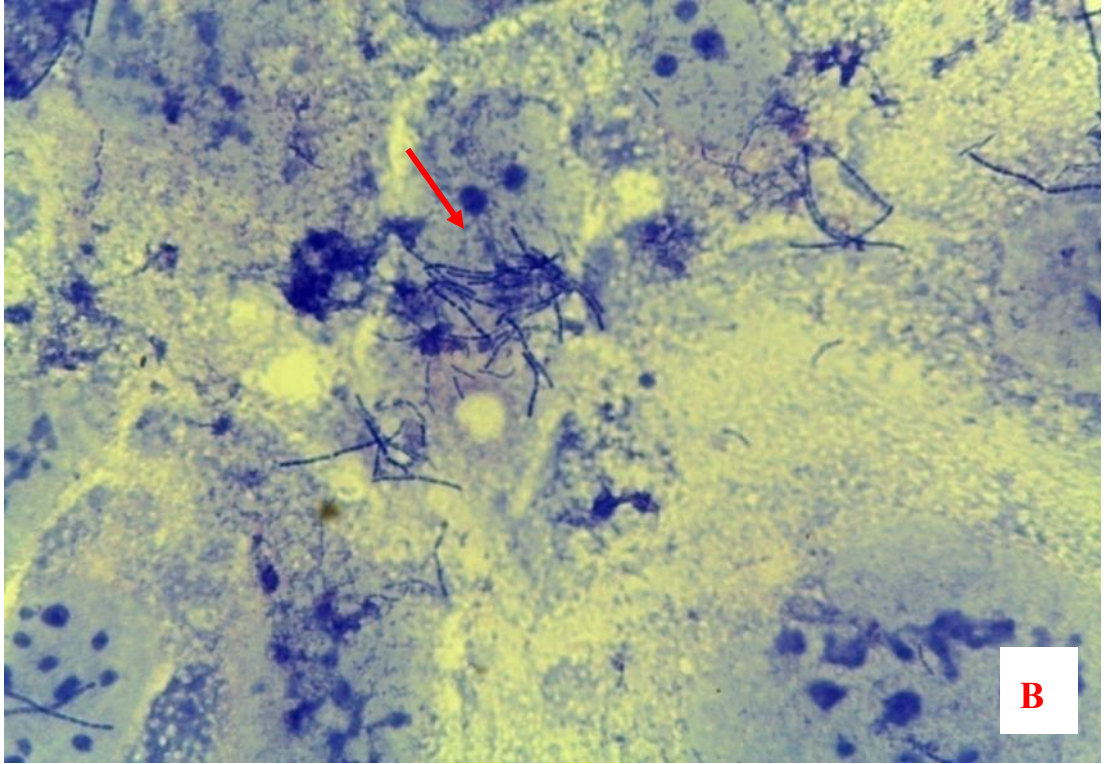
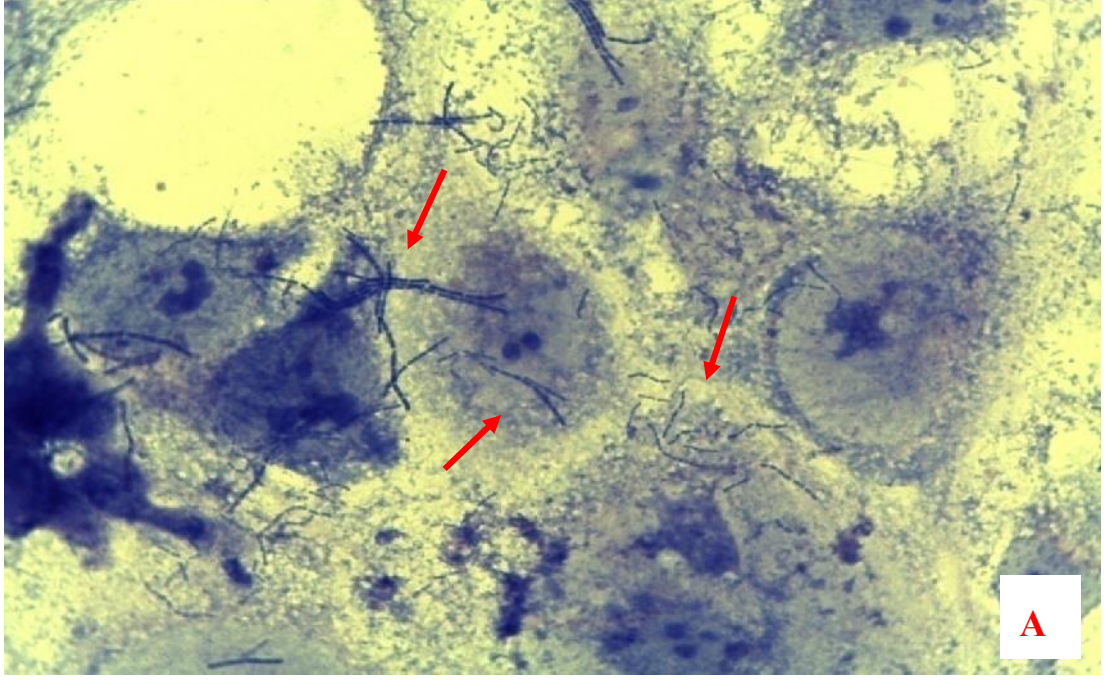
Şekil 4.19. CCL-221 hücre hattına kültürlerin tutunma kapasitesi (%) ■ KLA sentezi olmadığında ■ KLA sentezi olduğunda



Resim 4.15. *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* S28 suşunun hücre hatlarında adezyon yeteneği A) Caco-2 B) CCL-221



Resim 4.16. *P. thoenii* S72 suşunun hücre hatlarındaki adezyon yeteneği A) Caco-2 B) CCL-221



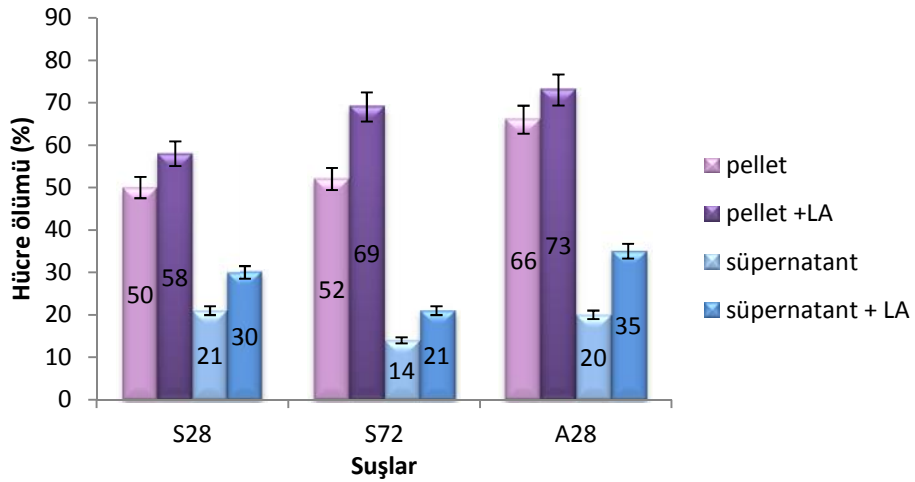
Resim 4.17. *B. breve* suşunun hücre hatlarında adezyon yeteneği A) Caco-2 B) CCL-221

4.8. Antikanserojenik Etki

Çalışmada antikanserojenik etkinin belirlenmesi için tripan mavi ile boyama yöntemi kullanılmıştır. Linoleik asitli ve linoleik asit olmayan ortamlarda geliştirilen bakterinin pelleti (11 log cfu/ml) ve bu ortamlarda bakteri tarafından sentezlenmiş metabolitlerin bulunduğu süpernatantın etkisine bakılmıştır.

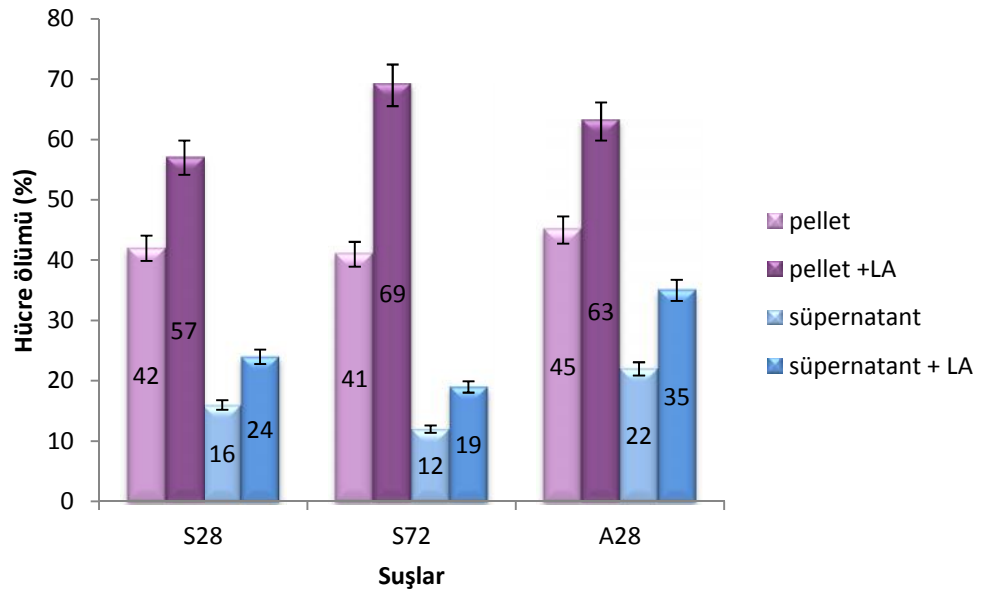
Hem süpernatant hem de pelletlerde antikanserojenik etki gözlenmekle birlikte, canlı bakteri hücresinin kullanıldığı pellet aktivitesinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. KLA sentezi ile bütün suşların hücre hatları üzerindeki antikanserojenik etkisinin arttığı belirlenmiştir. Suşlar iki hücre hattı üzerinde de benzer öldürme etkisi göstermekle birlikte, *B. breve* A28 pelletinin LA ilavesi olan ortamda Caco-2 üzerindeki etkisinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Caco-2 hücre hattı ile yapılan çalışmada en yüksek etkinin canlı hücre pelletinde % 66 ile *B. breve* A28 suşunda olduğu, KLA sentezi ile kanserojenik etkinin % 73'e arttığı gözlenmiştir. *P. thoenii* S72 suşunda % 52 hücre ölümü gözlenirken KLA sentezi ile antikanserojenik etkinin % 17 artarak % 69'a yükseldiği tespit edilmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.20. Yüksek KLA sentezleme yeteneğine sahip bakterilerin Caco-2 hücre hattı üzerindeki antikanserojenik etkisi.

CCL-221 hücre hatları üzerinde canlı hücre pelleti ile yapılan çalışmada, üç suşun antikanserojenik etkisinin S28 (% 42), S72 (% 41) ve A28 (% 45) KLA sentezi olmadığı durumda hemen hemen aynı olmakla birlikte *B. breve* A28 suşunda daha fazla olduğu bulunmuştur. KLA sentezi olduğunda en yüksek etki ve en yüksek artışı *P. thoenii* S72 (% 41'den % 69'a) göstermiştir. Süpernatant grubunda ise en fazla etki ve artış *B. breve* A28 (% 22'den % 35'e) suşunda görülmüştür. Canlı bakterinin süpernatanta göre çok daha yüksek etki ettiği belirlenmiştir (Şekil 4.22).



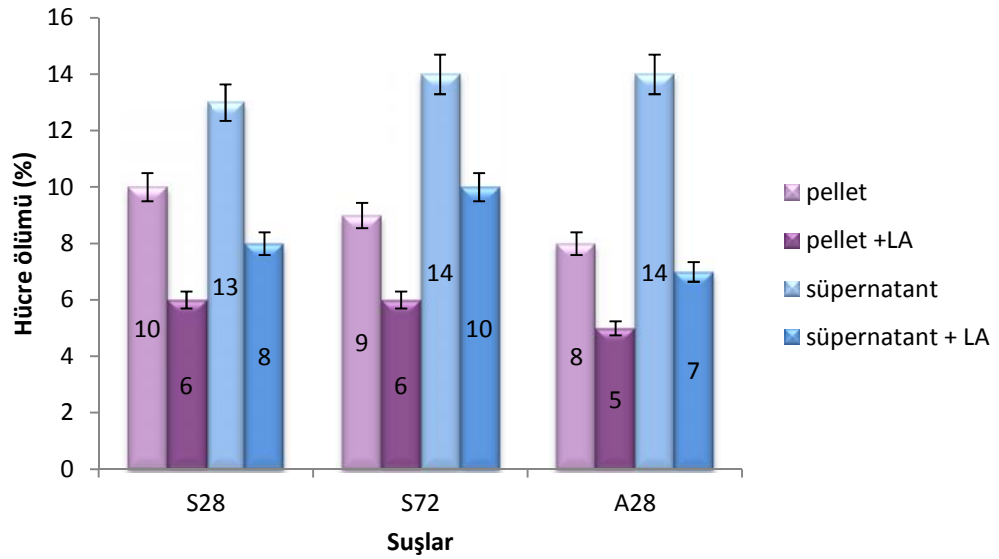
Şekil 4.21. Yüksek KLA sentezleme yeteneğine sahip bakterilerin CCL-221 hücre hattı üzerindeki antikanserojenik etkisi.

Probiyotik olarak kullanılacak bakterilerin kanser hücreleri üzerindeki antikanserojenik etkisi olumlu bir özelliktir. Fakat bununla birlikte sağlıklı hücre hatları üzerindeki etkisi de bilinmelidir. Bu bakteri kültürlerinin kullanılabilmesi için sağlıklı hücrelere zarar vermemesi gerekmektedir. Bu sebeple kontrol olarak bakteri kültürlerimizi sağlıklı fibroblast hücre hattı ile muamele ederek sitotoksik etkisine bakılmıştır.

Bakteri kültürleri kanser hücre hatları üzerinde çok yüksek etkiler S28 (% 58), S72 (% 69) ve A28 (% 73) gösterirken, fibroblast üzerindeki öldürme oranı en yüksek % 14 olmuştur. Diğer sonuçların aksine fibroblastlarda süpernatantın öldürücü etkisi

pelletin etkisinden yüksek bulunmuştur. Yine önceki çalışmaların aksine ortamda KLA bulunması ile hem süpernatant hem de pelletlerde hücre ölümü artmayıp azalmıştır. Normal koşullarda % 10 hücre ölümüne sebep olan S28 pelleti KLA sentezi olduğunda % 6 oranında öldürmüştür (Şekil 4.23).

Bu sonuçlar, elimizdeki probiyotik olması muhtemel suşların kanser hücreleri üzerinde öldürücü etki gösterdiği halde, seçici davranıp sağlıklı hücreleri öldürmediğini göstermektedir. Sentezlettiğimiz KLA'nın da kanser hücrelerinde ölmesini artırırken, sağlıklı hücrelerde ölümü azalttığını göstermiştir. Ayrıca kanserli hücelere göre sağlıklı hücrelerde ölüm oranının epey düşük olması sağlıklı hücrelerde bu bakterilerin kullanımına bağlı herhangi bir olumsuz etkisinin olmayacağını göstergesi olmuştur.



Şekil 4.22. Yüksek KLA sentezleme yeteneğine sahip bakterilerin fibroblast hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Linoleik asidin pozisyonel ve geometrik izomeri olan KLA' nın insan sağlığı üzerinde pek çok olumlu etkileri bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar KLA' nın antikanserojenik, antiaterojenik, antioksidan etkilerinin olduğunu, vücut yağ birikimini önleyip kas gelişimini arttırdığını, immün sistemi düzenlediğini göstermiştir. Bu faydalarının keşfedilmesi KLA' ya olan ilgiyi arttırmış, KLA sentezleme ve KLA' nın sağlık üzerindeki etkileri ile pek çok çalışma yapılmaya başlanmıştır [Wahle ve ark., 2004; Wilson ve ark., 2000].

KLA sentezi için organik sentez, genetik mühendisliği, kimyasal yöntemler ve mikroorganizmalarca gerçekleştirilen biyosentez gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır. Son yıllarda direk mikroorganizmalar veya mikroorganizmaların saf enzimlerinin kullanılması ile KLA sentezlenmesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Biyosentezin tercih edilmesinde, mikroorganizmaların yüksek seçiciliğe sahip olmaları, doğal flora elemanı olmaları, sağlığa faydalı etkilerinin olması gibi avantajları rol oynamaktadır. [Bayaz ve Mehenktaş, 2005; Lin ve ark., 2003]. Biyosentezde probiyotik olarak bilinen bakterilerin kullanılmasıyla KLA sentezleyebilen bu probiyotik bakteriler hem kendi sahip oldukları yararlı etkileri hem de sentezledikleri KLA ile konakçının sağlığı üzerinde olumlu etkiler gösterebilecektir.

Probiyotikler, insan ve hayvanların doğal mikroflorasına ait özellikleri geliştiren tek veya karışık mikroorganizma kültürleridir [Marteau ve ark., 2002 ; Fuller,1989]. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaların en önemlileri laktobasiller ve bifidobakterilerdir [Rada ve Petr, 2002]. Bu bakterilerin kullanımlarının avantajlarıyla ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Ancak son zamanlarda yapılan probiyotik çalışmaları propiyonibakterilerin de bu bakteriler kadar önemli olduğunu göstermiştir. Propiyonibakterilerin in vitro ve in vivo koşullarda apoptozu indükleyerek kolon kanserini engellediği [Lan ve ark., 2008, Jan ve ark., 2002], serum kolesterolünü düşürdüğü [Hatakka ve ark., 2008, Somkuti ve Johnson, 1990],

immün sistemi geliştirdiği [Perez-Chaia ve ark., 1995] yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

Klasik propiyonibakteriler genel olarak süt ve fermente süt ürünlerinde bulunurlar. Özellikle peynirlerde starter kültür olarak bulunup peynirlerdeki deliklerden ve tat oluşumunda rol oynarlar [Tilsala-Timisjärvi ve ark. 2001]. Bu sebeplerden dolayı çalışmamızda delikli yapıya sahip el yapımı peynirler kullanılmıştır. Peynirler seçici besiyerine ekilip muhtemel kolonilerden propiyonibakter izolasyonu yapılmıştır. Seçilen kolonilerin ön tanımlama testleri yapılmış ve propiyonibakter olduğu belirlenenler muhafazaya ve ileriki deneylere alınmıştır. Çalışmada kullanılan farklı köy ve kasabalardan temin edilmiş 78 adet peynirden sadece 24 tanesinde propiyonik asit bakterisine rastlanılabildiği görülmüştür. Ağırlıklı olarak İzmir ve Balıkesir'den temin edilen peynirlerden izolasyon yapılabildiği görülmüştür. Kalecik köy peynirleri, İzmir köy, İzmir teneke tulum ve Kırşehir künefe peynirlerinden birden fazla propiyonik asit bakterisi izole edilirken diğer peynirlerden birer izolasyon yapılabildiği görülmüştür. Koloni morfolojilerinde ufak farklılıklar bulunmakla birlikte izole edilen bu suşlar aynı tür bulunmuştur. Aynı morfolojiye sahip kolonilerden tek izolat alınmıştır. Peynir örneklerindeki propiyonibakter canlılık miktarları (\log_{10} cfu/g) YELN besi ortamında $2,58 \pm 0,1$ - $7,25 \pm 0,07$ arasında bulunmuştur. Diğer peynirlerde üreme olmakla birlikte buralardan alınan kolonilerin genellikle maya, laktobasil ve kok olduğu görülmüştür. Propiyonik asit bakterilerinin peynirlerde bulunma oranının mevsimlere göre değiştiği, en yoğun bulunduğu mevsimin ilkbahar olduğu gözlenmiştir (data verilmemiştir). Bu farklılığın beslenme ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

Peynirler ile yapılan pek çok çalışmada alttür bazına inilmeden baskın türün *P. freudenreichii* olduğu söylenmiştir. Noel ve arkadaşları (1999), Emmental peyniri ile yaptıkları çalışmada baskın türün *P. freudenreichii* olduğunu bununla beraber diğer 3 türe; *P. jensenii*, *P. acidipropionici* ve *P. thoenii* de süt ve peynirde rastlanılabileceğini söylemişlerdir. Fessler ve arkadaşları (1997), standart propiyonibakter kültürleri olan *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii* ATCC 6207, *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* ATCC 9614 ve *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* DSMZ 20270 suşlarının tanımlamasını RFLP (Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi)

ve 23S rRNA analizi ile yapmışlardır. Çalışma sonucunda suşları alttüre inmeden *P. freudenreichii* olarak tanımlayabilmişlerdir. Bununla beraber Smit (2004) peynirlerde bulunan mikroorganizmalardan bahsederken Swiss ve Maasdam tipi peynirlerde *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* bulunduğundan bahsetmiştir. Başka bir çalışmada Blasko ve arkadaşları (2011) kültür koleksiyonlarında bulunan peynir izolatu 100 adet propiyonibakteri suşlarını; 1 *P. acidipropionici*, 1 *P. jensenii*, 29 *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii* ve 69 *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* olarak belirtmiştir. Tüm bu veriler ışığında peynirlerde baskın olarak *P. freudenreichii* türü bulunduğu ve sonuçlarımızın bununla uyumlu çıktığı görülmüştür

Ön tanısı konulan 32 izolatın tanımlanması için klasik, ileri biyokimyasal ve moleküler tanımlama çalışmaları yapılmıştır. Klasik tanımlamada yapılan manuel şeker testlerinin, fizyolojik ve biyokimyasal testlerin sonuçları Bergey's Manual of Systematic Bacteriology kitabındaki sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. Bu tanımlamaların sonucunda 32 izolatın 24 adedi *P. freudenreichii* ssp. *shermanii*, 4 adedi *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii*, 1 adedi *P. jensenii*, 2 adedi *P. acidipropionici* ve 1 adedi *P. thoenii* olarak tespit edilmiştir. İleri biyokimyasal tanımlamada izolatların ve standart DSMZ kültürlerinin API sonuçları NTSYSpc 2.0 programında değerlendirilmiştir. Tanımlama sonuçları Bergey's ile tür bazında aynı olup % homoloji bakımında daha yüksek bulunmuştur. Moleküler tanımlama sonuçları diğer tanımlama sonuçlarıyla tür bazında uyumluluk göstermekle birlikte alttür bazında farklılık göstermiştir. Klasik ve ileri biyokimyasal tanımlama sonucunda *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii* olarak tanımlanan türler moleküler tanımlamada daha yüksek homoloji ile (% 96 - 99) *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* olarak tanımlanmıştır. Moleküler tanımlamada *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* bulunan türler toplamda 1470 bp ile NCBI gen bankasında taranmıştır. Hiçbir sonuçta *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii* rastlanılamamıştır (Bkz. Çizelge 4.5). Yapılan birçok çalışma API sonuçlarının moleküler tanımlama ile örtüşmediği söylenmektedir. (Alttür düzeyindeki çalışmalar netlik kazanmış olmamakla beraber yapmış olduğumuz moleküler analizde hiçbir primer için *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii* kültürüne rastlanılmaması, moleküler tanımlama sonuçlarının daha

yüksek homoloji göstermesi ve API sonuçlarının güvenilir olmaması sonucunda izolatlarımızın *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* olduğuna karar verilmiştir.

KLA sentezleme yeteneklerinin belirlenebilmesi için bütün suşlar 500 µg/ml LA ve 10 mg/ml ayçiçeği yağı içeren ortamlara inoküle edilerek uygun şartlarda geliştirilmiştir. Yapılan çalışmada tüm suşlarda hem LA hem de ayçiçeği yağı içeren ortamda KLA sentezleme gözlenmiş, ancak suşlara bağlı olarak KLA miktarlarında farklılık olduğu belirlenmiştir. Bifidobakteriler içerisinde *B. breve* A28 suşunun % 30 (150 µg/ml), propiyonibakterilerden *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* S28 suşunun % 28 (141 µg/ml) ve laktobasillerden *L. rhamnosus* GD11 suşunun % 24 (121 µg/ml) en yüksek KLA sentezleme yeteneğinde olduğu bulunmuştur. Türler arasında çok büyük farklılıklar bulunmayıp, bifidobakterilerin % 26 - 30, laktobasillerin % 23 - 24 ve propiyonibakterilerin % 14 - 28 oranında sentez yapabildiği bulunmuştur. Çalışmamızda kullanılan laktobasil ve bifidobakter örnekleri daha önceden izole edilmiş olup birçok çalışmada yüksek sonuç vererek öne çıkmış suşlardır. Propiyonibakteriler yeni izole edilip ilk kez kullanılmaktadır. En yüksek % 25 - 28 oranlarında KLA sentezleme yeteneği göstermeleri, propiyonibakterilerin bifidobakterilere yakın laktobasillerden daha iyi yetenekte olduklarını düşündürmektedir. Probiyobiyotik kültürlerden bifidobakterilerin, laktobasillerin ve propiyonibakterilerin KLA sentezleme yetenekleri ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır. Oh ve arkadaşları (2003), 500 µg/ml LA içeren MRSc besiyerinde *B. breve* suşunun 160 µg/ml (% 32) ve *B. pseudocatenulatum* suşunun 135 µg/ml (% 27) KLA sentezlediğini söylemişlerdir. Oh ve arkadaşlarının (2003) çalışma koşulları bizim çalışmamızdaki ile aynıdır ve çıkan sonuçlar da çok yakındır. Başka bir çalışmada 500 µg/ml LA içeren ortamda laktokok, laktobasil ve pediokoklarda KLA sentezi olmazken, *B. breve* suşununun % 72 (% 66 c-9, t-11 KLA ve % 6,21 t-9,t-11 KLA) ve % 43 (% 40,7 c-9, t-11 KLA ve % 2,87 t-9,t-11 KLA) oranında KLA sentezleyebildiği söylenmiştir. Bu çalışmada laktobasillerde sentezleme görülmemiştir fakat bizim çalışmamızda % 23 - 24 arasında sentez yapabildikleri görülmüştür. Aynı şekilde Kishino ve arkadaşlarının (2003) yaptığı çalışmada da laktobasillerin % 1,4 - 68,2 oranında sentez yapabildiği söylenilmiştir. Peynir (SMP) ve gaita (GD11 ve LA3) izolatu laktobasiller arasında KLA sentezlemede farklılık

olmadığı görülmüştür. Propiyonibakterilerin KLA sentezleme yetenekleri ile ilgili çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Fakat yapılan çalışmalar KLA sentezleyebildiklerini göstermektedir [Raino ve ark., 2002; Wang ve ark., 2007]. Çalışmamızda izole edilen propiyonibakter kültürlerindeki KLA sentezi, en yüksek *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* S28'de LA'lı ortamda % 28, ayçiçekli ortamda % 12 görülürken, en düşük KLA sentezi *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* S21'de (LA'lı ortamda % 14, ayçiçekli ortamda % 8) bulunmuştur.

KLA sentezi ticari saf LA ile yapılabildiği gibi LA içeren kastor, ayçiçeği, balık yağı ve risinoleik asit gibi farklı kaynaklar kullanılarak da yapılabilmektedir. Bu yağlar yüksek oranlarda LA içermeleri ve ucuz olmaları sebebiyle kullanılmaktadırlar. Laktobasillerle yapılan bir çalışmada kastor yağından 2,5 - 7,5 mg/ml KLA sentezlenirken, LA kullanıldığında sentezin 20 - 40 mg/ml olduğu bulunmuştur [Ogawa ve ark., 2005]. Wang ve arkadaşlarının (2007) yaptığı çalışmada 12 mg/ml ayçiçeği yağı içeren besiyortamında en yüksek KLA üretimini *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* (CGMCC 1.2227) ile 78,8 µg/ml (yaklaşık %1) bulmuşlardır. Başka bir çalışmada ise alfaalfa yağı kullanılmış ve % 40 oranında sentez görüldüğü söylenmiştir. Çalışmamızda 10 mg/ml ayçiçeği içeren ortamda % 8 - 14 arası KLA sentezlenebilmiştir. Çalışmalardaki sonuçların birbirinden çok farklı olması sebebiyle sonuçlarımızı kıyaslamak mümkün olmamıştır. Fakat ayçiçeği yağından sentezlenen KLA miktarının LA'dan sentezlenen miktarın çok altında olduğu görülmüş ve çalışmanın ilerleyen aşamalarında ayçiçeği yağı kullanılmamış, sadece LA ile devam edilmiştir. Ayçiçeği yağındaki sentezin düşük olması içerdiği LA miktarının % 60 - 70 olması, bu LA'nın tam olarak kullanılamaması, yağ içeriğindeki diğer maddelerin sentezi olumsuz etkilemesi gibi sebeplerden olabileceği düşünülmektedir.

Gelişim eğrisi bir bakterinin en aktif, en canlı olduğu evreleri, durgunluk zamanı ve ne zaman ölmeye başladığı hakkında bilgi verdiği için bakteriyi tanımak açısından önemlidir. Bu sebepten çalışmalara başlamadan önce KLA sentezleme yeteneği yüksek farklı tür iki propiyonibakter suşu ile gelişim eğrisi çıkarılmıştır. Propiyonibakteriler için logaritmik fazın 24 - 48. saatler arası olup en yüksek

canlılığın iki bakteri için de 60. saatte olduğu bulunmuştur. Canlılığın yanı sıra bakteri yoğunluğu, pH ve % asitlik takibi de yapılmıştır. Canlılık iki suş için de aynı saatlerde en yüksek olmakla birlikte besiyerindeki yoğunluk artışı suşlar arasında farklılık göstermiştir. Besiyeri yoğunluğu *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* S28 için 84. saatten sonra, *P. thoenii* S72 için ise 72. saatten sonra sabitlenmiştir. Bu saatlere kadar bakterilerin gelişimi devam etmiş bu saatlerden sonra gelişim durmuştur. Spektrofotometrik ölçüm yapıp canlı - ölü ayrımı yapılmadığı için azalma görülmeyip değerler sabitlenmiştir. pH'nın inkübasyon süresince gittikçe düştüğü % asitliğin arttığı görülmüştür. pH'daki düşme ve asitlikteki yükselmenin bakteri gelişimi ile orantılı olduğu bulunmuştur. Bakterinin karbonhidrat metabolizması sonucunda sentezlenen asitler ortamın pH'sını düşürmüştür. Canlılığın durmasıyla birlikte pH-asitlik miktarları da sabitlenmiştir.

Gelişim eğrisinden sonra KLA miktarının en yüksek seviyede olması için inkübasyon süresi, sıcaklık, pH, LA konsantrasyonu ve inülin prebiyotiği gibi çeşitli parametreler denenerek optimizasyon yapılmıştır. KLA sentezinin en yüksek olduğu koşullar 100 µg/ml LA içeren ortamda propiyonibakteriler için 30°C, pH 6,8 72 saat inkübasyon ve bifidobakteri için 37°C, pH 6,8 48 saat inkübasyon olarak bulunmuştur. Sonuçlar KLA sentezinin bakteri gelişimi ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir. Bunun dışında enzim aktivitesinin önemli bir diğer etmen olduğu düşünülmektedir. KLA sentezinin olabilmesi için linoleik asit izomeraz enzimine ihtiyaç vardır. Enzimlerin sıcaklık, pH aralıklarına duyarlı olduğu göz önüne alındığında uygun olmayan pH ve sıcaklıklarda enzim aktivitesinin azaldığı buna bağlı KLA sentezinin etkilendiği düşünülmektedir. İnülin varlığında KLA sentezinin arttığı fakat bu artışın direk KLA sentezi ile ilgili olmayıp bakteri gelişimini arttırarak gerçekleştiği görülmüştür.

KLA'nın immün sistemi düzenleyici, obeziteyi, kalp krizini önleyici, antioksidan ve antikanserojen özelliğe sahip olduğunun bulunmasıyla KLA'ya olan ilgi artmış bu konuda pek çok çalışma yapılmıştır. [Barrett ve ark., 2007]. Çalışmamızda probiyotik olması muhtemel suşların LA varlığında sentezleyeceği KLA'nın

kolesterol düşürücü, antioksidan, adezyon ve antikanserojenik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamız bu düzeyde yapılan ilk çalışmadır.

Yapılan çalışmalar probiyotik bakterilerin ve KLA'nın kolesterol düşürücü etkilerinin olduğunu göstermektedir. Ancak bu çalışmalarda ticari saf KLA izomerleri kullanılmaktadır. Çalışmamızda probiyotik olması muhtemel kültürler kullanılarak, ortama LA eklenmesiyle KLA sentezletirilmiştir. Daha sonra sentezlenen bu KLA'nın kolesterol giderici ve bakterilerin kolesterol giderici etkileri üzerindeki etkisine bakılmıştır. Denemeler yüksek KLA sentezleme yeteneğine sahip *B. breve* A28, *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* S28, *P. thoenii* S72 ve düşük KLA sentezleme yeteneğine sahip *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* S21, S77 ve S78 suşları ile yapılmıştır. Bütün suşların ortamdaki kolesterolü farklı miktarlarda giderdiği görülmüştür. Ortama LA konulmasıyla yüksek KLA sentezleme yeteneğindeki suşların yüzde kolesterol giderimlerinde ciddi bir artış olduğu gözlenmiştir. Kolesterol gideriminin S28 suşunda % 33'den % 47'ye, A28 suşunda % 27'den % 38'e kadar artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu artışın % 14 – 15 oranında olduğu düşük KLA sentezleyenlerde ise en fazla % 6 olduğu bulunmuştur. Kolesterol giderimindeki bu artışın KLA sentezi ile ilişkili olduğu dikkat çekmektedir. Sonuçlar kolesterol giderici etkinin bakterilerce sentezlenen KLA ile arttırılabileceğini göstermiştir.

KLA'nın antioksidan etkisini gösteren çalışmalar bulunmakla birlikte antioksidan etki göstermediğini, prooksidan olabileceğini söyleyen çalışmalar da mevcuttur. Chen ve arkadaşları (1997), KLA'nın 90°C'de ısıtıldığında kanola yağı üzerinde prooksidan olduğunu söylemişlerdir. Bu çalışmanın aksine birçok araştırmacı KLA'nın antioksidan etkisini vurgulamış ve bunun antikanserojenik etkisi ile bağlantılı olabileceğini söylemişlerdir. Ha ve arkadaşları (1990) KLA'nın metal şelatlama aktivitesini çalışmışlar, etkili bir antioksidan olduğunu ve alfa tokoferolden daha etkili olduğunu söylemişlerdir. Ip ve arkadaşları (1991) KLA'nın memeli dokularındaki thiobarbiturik asit reaktif madde (TBARS) formasyonunu azaltarak oksidasyonu engelleyebileceğini söylemişlerdir. Probiyotikler ile yapılan çalışmalar, probiyotiklerin farklı mekanizmalarla antioksidan ve antikanserojen etkileri

olduğunu göstermiştir. KLA sentezi de bu mekanizmalar arasında sayılmaktadır [Wilson ve ark., 2000]. Bu çalışmalarda ticari saf KLA kullanılmıştır. Besiyatına LA ve bakteri eklenmesiyle sentezlenecek KLA'nın antioksidan etkisinin belirlenmesi bu düzeyde yapılan ilk çalışmadır. Probiyotik mikroorganizmaların antioksidan etkilerinin belirlenmesi için genel olarak DPPH serbest radikali giderme, metal iyonlarını şelatlama ve lipid peroksidasyonunu inhibe etme özellikleri analiz edilmektedir [Lin ve Chang, 2000; Ebrahimzadeh ve ark.,2008]. Bakterilerle yapılan antioksidan çalışmalarda 9-11 log cfu/ml gibi yüksek miktarda bakteri oksidan madde ile muamele edilerek direk canlı bakterinin etkisine bakılmaktadır. LA ilave edilerek teşvik edilen KLA sentezi süpernatantta gerçekleşmektedir. Bundan dolayı çalışmamızda pelletin yanı sıra süpernatantın da antioksidan etkisine bakılmıştır. Çalışma yüksek KLA sentezleme yeteneğine sahip *B. breve* A28, *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* S28, *P. thoenii* S72 ve düşük KLA sentezleme yeteneğine sahip *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* S21, S77 ve S78 suşları ile yapılmıştır. Tüm suşların farklı miktarlarda antioksidan etki gösterdiği bulunmuştur. KLA sentezine bağlı antioksidan etkinin artış gösterdiği yüksek KLA sentezleyen suşlardaki artışın daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Serbest radikal giderme etkisi biyolojik süreçlerde ve gıda endüstrisinde serbest radikallerin zararlı etkilerinden dolayı çok önemlidir. Değişik kimyasallarda ve antioksidan olduğu düşünülen gıda katkılarında antioksidan aktivitenin belirlenmesi için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Kimyasal denemeler sentetik serbest radikallerin giderimine dayanmaktadır. DPPH radikali giderme etkisi en çok kullanılan spektrofotometri yöntemlerden birisidir [Gülçin ve ark., 2007]. Denenen tüm suşların hem pellet hem de süpernatantlarının DPPH giderici etkisinin dolayısıyla antioksidan etkisinin olduğu belirlenmiştir. Ancak LA'ye bağlı sentezlenen KLA'nın DPPH giderici etkiyi arttırdığı görülmüştür. LA ilavesine bağlı olarak en yüksek DPPH gideriminin % 62'den % 73'e artarak *B. breve* A28 suşunun pelletinde olduğu belirlenmiştir. Süpernatanttaki giderimin ise KLA sentezi ile % 57'den % 65'e yükseldiği bulunmuştur. Canlı bakterinin daha etkili olduğu görülmüştür. Yüksek KLA sentezleme yeteneğindeki suşların DPPH giderimi KLA sentezi ile % 6

- 11 arasında artış gösterirken bu oranın düşük KLA sentezleyen suşlarda % 2 – 4 arasında olduğu tespit edilmiştir.

Fe⁺² şelatlama, çalışılan tüm suşlarda görülmekle birlikte yüksek KLA sentezleme yeteneğine sahip suşlarda KLA sentezine bağlı şelatlama etkisindeki artışın daha fazla olduğu olduğu tespit edilmiştir. En yüksek etkinin KLA varlığında *P. thoenii* S72 suşunun süpernatantında olduğu, KLA sentezi ile % 47'den % 56'ya arttığı bulunmuştur. Diğer antioksidan çalışmaların aksine en yüksek etki süpernatantta görülmüştür. En yüksek etki süpernatantta görülmekle birlikte KLA sentezi ile bağlantılı Fe⁺² şelatlama artışı en fazla pelletlerde görülmüştür. Yüksek miktarda KLA sentezleyen suşlarda KLA sentezi ile şelatlama etkisindeki artış süpernatantta % 7 – 9 oranındayken, pellette % 15 – 19 oranında olduğu bulunmuştur. Sonuçlar KLA sentezinin canlı bakteri üzerinde daha etkili olduğunu göstermektedir. Lipid peroksidasyonunun inhibisyonunda en yüksek etki artışı pellette (% 9), süpernatantta (% 8) ile *P. thoenii* S72 suşunda görülmüştür.

Antioksidan çalışma sonucunda suşlarımızın farklı oranlarda olmakla birlikte antioksidan yetenekte oldukları bulunmuştur. KLA sentezi ile çok ciddi bir artış olmamakla birlikte antioksidan etkinin arttığı gözlenmiştir. Suşlarımızın antioksidan yeteneğinin yanı sıra KLA sentezleme yeteneğinde olmaları gıda ve probiyotik uygulamalarda kullanıldıklarında pek çok etkiyi bir arada gösterebileceklerini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte Wilson ve arkadaşları (2000) antioksidan etki ile antikanserojenik etkinin bağlantılı olduğunu söylemişlerdir. Bu da suşlarımızın antikanserojenik etkinliğe de sahip olabileceğini göstermektedir.

Bir bakterinin probiyotik olabilmesi için önemli kriterlerden biri bağırsak epitel hücrelerine tutunabilmesidir. İmmün sistemin düzenlenmesi, patojenlerle rekabet gibi konak sağlığına faydalı etkilerinin gösterilebilmesi için bakterinin tutunmuş olması gerekmektedir. İn vivo çalışmalar çok zor olduğu için bu çalışmalarda genellikle insan bağırsak hücresi benzeri Caco-2 hücre hattı kullanılmaktadır [Huang ve Adams, 2003]. Bifidobakteriler ve laktobasillerin adezyon yetenekleri ile birçok çalışma bulunmaktadır ve bu kültürlerin yüksek yetenekte tutunma kabiliyeti

gösterdiğini söylemektedir. Propiyonibakteriler az olmakla birlikte insan bağırsağında bulunmaktadırlar. İzolatlarımız peynir kaynaklıdır ve probiyotik olarak önerilebilmeleri için adezyon yeteneklerinin bilinmesi gerekmektedir. Huang ve Adams (2003) Caco-2 hücre hattı ile yaptıkları çalışmada elektron mikrokobisi incelemeleri sonucu *P. freudenreichii* ve *P. acidipropionici* suşlarında adezyon olmadığını sadece *P. jensenii* 702 suşlarının adezyon yeteneğinde olduğunu söylemişlerdir. İn vivo çalışmalar klasik propiyonibakterilerin yüksek tutunma gösterdiğini söylemiştir [Zarate ve ark., 2002; Zarate ve ark., 2002; Zarate ve ark., 2004]. Çalışmamızda üç suşumuz da hem Caco-2 (S28 % 44, S72 % 52, A28 % 58) hem de CCL-221 (S28 % 29, S72 % 29, A28 % 32) hücre hattı üzerinde tutunabildiği tespit edilmiştir. KLA sentezi ile tutunma kuvvetleri artış göstermiştir. En yüksek tutunma ve artış Caco-2 hücre hattı üzerinde A28 suşunda bulunmuştur. Sonuçlar gıda kaynaklı bu propiyonibakteri ve insan kaynaklı bifidobakteri suşlarının diyetle alındıklarında bağırsakta tutunabileceklerini ve bu sayede konakçıya fayda verebileceklerini göstermiştir.

Adezyon sonuçları suşların Caco-2 hücre hattında daha iyi tutunabildiğini göstermiştir. Antikanserojenik çalışma sonuçları adezyon ile bağlantılı olup Caco-2 hücrelerindeki antikanserojenik etkinin CCL-221 hücre hattından daha yüksek olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde CCL-221 hücre hattında aynı kuvvetle tutunan S28 ve S72 suşlarının CCL-221 hücre hattındaki öldürücü etkileri de yakın, A28 suşunun ise daha yüksek etki ettiği bulunmuştur. Sonuçlar adezyon yeteneği ile antikanserojenik etki arasında ilişki olduğunu ve suşların daha fazla tutunmasıyla antikanserojenik etkilerinin artabileceğini göstermiştir. Sentezlenen KLA'nın suşların tutunma yeteneklerini arttırdığı bulunmuştur. Suşlar hem daha fazla tutunarak hem de sentezledikleri KLA'nın antikanserojenik etkisi ile kanser hücrelerini öldürdüğü düşünülmektedir.

KLA'nın göğüs kanseri MCF-7, prostat, hepatoma, gastrik kanser gibi farklı kanser hücre hatlarına etkisi ile çalışmalar bulunmakla birlikte sıklıkla kolon kanser hücre hatları üzerindeki antikanserojenik etkisini gösteren çalışmalar yapılmaktadır. Bunun sebebini Kelley (2007) diyetle alınan KLA'nın ilk olarak yoğun dozlarda intestinal

sistem ile karşılaşması ve bu yüzden bağırsaktaki fonksiyonu ve bunun sağlığa olan etkilerinin önemli olduğu şeklinde açıklamaktadır. Kullandığımız kültürlerin probiyotik olması ve intestinal sistemde bulunması sebebiyle çalışmamızda kolon kanser hücre hatları kullanılmıştır. Sentezlenen KLA'nın göstermiş olduğu antikanserojenik etkinin mekanizması tam bilinmemekle birlikte çeşitli görüşler ileri sürülmektedir. Murphy ve arkadaşları (2007), KLA izomerlerinin bağırsaklarda çok etkili bir biyoaktif bileşik olduğunu, çeşitli mekanizmalarla dolaylı ya da doğrudan intestinal sistemi etkilediğini söylemişlerdir. İnsan bağırsak epitelyum benzeri Caco-2 hücre hatları ile yaptıkları çalışmada t-10,c-12 izomerinin yüksek apoptoz yeteneğinde olduğunu söylemişlerdir. Başka bir kolon kanser hücre hattı olan HT-29 ile yapılan bir çalışmada t-10,c-12 izomerinin DNA replikasyonunda ve hasar onarılmasında rol oynayan p21 protein seviyesini düşürerek hücrelerinin gelişimini engellediğini c-9,t-11 izomerinde etki görülmediğini söylemişlerdir [Limdo ve ark., 2005]. Kanser hücreleri üzerinde bu kadar yüksek öldürücü etkiye sahip suşlar kontrol amaçlı kullanılan sağlıklı fibroblastlar üzerinde ölüme sebep olmamıştır. % 4- 10 gibi düşük miktardaki ölümlerin de hücrenin doğal ölümü olabileceği düşünülmektedir. KLA sentezi ile ölüm oranı daha da azalma göstermiştir

Sonuç olarak çalışmamızda kullandığımız *P. freudenreichii* ssp. *shermatii* S28, *P. thoenii* S72 ve *B. breve* A28 suşlarının yüksek kapasitede KLA sentezleyebildikleri tespit edilmiştir. Sentezledikleri KLA, suşların sahip oldukları kolesterol düşürücü, antioksidan, adezyon ve antikanserojenik özelliklerinin etkisini arttırdığı belirlenmiştir. Suşlarımızın antikanserojenik özellik gösterirken sağlıklı hücre hattına zarar vermedikleri görülmüştür. Literatürler probiyotik olarak kullanılabilen bakteriler olarak özellikle bifidobakterileri öne çıkarmaktadır. *Bifidobacterium breve* A28 suşu bu amaçla önerilebilecek düzeydedir.

Probiyotik çalışmalarda genellikle bifidobakteriler ve laktobasiller kullanılmaktadır. Çalışmamızda propiyonibakterilerin en az bu kültürler kadar etkili olduğu ve probiyotik çalışmalarda kullanılabilen bulunduğunu. Bunun yanı sıra propiyonibakterilerin probiyotik olarak kullanılmasa bile bu yararlı etkileri esas

alınarak starter olarak kullanıldıklarında, elde edilen gıda ürünlerinin kalitesini arttıracaktır.

Bu çalışmada öne çıkan suşlar gıda ve probiyotik uygulamalarda kullanılabilir. Bu suşlar gıdalarda özellikle süt ürünlerinde starter kültür olarak kullanıldıklarında hem ürünlerdeki KLA miktarını arttıracak hem de tüketilmeleriyle konakçıya yarar sağlayacaklardır. Probiyotik uygulamalarla diyetle alınan suşlar bağırsakta tutunabilecek ve faydalı etkilerini gösterebilecektir. Tutunan bu suşlar hem probiyotik özellikleri ile hem de sentezlemiş oldukları KLA ile kolesterol düşürücü, antioksidan ve kanser önleyici etkilerini göstereceklerdir. Çalışmamızın bu düzeyde yapılan ilk çalışma olması, Türkiye'nin farklı bölgelerinden temin edilmiş el yapımı peynirlerden izolasyon yapılması ve propiyonibakterilerin özelliklerinin vurgulanması çalışmamıza özgünlük katmaktadır.

KAYNAKLAR

Ahn, Y. T., Kim, G. B., Lim, K. S., Baek, Y. J. and Kim, H. U., “Deconjugation of bile salts by *Lactobacillus acidophilus* isolates”, *Int. Dairy J.*, 13: 303-311 (2003).

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).

Alonso, L., Cuesta, E.P. and Gilliland, S.E., “Production of Free Conjugated Linoleic Acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of Human Intestinal Origin”, *J. Dairy Sci.*, 86: 1941–1946 (2003).

Alp, G., “*Bifidobacterium* cinsi bakterilerin bazı probiyotik özelliklerinin belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 4-43 (2008).

Arda, M., Bazı Önemli Biyokimyasal Testler” , Temel Mikrobiyoloji, *Medisan Yayın Serisi*, Ankara, 294-314 c (2006).

Baer, A. And Ryba, I. “Serological identification of propionibacteria in milk and cheese samples”, *Int. Dairy J.*, 2: 299-310 (1992).

Barrett, E., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., and Stanton, C., “Rapid screening method for analyzing the conjugated linoleic acid production capabilities of bacterial cultures”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2333-2337 (2007).

Bayaz, M. ve Mehenktaş, “Lipid Bazlı Biyoaktif Bileşikler”, *Gıda*, 30 (1) : 31-36 (2005).

Beerens, H., “Year elective and selective insulation medium for *Bifidobacterium* spp.”, *Lett. Appl. Microbiol.*, 11: 155-157 (1990).

Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J.R., Servin, A., “Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 4121-4128 (1993).

Bhattacharya, A., Banu J., Rahman M., Causey J., Fernandes G., “Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease”, *J. Nutr. Biochem.*, 17 : 789–810 (2006).

Blasco, L., Kahala, M., Tupasela, T. and Joutsjoki, V., “Determination of aspartase activity in dairy Propionibacterium Strains”, *FEMS Microbiol. Lett.*, 321: 10–13 (2011).

Blois, M.S., “Antioxidant determinations by the use of a stable free radical”, *Nature*, 181: 1199-1200 (1958).

Bölükbaşı, S.C., “The effect of dietary conjugated linoleic acid(cia) on broiler performance, serum lipoprotein content, muscle fatty acid composition and meat quality during refrigerated storage”, *Br. Poult. Sci.*, 47(4): 470-476 (2006).

Britz,T.J. and Riedel, K.H.J., *Propionibacterium* species diversity in Leerdammer cheese”, *Int. J. Food Microbiol.*, 22: 257-267 (1994).

Carvalho, A.F., Guezenc, S., Gautier, M. and Grimont, P.A.D., “Reclassification of “*Propionibacterium rubrum*” as *P. jensenii*”, *Ins. Pasteu.*, 146: 51-58 (1995).

Champe, P. C. and Harvey, R. A., “Biyokimya”, Tokullugil, A., Dirican, M. and Ulukaya, E., *Nobel Tıp Kitabevi*, istanbul, (1997).

Chen, Z.Y., Chan, P.T., Kwan, K.Y. and Zhang, A., “Reassessment of the antioxidant activity of conjugated linoleic acids”, *J. Ameri. Oil Chemists’ Soci.*, 74 :749–753 (1997).

Coakley, M., Ross, P.R., Nordgren, M., Fitzgerald, G., Devery, R. and Stanton,C., “Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived *Bifidobacterium* species”, *J. Appl. Microbiol.*, 94 :138- 145 (2002).

Corzo, G. and Gilliland, S. E. “Bile Salt Hydrolase Activity of Three Strains of *Lactobacillus acidophilus*”, *J. Dairy Sci.*, 82: 472-480 (1999).

Cummins, C. S. and Johnson, J. L., “Genus 1. *Propionibacterium* Orla-Jensen 1909.,337AL,1346-1353”, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins, (1986).

Çelebi, Ş. ve Kaya, A., “Konjuge Linoleik Asitin Biyolojik Özellikleri ve Hayvansal Ürünlerde Miktarını Arttırmaya Yönelik Bazı Çalışmalar” . *Hayvansal Üretim*, 49(1) : 62- 68 (2008).

Çelik, L., “Konjuge Linoleik Asidin Ruminatlarda Biyosentezi, Fizyoloji ve Lipid Metabolizması Üzerine Etkileri”, *Hayvansal Üretim*, 47(1): 1-7 (2006).

Darılmaz, Önal, D., “Geleneksel türk peynirlerinde propiyonik asit bakteri türlerinin belirlenmesi ve bazı probiyotik özelliklerinin araştırılması”, Doktora Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 4-59 (2010).

De Deckere, E.A.M., Van Amels Woort, J.M.M., Mc Neil, G.R., Jones P., “Effects of conjugated fatty acid(CLA) isomers on lipid levels and peroxisom proliferation in the hamster”, *Bri. J. Nutr.*, 82: 309- 317 (1999).

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

Decker, E. A., Welch, B., “Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food”, *J. Agr. Food Chem.*, 38: 674-677 (1990).

Demirok, E. ve Kolsarıcı, N., “Et ve et ürünlerinde Konjuge linoleik asit ve önemi”, *Gıda*, 35(1): 71-77 (2010).

Drinan, F.D. and Cogan, T.M., “Detection of propionic acid bacteria in cheese”, *J. Dairy Res.*, 59: 65-69 (1992).

Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F., Bekhradnia, A.R., “Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran”, *Afr. J. Biotec.*, 7 (18): 3188-3192 (2008).

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).

Fernández-Espla, M. D. and Fox, P. F., “Effect of Adding *Propionibacterium shermanii* NCDO 853 or *Lactobacillus casei* ssp. *casei* IFPL 731 on Proteolysis and Flavor Development of Cheddar Cheese”, *J. Agr. Food Chem.*, 46 (4): 1228–1234 (1998).

Fuller, R., “Probiotics in man and animals”, *J. Appl. Bacteriol.*, 66 : 365-378 (1989).
Garsse, J., Herreillers, M., Loveren, H.van., Vos, J., And Opperhuizen, A., “Immunomodulation by probiotics: a literature survey” *RIVM report 340320001* :6-33 (2003).

Gilliland, S.E., Nelson, C.R. and Maxwell, C., “Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 49: 377-381 (1985).

Grajek, W., Olejnik, A. and Sip, A., “Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods”, *Acta Biochimica Polonica*, 52: 665- 671 (2005).

Gülçin, İ., Köksal, E., Elmastas, M., Aboul-Enein, H.Y., “Determination of In vitro antioxidant and radical scavenging activity of *Verbascum oreophilum* C. Koch Var. Joannis (Fam. Scrophulariaceae)”, *Res. J. Bio.Sci.*, 2(3): 372-382 (2007).

Gültekin, M., “Probiyotikler”, *ANKEM Derg.*, 15(3): 625-629 (2001).

Hatakka, K., Mutanen, M., Holma, R., Saxelin, M., Korpela, R., “*Lactobacillus rhamnosus* LC705 together with *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS administered in capsules is ineffective in lowering serum lipids”, *J. Am. Coll. Nutr.*, 27(4):441-7 (2008).

Huang, Y. And Adams, M.C., “In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria” , *Int. J. Food Microbiol.*, 91: 253-260 (2004).

Huang, Y., Kotula, L. And Adams, M.C. “The in vivo assessment of safety and gastrointestinal survival of an orally administered novel probiotic, *Propionibacterium jensenii* 702, in a male Wistar rat model” , *Food Chem. Toxicol.*, 41: 1781-1787 (2003).

Hwangbo, J., Kim, H.J, Lee, B.S., Kang, S.W., Chang, J., Bae, H.B., Lee, M.S., Kim, Y.J., Choi, N.J., “Increasing content of healthy fatty acids in egg yolk of laying hens by cheese by product”, *Asian Aust. J. Anim. Sci.*, 19(3): 444-449 (2006).

Ip, C., Chin, S. F., Scimeca, J. A. Ve Pariza, M. W. “Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid”, *Cancer Research*, 51: 6118–6124 (1991).

Ip, C., Scimeca, J.A., Thompson, A., “Effects of timing and duration of dietary conjugate linoleic acid on mammary cancer prevent”, *Nutr. and Cancer*, 24: 241- 247 (1995).

İnternet: “*Lactobacillus* sp.” www.dribrook.blogspot.com (2011).

İnternet: “Emmental peyniri” www.itusozluk.com (2011).

İnternet: “Swiss peyniri” www.lawyersandsettlements.com (2011).

İnternet: “*Bifidobacterium* sp.” www.microbewiki.kenyon.edu (2011).

İnternet: “Mihaliç kelle peyniri” www.scn.wikipedia.org (2011).

İrkin, R., Eren, U.V., “Bazı probiyotik bakterilerin süt ürünlerinde oluşturduğu konjuge linoleik asidin sağlık yönünden önemi”, *Gıda*, 33 (2) : 83- 89 (2008).

Jan, G., Belzacq, A.S., Haouzi, D., “ Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria”, *Cell Death Differ.*, 9:179–188 (2002).

Kailasapathy, K. and Chin, J., “Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp.”, *Immunol. and Cell Bio.*. 78: 80-88 (2000).

Kaplan H., Hutkins, R.W., “Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria”, *Appl. Environ. Microbiol*, 66(6): 2682-2684 (2000).

Kelley N.S., Hubbard N.E. and Erickson K.L., “Conjugated Linoleic Acid Isomers and Cancer”, *J. Nutr.*, 137: 2599–2607 (2007).

Kelly, G. S., “Conjugated linoleic acid: a review” *Alt. Med. Rev.*, 6(4): 367-382 (2001).

Kepler, C.R. ve Tove, S. B., ”Biohydrogenation of unsaturated fatty acids”, *J. Bio. Chem.*, 242, 5686- 5692 (1967).

Kepler, C.R., Hirons, K. P., McNeill, J.J. and Tove, S. B., “Intermediates and products of biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*”, *J. Bio. Chem.*, 241, 1350- 1354 (1966).

Kirjavainen, P.K., Ouwehand, A.C., Isolauri, E., Salminen, S.J., “The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus”, *FEMS Microbiol. Let.*, 167:185-189 (1998).

Kishino, S., Ogawa, J., Yokozeki, K., and Shimizu, S., “Microbial production of conjugated fatty acids”, *Lipid Tech.*, 21: 8/9,177-181 (2009).

Klaver, F. A. M., Van Der Meer, R., “The Assumed Assimilation of Cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* Is Due to Their Bile Salt- Deconjugating Activity”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59 (4): 1120-1124 (1993).

Kodali, V.P. and Sen, R., “Antioxidant and free radical scavenging activities of an exopolysaccharide from a probiotic bacterium”, *Biotech. J.*, 3: 245-251 (2008).

Kong, Q., Lin, C.G., “Oxidative damage to RNA: mechanisms, consequences, and diseases”, *Cell Mol. Life Sci.* 67:1817-1829 (2010).

Köknaroğlu, H., “ Beslenmenin sığır eti konjuge linoleik asit miktarına etkisi”, *J.Animal Produc.*, 48(1): 1-7 (2007).

Kurban, S. ve Mehmetoğlu, İ., “Konjuge Linoleik Asit Metabolizması ve Fizyolojik Etkileri”, *Türk Klinik Biyokimya Derg.*, 4(2): 89-100 (2006).

Lan, A., Bruneau, A., Bensaada M., Philippe, C., Bellaud P., Rabot S. and Jan, G., “Increased induction of apoptosis by *Propionibacterium freudenreichii* TL133 in colonic mucosal crypts of human microbiota-associated rats treated with 1,2-dimethylhydrazine”, *Bri. J. Nutr.* 100: 1251–1259 (2008).

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

Lee, S.O., Hong, G.W., Oh, D. K.,. “Bioconversion of Linoleic Acid into Conjugated Linoleic Acid by Immobilized *Lactobacillus reuteri*,”, *Biotech. Progress* 19: 3, 1081–1084 (2008).

- Lim-do, Y., Tyner, A.L., Park, J.B., Lee, J.Y., Choi, Y.H., Park, J.H., “Inhibition of colon cancer cell proliferation by the dietary compound conjugated linoleic acid is mediated by the CDK inhibitor p21CIP1/WAF1”, *J. Cell Physiol.*, 205:107–13 (2005).
- Lin, M., Chang, F., “Antioxidative effect of intestinal bacteria bifidobacterium longum ATCC 15708 and Lactobacillus acidophilus ATCC 4356”, *Digestive Diseases and Sci.*, 45(8): 1617-1622 (2000).
- Lin, T.Y., Lin, W. and Wang, Y.J., “Production of conjugated linoleic acid by enzyme extract of *Lactobacillus acidophilus* CCRC 14079”, *Food Chem.*, 83 : 27–31 (2003).
- Ljungh, A. Wadstrom, T., “Lactic acid bacteria as probiotics”, *Curr. Iss. Intestin. Microbiol.* 7:73-90 (2006).
- Ma, H., “Concept and protocol to isolate cholesterol-reducing bacteria from carnivores”, *Nature Sci.*, 2: 11-17 (2004).
- MacDonald, H.B., “Conjugated Linoleic Acid and Disease Prevention: A Review of Current Knowledge”, *J. Am. Coll. Nutr.*, 19(2): 111–118 (2000).
- Malik, A.C., Reinbold, G.W. And Vedamuthu, E.R., “Evaluation of the taxonomy of the *Propionibacterium*”, *Canadian J. Microbiol.*, 14: 1185-1195 (1986).
- Man, J.C., Rogosa, M. And Sharpe, M.E., “A medium for the cultivation of lactobacilli”, *J. Bacteri.*, 23: 130 (1960).
- Marteau, P., Jian, R., “Probiotics and health: new facts and ideas”, *Curr. Opi. Biotech.*, 13: 486-489 (2002).
- Meile, L., Le Blay, G. And Thierry, A. “Safety assessment of dairy microorganisms: *Propionibacterium* and *Bifidobacterium*”, *Int. J. Food Microbiol.*, 126: 316-320 (2008).
- Morita, H., He, F., Fuse, T., Ouwehand, A.C., Hashimoto, H., Hosoda, M., Mizumachi, K., Kurisaki, J., “Adhesion of lactic acid bacteria to Caco-2 cells and their effect on cytokine secretion”, *Microbiol. Immunol.*, 46(4):293-297 (2002).
- Muller, F.L., Lustgarten, M.S., Jang, Y., Richardson, A., Van Remmen, H., “Trends in oxidative aging theories”, *Free Radical Bio. and Medicine*, 43: 477-503 (2007).
- Murphy, E.F., Hooiveld, G.J., Muller, M., Calogero, R.A. and Kevin D. Cashman, K.D., “Conjugated Linoleic Acid Alters Global Gene Expression in Human Intestinal-Like Caco-2 Cells in an Isomer-Specific Manner”, *J. Nutr.*, 137: 2359–2365 (2007).

Nicolosi, R.J., Rogers, E.J., Kritchevsky, D., Scimeca, J.A., Huth, P.J., “Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters”, *Artery*, 22: 266- 277 (1997).

Noel, Y., Boyaval, P., Thierry, A., Gagnaire, V., Grappin, R., “Eye formation and Swiss-type cheeses, in: Law B.A.”, *Technology of cheesemakin Sheffield Academic Press Ltd, Sheffield, UK*, 222–250 (1999).

Ogawa, J., Kishino, S., Ando, A., Sugimoto, S., Mihara, K., Shimizu, S. “Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria”, *J. Biosci. Bioeng.*, 100(4):355-64 (2005).

Oh, D.K., Hong, G.H., Lee Y., Min S., Sin H.S., and Cho S.K.,. “Production of conjugated linoleic acid by isolated *Bifidobacterium* strains”, *World J. Microbiol. and Biotech.*, 19: 907-912 (2003).

Ouwehand A.C., Suomalainen T., Tolkkö S., Salminen S., “In vitro adhesion of propionic acid bacteria to human intestinal mucus”, *Lait* 82: 123–130 (2002).

Ouwehand, A.C., Tuomola, E.M., Tölkö, S., Salminen, S., “Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus”, *Int. J. Food Microbiol.*, 64: 119-126 (2001).

Pariza, M.W., Hargraves W.,. “A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mice epidermal tumors by 7,12- dimethylbenz[a]anthracene”, *Carcinogenesis*, 6: 591- 593 (1985).

Pereira, D.I.A., and Gibson, G.R., “Effects of Consumption of Probiotics and Prebiotics on Serum Lipid Levels in Humans”, *Critical Reviews in 1. Biochemistry and Molecular Biology*, 37 (4): 259-281 (2002).

Perez-Chaia, A., Nader de Macias, M.E. and Oliver, G.,. “Propionibacteria in the gut: effect on some metabolic activities of the host”, *Lait*, 75: 435-445 (1995).

Perrin, S., Warchol, M., Grill J.P. Schneider, F., “Fermentations of fructooligosaccharides and their components by *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 on batch culture in semi-synthetic medium”, *J. Appl. Microbiol.*, 90: 859-865. (2001).

Poupard J.A., Husain I., Norris R.F., “Biology of the Bifidobacteria”, *Bacteriol. Rev.*, 37(2): 136-165 (1973).

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

Rainio, A., Vahvaselka, M., Suomalainen T., and Laakso S., “Production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*”, **Lait** 82, 91-101 (2002).

Rodriguez, M., Ruiz, A., “Homeostasis between lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in healthy human aging”, **Mech. Ageing and Develop.**, 66(2): 213-222 (1992).

Ronald, M., Lawrence, A. and Park, C., “Handbook of Microbiology”, 2th Edition, **CRC Press**, New York, 966-1573 (1997).

Rowland, I.R., Rumney, C.J., Countts, J.T., Lievens, L.C., “Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin a gut bacterial metabolism and carcinogeninduced aberrant crypt foci in rats”, **Human Colonic Bacteria** CRC Pres, Boca Raton, 281-285 (1998).

Rudel, L.L. and Morris, M.D., “Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde”, **J. Lipid Res.**, 14, 364-366 (1973).

Sieber, R., Collomb, M., Aeschlimann, A., Jelen P., Eyer, H., “Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products—a review”, **Int. Dairy J.**, 14 :1–15 (2004).

Somkuti G. A. and Johnson T.L., “Cholesterol uptake by *Propionibacterium freudenreichii*”, **Curr. Mikrobiol.**, 20(5): 305-009 (1990).

Thierry, A. and Madec, M.N., “Enumeration of propionibacteria in raw milk using a selective medium”, **Lait.**, 75: 315-323 (1995).

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

Tilsala-Timisjärvi, A. and Alatossava, T., “Characterization of the 16S-23S and 23S-5S rRNA intergenic spacer regions of dairy propionibacteria and their identification with species-specific primers by PCR”, **Int. J. Food Microbiol.**, 68(1-2):45-52 (2001).

Tok, E., “Probiyotik olarak kullanılabilecek bazı laktik asit bakterilerinin kolesterol giderimi özellikleri ve safra tuzu dekonjugasyonu etkilerinin araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 3-30 (2007).

Tuomola, M.E., Salminen, J. S., Ouwehand, A.C., “Human ileostomy glycoproteins as a model for small intestinal mukus to investigate adhesion of probiotics”, **Lett. Appl. Microbiol.**, 28: 159-163 (1999).

Turgay, M., Irmiler, I., Isolini, D., Amrein, R., Fröhlich-Wyder, M., & Berthoud, H., Wagner, E. and Wechsler, D., “Biodiversity, dynamics, and characteristics of *Propionibacterium freudenreichii* in Swiss Emmentaler PDO cheese”, *Dairy Sci. & Technol.*, 91:471–489 (2011).

Vesterlund, S., Palta, J., Karp, M. and Ouwehand, A.C., “Adhesion of bacteria to resected human colonic tissue: Quantitative analysis of bacterial adhesion and viability”, *Research in Microbiology*, 156: 238-244 (2005).

Wahle K.W.J., Heys S.D., Rotondo D., “Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health”, *Prog. Lipid Res.* 43 :553–587 (2004).

Walker, D.K., Gilliland, S.E., “Relationship among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*”, *J. Dairy Sci.*, 76(4):956-61 (1993).

Wang, L. M., Lv, J.P., Chu, Z.Q., Cui, Y.Y., Ren, X.H., “Production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii*”, *Food Chem.*, 103 : 313-318 (2007).

Weis, C., Odermatt, E.K., Kressler, J., Funke, Z., Wehner, T., Freytag, D., “Poly(Vinyl Alcohol) Membranes for Adhesion Prevention” *J. Biomed. Mater Res. Part B: Appl. Biomater*, 70(B): 191–202, (2004).

White, S. R. , Broadbent, J. R., Oberg, C. J., and McMahon, D. J., “Effect of *Lactobacillus helveticus* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* Combinations on Propensity for Split Defect in Swiss Cheese”, *J. Dairy Sci.*, 86:719–727 (2003).

Wilson, T.A., Nicolosi, R.J., Chrysam, M., Kritchevsky, D., “Conjugated linoleic acid reduces early aortic atherosclerosis greater than linoleic acid in hypercholesterolemic hamsters”, *Nutr. Res.*, 20 (12) : 1795- 1805 (2000).

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).

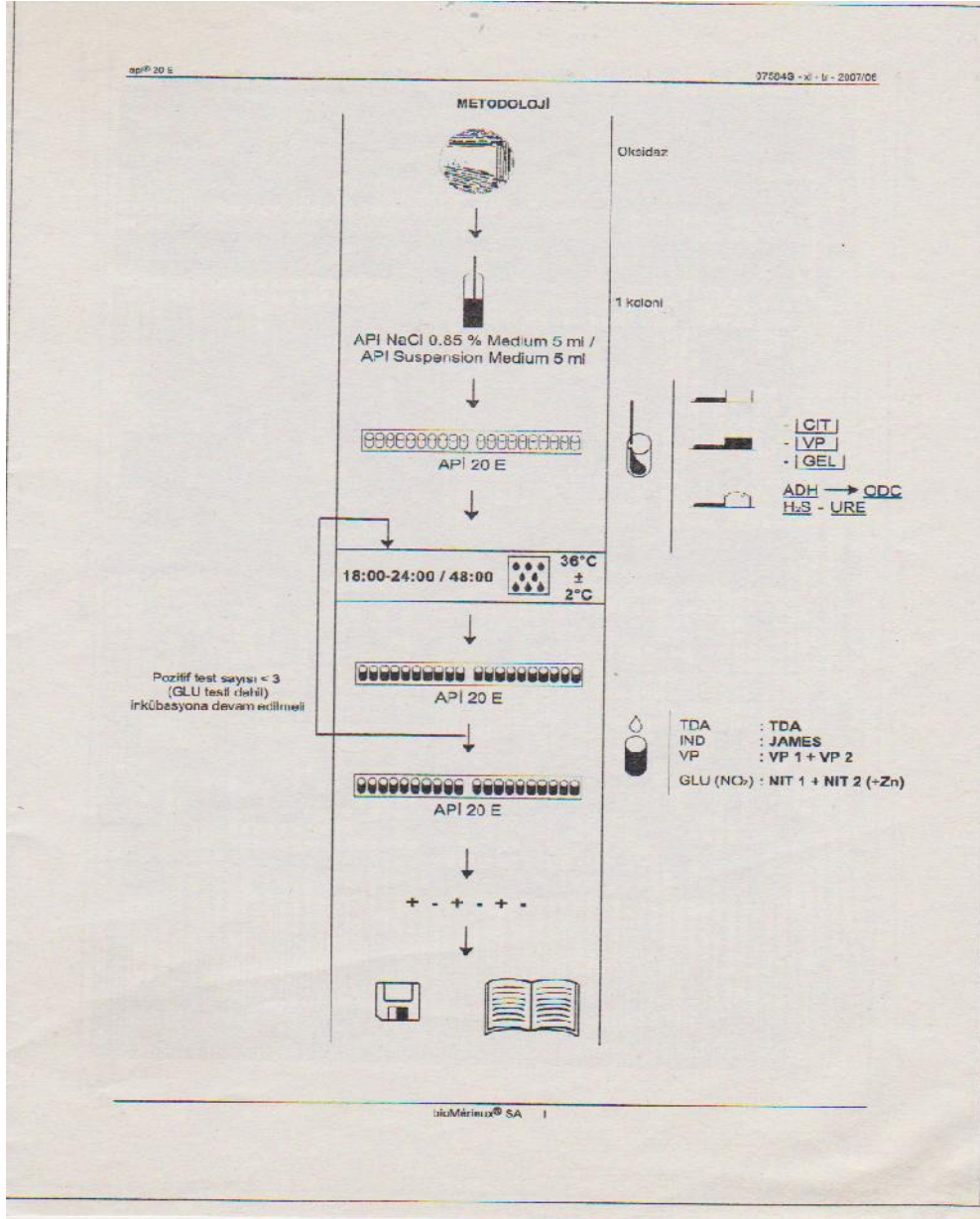
Zarate, G., Gonzalez S., Perez Chaia, A., “Assessing Survival of Dairy Propionibacteria in Gastrointestinal Conditions and Adherence to Intestinal Epithelia”, *Methods Mol. Biol.*, 268(6): 423-432 (2004).

Zarate, G., Morata de Ambrosini, V. I., Perez Chaia, A., Gonzalez S.N., “Adhesion of Dairy Propionibacteria to Intestinal Epithelial Tissue In Vitro and In Vivo”, *J. Food Prot.*, 65 (3): 534-539 (2002).

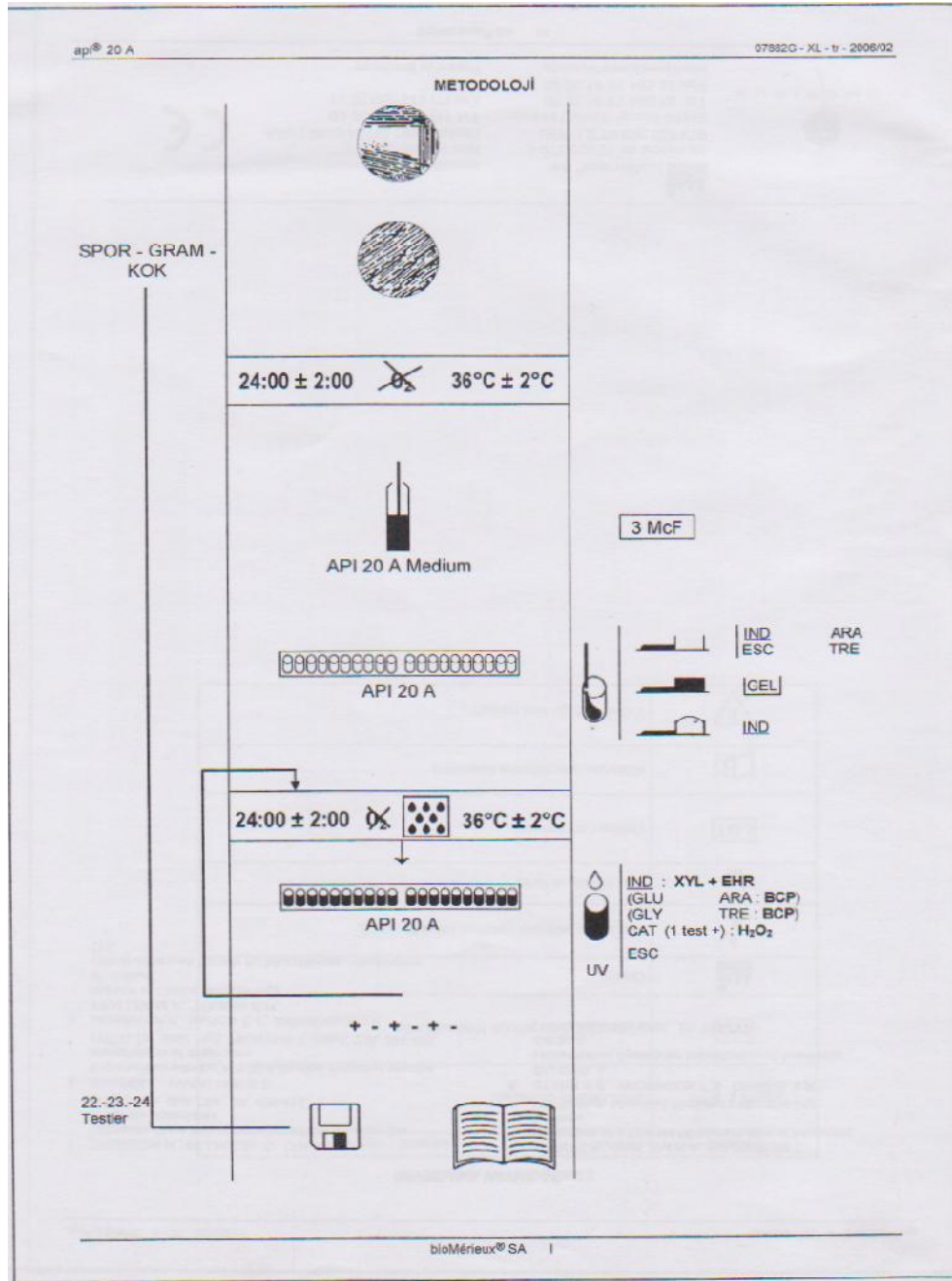
Zarate, G., Morata de Ambrosini, V. I., Perez Chaia, A., Gonzalez S.N.,. “Some factors affecting the adherence of probiotic *Propionibacterium acidipropionici* CRL 1198 to intestinal epithelial cells”, *Can. J. Microbiol.*, 48(5): 449-457 (2002).

EKLER

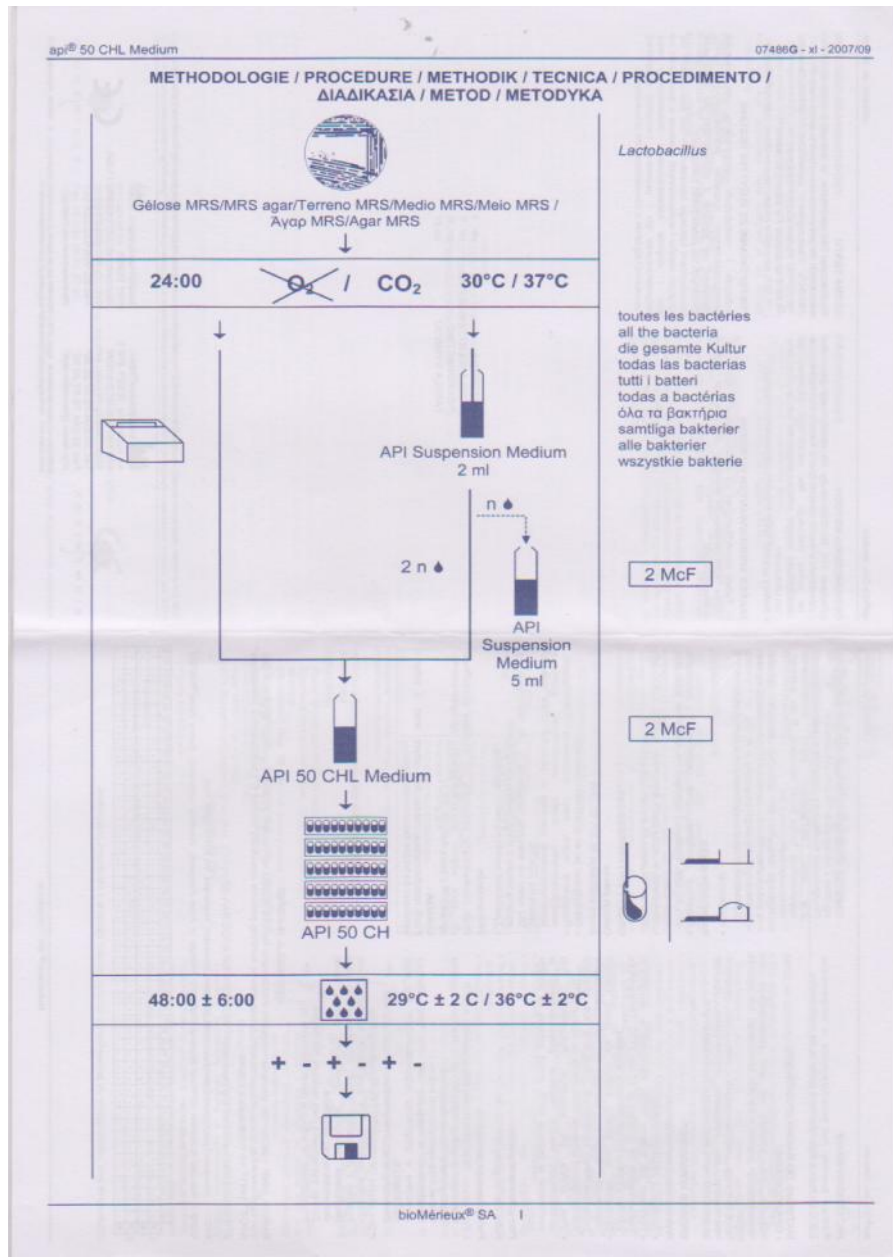
EK-1. API kitlerinin metodolojisi



EK-1.(Devam) API kitlerinin metodolojisi



EK-1.(Devam) API kitlerinin metodolojisi






EK-2. API kitlerinin değerlendirilmesi

api® 20 A		07882G - tr - 2008/02			
OKUMA TABLOSU					
TESTLER	AKTİF İÇERİKLER	MİKTAR (mg/küp.)	REAKSİYONLAR/ENZİMLER	SONUÇLAR	
				NEGATİF	POZİTİF
IND	L-tryptophane	0.68	INDole oluşumu	XYL - karıştır / 2-3 dk. + EHR / 5 dk. — Sarı	— Sarı
URE	urea	0.648	UREase	Sarı -urunçu	Sarı
BCP					
GLU	D-glucose	1.96	asidifikasyon (GLucose)	Meneşe	Sarı / Sarı -yeşil
MAN	D-mannitol	1.96	asidifikasyon (MANnitol)		
LAC	D-lectose (bovine orijin)	1.96	asidifikasyon (LACTose)		
SAC	D-saccharose sucrose)	1.60	asidifikasyon (SACcharose)		
MAL	D-maltose	1.96	asidifikasyon (MALtose)		
SAL	salicin	1.64	asidifikasyon (SALicin)		
XYL	D-xylose	1.64	asidifikasyon (XYLose)		
ARA	L-arabinose	1.64	asidifikasyon (ARABinose)		
[GEL]	gelatin (inek orijin)	0.8	hidroliz (protease) (GELatin)	pigment dağılımı yok (1)	siyah pigment dağılımı (1)
ESC	esculin ferric citrate	0.36	hidroliz (β-gucosidase) (ESCUlin)	san (2)	kahverengi-siyah (2)
		0.11		UV (365 nm) 'de	
				fluoresans	Fluoresans yok
BCP					
GLY	glycerol	1.62	asidifikasyon (GLYcerol)	Meneşe	sarı / sarı-yeşil
CEL	D-cellobiose	1.66	asidifikasyon (CELlobiose)		
MNE	D-mannose	1.96	asidifikasyon (ManNose)		
MILZ	D-melezitose	1.96	asidifikasyon (MeLeZitose)		
RAF	D-raffinose	2.18	asidifikasyon (RAFFinose)		
SCR	D-sorbitol	2.18	asidifikasyon (SCRbitol)		
RHA	L-rhamnose	1.96	asidifikasyon (RHAgnose)		
TRE	D-trehalose	1.96	asidifikasyon (TREhalose)		
CAT		—	CATelase	havada 30 dakikadan sonra pozitif (optik H ₂ O ₂) Kabarık yok	Kabarıklar
SPDR		—	Sporler	yok	var
GRAM		—	Gram reaksiyonu	— pembe	Meneşe
COCC		—	Morfoloji	çomak	kot

(1) Yuvarlak keverozda inkübasyondan sonra, tüpün sadece alt kısmına pigment yayılır.


(2) Stripin havada tutulmasından sonra bazen sadece kahverengi-siyah renk gelişir; bu okuma sırasında dikkate alınmalıdır. Siyah bir renk H₂S 'in ferric sitrat ile reaksiyonundan bağlı olarak demir sülfür (FeS) oluşumuna bağlı olabilir. Bu esculin hidrolizini göstermez. Bu ikisi esculin hidrolizi tüpün üstündeki kahverengi-siyah bir alanda meydana gelirken, tüpün tabanında demir sülfür siyah bir çökelti oluşturduğu gerçeği ile ayrılır. Tüp tamamen siyah ise, ve şüpheli durumda ise, test UV lambada floresans kontrolü için okunmalıdır.

 ESC + H₂S -
  ESC - / + H₂S - / +
  ESC - H₂S +


- Gösterilen miktarlar kullanılan ham malzemenin miktarına bağlı olarak ayarlanabilir.
- Bazı küpüller, özellikle peptonlar, hayvanı kaynaklı ürünler içerir.

METODOLOJİ s. I
 TANIMLAMA TABLOSU s. II
 LİTERATÜRLER s. III
 SEMBOLLERİN ANLAMI s. IV

ATCC, American Type Culture Collection'a ait patenti kullanılan, alınmış ve/veya devam eden bir markadır.




BIO-MERIEUX



bioMérieux® SA
 au capital de 12 029 370 €
 673 620 399 RCS LYON
 69280 Marcy-l'Étoile / France
 Tel. 33 (0)4 78 87 20 30
 Fax 33 (0)4 78 87 20 90
 http://www.biomerieux.com

bioMérieux, Inc
 Box 15969,
 Durham, NC 27704-0969 / USA
 Tel. (1) 919 620 20 00
 Fax (1) 919 620 22 11

Fransa'da basılmıştır



bioMérieux, mavi logo, API, ATR ve apiweb, bioMérieux SA veya şubelerinden birine ait patenti kullanılan, alınmış ve/veya devam eden markadır.

EK-2.(Devam) API kitlerinin değerlendirilmesi

api® 20 E

07584G - r - 2007/06

ATIK MALZEMELER

Tüm kullanılmış veya kullanılmamış reaktifler ve diğer kontamine tek kullanımlık materyaller potansiyel enfeksiyöz ürün olarak işleme tabi tutulmalıdır.

Üretilen etki ve atığın muamelesi her laboratuvarın kendi sorumluluğundadır.

OKUMA TABLOSU

TESTLER	AKTİF İÇERİKLER	MİKTAR (mg/küp.)	REAKSİYONLAR / ENZİMLER	SONUÇLAR	
				NEGATİF	POZİTİF
ONPG	2-nitrofenil-βD-galaktopiranozid	0.223	β-galaktozidaz (Ortho Nitrofenil-βD-Galaktopiranozidaz)	renksiz	sarı (1)
ADH	L-ajinin	1.9	Ajnin DiHidrolaz	sarı	kırmızı / turuncu (2)
LDC	L-lizin	1.9	Lizin Dekarboksilaz	sarı	kırmızı / turuncu (2)
ODC	L-ornithin	1.9	Ornithin Dekarboksilaz	sarı	kırmızı / turuncu (2)
[CIT]	trisodium sitrat	0.756	CITrate (sitrat) kullanımı	açık yeşil / sarı	mavi-yeşil / mavi (3)
H ₂ S	sodium tiosülfat	0.075	H ₂ S üretimi	renksiz / grimsi	siyah çökeltili / ince çizgi
URE	Üre	0.76	UREaz	sarı	kırmızı / turuncu (2)
TDA	L-triptofan	0.36	Triptofan DeAminaz	sarı	TDA / hemen kirmizimsi kahverengi
IND	L-triptofan	0.19	INDole üretimi	renksiz zayıf yeşil/sarı	JAMES / hemen pembe
[VP]	sodium pirüvat	1.9	Asetoin üretimi (Voges Proskauer)	Renksiz / açık Pembe	VP 1 + VP 2 / 10 dk. pembe / kırmızı (5)
[GEL]	Jelatin (sığır kaynaklı)	0.6	GELatinaz	Siyah pigment yaygın değil	Siyah pigment yaygın
GLU	D-glukoz	1.9	fermentasyon / oksidasyon (GLUKoz) (4)	mavi / mavi-yeşil	sarı / grimsi sarı
MAN	D-mannitol	1.9	fermentasyon / oksidasyon (MANnitol) (4)	mavi / mavi-yeşil	sarı
INO	Inositol	1.9	fermentasyon / oksidasyon (INOsitol) (4)	mavi / mavi-yeşil	sarı
SOR	D-sorbitol	1.9	fermentasyon / oksidasyon (SORbitol) (4)	mavi / mavi-yeşil	sarı
RHA	L-rhamnoz	1.9	fermentasyon / oksidasyon (RHAmmoz) (4)	mavi / mavi-yeşil	sarı
SAC	D-sukroz	1.9	fermentasyon / oksidasyon (SACcharoz) (4)	mavi / mavi-yeşil	sarı
MEL	D-melibioz	1.9	fermentasyon / oksidasyon (MELibioz) (4)	mavi / mavi	sarı
AMY	Amygdalin	0.57	fermentasyon / oksidasyon (AMYgdalin) (4)	mavi / mavi	sarı
ARA	L-arabinoz	1.9	fermentasyon / oksidasyon (ARAbinoz) (4)	mavi / mavi	sarı
OX	(oksidaz test prospektüsüne bakınız)		Sitokrom-Oksidaz	(oksidaz test prospektüsüne bakınız)	

(1) Çok açık sarı pozitif olarak düşünülmelidir.

(2) 36-48 saat inkübasyondan sonra turuncu renk negatif kabul edilmelidir.

(3) Okuma küpüde (aerob) yapılır.

(4) Fermentasyon tübün alt kısmında başlarken, oksidasyon küpüde başlar.

(5) 10 dakika sonra hafifçe pembe renk negatif kabul edilmelidir.

• Gösterilen miktarlar kullanılan ham maddenin miktarına bağlı olarak düzenlenebilir.

• Bazı küpüller özellikle peptonlar hayvan kaynaklı ürünler içerir.

EK-2.(Devam) API kitlerinin değerlendirilmesi

REF 50 300

07945F - v - 2002/11

api® 50 CH

Karbonhidratlar

IVD

ÖZET VE AÇIKLAMA

API 50 CH mikroorganizmaların karbonhidrat metabolizmasının çalışmasını sağlayan 50 biyokimyasal testten oluşan standart bir sistemdir. API 50 CH, *Lactobacillus* ve ilgili türlerin tanımlanması için API 50 CHL Medium ile, *Enterobacteriaceae* ve *Vibrionaceae* ilgili türleri ile *Bacillus* türleri için API 50 CHB/E Medium ile kullanılır. Bu sistem ile tanımlanabilen organizmaların tam bir listesi ilgili besiyerinin prospektüsünde yer alan Tanımlama Tablosunda bulunabilir.

PRENSİBİ

API 50 CH sribi, karbonhidrat ailesi ve onun türevlerine ait (heterosidler, polialkoller, üronik asitler) olan substratların fermentasyonunu kullanan 50 mikrotüp içerir. Fermentasyon testleri substratları sulandıran API 50 CHL Medium veya API 50 CHB/E Medium ile ekilir. İnkübasyon sırasında, fermentasyon asidinin anaerobik üretimi ile ve seçilen besiyerinde bulunan pH indikatörü tarafından saptanan tüpte renk değişimi ile ortaya çıkar. İlk tüp, substrat içermez ve bir negatif kontrol olarak kullanılır.

NOT : API 50 CH sribi diğer iki yolu kullanabilir :

- Oksidasyon küpüde bir renk değişimi ile gösterilir ve seçilen ortam içinde yer alan bir pH indikatörü aracılığıyla saptanan aerobik asit üretimine bağlıdır.
- asimilasyon substratın mevcut tek karbon kaynağı olduğu durumda küpüde bir organizmanın çoğalmasıyla endikedir.

Bu durumda, strip inokülasyonu için kullanılan besiyeri seçimi test edilen mikrop grubunun metabolizmasına ve besinsel ihtiyaçlara bağlı olacaktır (referans yayınlara bakınız).

KİT İÇERİĞİ (10 TESTLİK KİT)

- 10 API 50 CH sribi
- 10 İnkübasyon kutusu
- 10 sonuç geması
- 1 prospektüs

STRİP BİLEŞİMİ

API 50 CH sribin bileşimi aşağıdaki test listesinde verilmiştir:

Strip 0 - 9

Tüp	Test	Aktif maddeler	MİKTAR (mg/cup.)
0		KONTROL	-
1	GLY	GLYcerol	1.64
2	ERY	ERYthritol	1.44
3	DARA	D-ARAbinose	1.4
4	LARA	L-ARAbinose	1.4
5	RIB	D-RIBose	1.4
6	DXYL	D-XYLose	1.4
7	LXYL	L-XYLose	1.4
8	ADO	D-ADOnitol	1.36
9	MDX	Methyl-βD-Xylopyranoside	1.28

Strip 10 - 19

Tüp	Test	Aktif maddeler	MİKTAR (mg/cup.)
10	GAL	D-GALactose	1.4
11	GLU	D-GLUcose	1.56
12	FRU	D-FRUctose	1.4
13	MNE	D-NAInnosE	1.4
14	SBE	L-SorBosE	1.4
15	RHA	L-RHAMnose	1.36
16	DUL	DULcitol	1.36
17	INO	INOstol	1.4
18	MAN	D-MANnitol	1.36
19	SOR	D-SORbitol	1.36

Strip 20 - 29

Tüp	Test	Aktif maddeler	MİKTAR (mg/cup.)
20	MDM	Methyl-αD-Mannopyranoside	1.28
21	MDG	Methyl-αD-Glucopyranoside	1.28
22	NAG	N-AcetylGlucosamine	1.28
23	AMY	AMygdalin	1.08
24	ARB	ARButin	1.08
25	ESC	ESCulin feric citrate	1.16 0.152
26	SAL	SALicin	1.04
27	CEL	D-CELlobiose	1.32
28	MAL	D-MALtose	1.4
29	LAC	D-LACTose (bovine origin)	1.4

Strip 30 - 39

Tüp	Test	Aktif maddeler	MİKTAR (mg/cup.)
30	MEL	D-MELibiose	1.32
31	SAC	D-SACcharose (sucrose)	1.32
32	TRE	D-TREhalose	1.32
33	INU	INUlin	1.28
34	MLZ	D-MeLeZitose	1.32
35	RAF	D-RAFFinose	1.56
36	AMD	AmiDon (starch)	1.28
37	GLYG	GLYcoGen	1.28
38	XLT	XyLitol	1.4
39	GEN	GENtobiose	0.5

Strip 40 - 49

Tüp	Test	Aktif maddeler	MİKTAR (mg/cup.)
40	TUR	D-TURanose	1.32
41	LYX	D-LYXose	1.4
42	TAG	D-TAGatose	1.4
43	DFUC	D-FUCose	1.28
44	LFUC	L-FUCose	1.28
45	DARL	D-ARAbitol	1.4
46	LARL	L-ARAbitol	1.4
47	GNT	potassium GlucoNaTe	1.84
48	2KG	potassium 2-KetoGluconate	2.12
49	5KG	potassium 5-KetoGluconate	1.8

Belirtilen miktarlar kullanılan ham maddenin miktarına bağlı olarak ayarlanabilir.

bioMérieux® sa Türkçe - 1

EK-3. *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* S28 süşunun gen dizilimi

AGTTTTGATCCTGGCTCAGGACGAAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAATTCGAACGGTAAGGC
 CCTTTTCGGGGGTACAACGAGTGGCCAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCCCTGCCATCACTTCGG
 GATAACGCTGGGAAACTGGTGCTAATACCGGATATGAGCTCCTGCTGCATGGTGGGGTTGGAAAGTT
 TTTGCGGTGGTGGATGGACTCGCGTCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTTGTGGCTCACCAAGGCGTCGA
 CGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAG
 GCAGCAGTGAGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCTGCGGGATGACGGC
 CTTGCGGTTGTAAACCGCTTTCACCAGGGACGAAGGGCCTTTCGGGGTTTGACGGTACCTGGAGAAGA
 AGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTGATACGTAGGGTGCAGAGCGTTGTCCGGATTTATTG
 GCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTGATCGCGTCGGAAGTAAAACTTGTGCTTAACCCCTGGGCGTGC
 TTTGATACGGGTTGACTTGTGGAAGGTAGGGGAGAATGGAATTCTTGGTGGAGCGGTGGAATGCGCA
 GATATCAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGTTCTCTGGACCTTTCCTGACGCTGAGGAGCGAAAGC
 GTGGGGAGCAAACAGGCTTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGGTGGGTACTAGGTGTGGGGT
 CCATTCCACGGATTCCGTTACGTAGCTATTTCGCTTAAGATACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAGGC
 TAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGC
 GAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGGATTGGTAACGGTCAGAGATGGCCGCCCCCTTGTGGGCCGA
 TTCACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG
 CAACCCTCGTCCACTGTTGCCAGCAATTCGGTTGGGGACTCAGCTGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGG
 AGGAAGGTGGGCAATGACGCACAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACGCATGCTACAATG
 GCCGGTACAAACAGTTGCGACACTGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTG
 GGGTCTGCCACTCAACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAAT
 ACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCATGAAAGTCAGTAACACCCCTTGAGCGGGTGGC
 CCTACCCTTGTGGGGGGCCGTCGAAGGGGGACTGGTTC

EK-4. *Propionibacterium freudenreichii thoenii* S72 suşunun gen dizilimi

AGTTTTGATCCTGGCTCAGGACGAAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAATTCGAACGGTAAGGC
CCTTTTCGGGGGTACAACGAGTGGCCAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCCGCCCATCACTTCGG
GATAACGCTGGGAAACTGGTGCTAATACCGGATATGAGCTCCTGCTGCATGGTGGGGTTGGAAAGTT
TTTGCGGTGGTGGATGGACTCGCGTCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTTGTGGCTCACCAAGGCGTCGA
CGGGTAGCCGGTTCTGAGAGGGTGACCGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCTGCGGGATGACGG
CCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTCACCAGGGACGAAGGGCCTTTCGGGGTTTGACGGTACCTGGAGAAG
AAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTGATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGATTTATT
GGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTGATCGCGTCGGAAGTGAAAACCTGGGGCTTAACCCTGGGCGTG
CTTTCGATACGGGTTGACTTGTGGAAGGTAGGGGAGAATGGAATTCCTGGTGGAGCGGTGGAATGCGC
AGATATCAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGTTCTCTGGACCTTTCCTGACGCTGAGGAGCGAAAG
CGTGGGGAGCAAACAGGCTTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGGTGGGTACTAGGTGTGGGG
TCCATTCCACGGATTCCGTTACGTAGCTATTCGCTTAAGATAACCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAGG
CTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACG
CGTAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGGATTGGTAACGGTCAGAGATGGCCGCCCCCTTGTGGGGCCG
ATTCACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGC
GCAACCCTCGTCCACTGTTGCCAGCAATTCGGTTGAAGACTCAGCTGGAGACC GCCGGGGTCAACTCG
GAGGAAGGTGGGCAATGACGCACAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACGCATGCTACAAT
GGCCGGTACAAACAGTTGCGACACTGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATT
GGGGTCTGCAACTCAACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAA
TACGTTCCCGGGGCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCATGAAAGTCAGTAACACCCCTTGAGCGGGTGG
CCCTACCCTTGTGGGGGGCCGTCGAAGGTGGCACTGGTTTC

ÖZGEÇMİŞ**Kişisel Bilgiler**

Soyadı, adı : YİYİT DOĞAN, Sema
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 21.02.1985 Ankara
Medeni hali : Evli
Telefon : 0 (555) 630 00 45
Faks : 0 (312) 484 29 87
e-mail : semadogan@gazi.edu.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Gazi Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	2008
Lise	Kocatepe Mimar Kemal Süper Lisesi	2004

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2008-2009	Gazi Üniversitesi	Yardımcı Asistan
2011-	Gazi Üniversitesi	Uzman Biyolog

Yabancı Dil

İngilizce