

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN PROBİYOTİK
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Erdem Akman**

Anabilim Dalı : Gıda Mühendisliği

Programı : Gıda Bilimleri

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Necla Aran

HAZİRAN 2009

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN PROBİYOTİK
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Erdem Akman

506061506

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 04 Mayıs 2009

Tezin Savunulduğu Tarih : 03 Haziran 2009

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Necla ARAN (İTÜ)
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Artemis KARAALİ (YÜ)
Doç. Dr. Beraat ÖZÇELİK (İTÜ)

HAZİRAN 2009

ÖNSÖZ

Günümüzde tüketicilerin beslenmenin sağlık üzerindeki etkileri konusunda artan ilgisine bağlı olarak fonksiyonel gıdalara olan talep giderek artmaktadır. Fonksiyonel gıdalar arasında en çok ilgi gören grup olarak probiyotik ürünler ön plana çıkmıştır. Özellikle probiyotik ürünlerin “doğal” olarak değerlendirilebilmesi tüketicilerin tercihinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle gıdalarda tercih edilen probiyotik bakteriler genellikle gıdalarda varlığı uzun geçmişe dayanan laktik asit bakterileri olmaktadır.

Bu çalışmada bölümümüz stoklarında olan ve çeşitli kuruluşlarından temin edilen laktik asit bakterilerinin probiyotik özellikleri incelenmiştir. Daha sonra probiyotik özellik gösteren bakterilerin UHT süt, portakal suyu ve elma suyunda kullanım potansiyelleri test edilmiştir.

Çalışmam sırasında her türlü desteği veren sevgili hocam Sayın Prof. Dr. Necla Aran'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca araştırmalarım ve deneylerim sırasında tavsiyelerinden yararlandığım Ar. Gör. Volkan Kalender Köseoğlu'na, teknik konularda yardımını esirgemeyen Ar. Gör. Harika Çankaya'ya teşekkür ederim. Çalışmamda kullandığım 21-22 kodlu laktik asit bakterilerinin temini için Yeditepe Üniversitesi öğretim üyelerinden Prof. Dr. Fikrettin Şahin'e, 24-35 arasındaki kodlara sahip 7 laktik asit bakterisinin temini içinse Ankara Üniversitesi öğretim üyelerinden Prof. Dr. Mustafa Akçelik'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca her zaman yanımda olan ve desteklerinin hiç esirgemeyen aileme teşekkürler.

Mayıs 2009

Erdem Akman
Gıda Mühendisi

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xi
ÖZET	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. Sindirim Sistemi ve Probiyotikler	3
2.2. Prebiyotikler ve Sinbiyotikler	6
2.3. Probiyotiklerin Faydalı Özellikleri ve Etki Mekanizmaları.....	6
2.3.1. Laktoz toleransının arttırılması	7
2.3.2. Sindirim sistemi enfeksiyonlarının engellenmesi	7
2.3.3. Kanser riskini azaltması	8
2.3.4. Kolesterol düşürmesi ve kalp-damar hastalıklarını engellemesi.....	9
2.3.5. Sindirim zorluklarını gidermesi ve besleyiciliği arttırması.....	10
2.3.6. Bağışıklık sisteminin kuvvetlenmesi	10
2.4. Probiyotikler ile İlgili Riskler	10
2.5. Probiyotikler ile İlgili Çalışmalar	12
3. MATERYAL VE METOT	13
3.1. Kullanılan Kültürler ve Muhafazası.....	12
3.2. Kullanılan Besiyerleri	13
3.3. Deneysel Çalışmaları	14
3.3.1. Asit toleransının ölçülmesi.....	14
3.3.2. Safra suyu toleransı	14
3.3.3. Fenol varlığında canlılık	14
3.3.4. Safra tuzu hidrolaz (BSH) aktivitesi	14
3.3.5. Antibiyotik hassasiyeti	15
3.3.6. Kolesterol asimilasyonu.....	16
3.3.7. Gıda ürünlerinde canlılık.....	17
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	19
4.1. Laktik Asit Bakterilerinin Asidik Ortama Dirençleri.....	20
4.2. Laktik Asit Bakterilerinin Safra Tuzu İçeren Ortama Dirençleri.....	21
4.3. Laktik Asit Bakterilerinin Fenol İçeren Ortamda Canlılıkları	22
4.4. Safta Tuzu Hidrolaz Aktiviteleri.....	24
4.5. Antibiyotik Dirençleri	25
4.6. Kolesterol Asimilasyonu.....	27
4.7. Gıdalarda canlılığın korunumu	28
5. SONUÇ	33
KAYNAKLAR	37
EK A	44

EK B	45
ÖZGEÇMİŞ.....	48

KISALTMALAR

AMP	: Ampicillin
BSH	: Bile Salt Hydrolase
C	: Chloramphenicol
CaCl₂	: Kalsiyum Klorür
CN	: Gentamicin
E	: Erithtromycin
FAO	: Food and Agriculture Organisation
GRAS	: Generally Recognised as Safe
IgA	: Immunoglobulin A
IgM	: Immunoglobulin M
KF	: Cephalothin
Kob	: Koloni Oluşturan Birim
LAB	: Laktik Asit Bakterileri
MRS	: De-Mann Rogoso Sharp
Na-TCDA	: Sodyum taurodeoxykolat
NV	: Novobiocin
P	: Penicillin G
RP	: Rifampicin
TE	: Tetracycline
TCDA	: Taurodeoxycholic acid
Th1	: Type-I helper
Th2	: Type-II helper
VA	: Vancomycin
WHO	: World Health Organisation

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Kalın bağırsakta baskın bulunan anaerobik mikroorganizmalar	5
Çizelge 3.1 : Çalışmada kullanılan kültürler ve kodları	13
Çizelge 3.2 : Çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri	15
Çizelge 3.3 : Çalışmada kullanılan antibiyotik disklerde görülen zonların antibiyotik direnç karşılıkları.....	16
Çizelge 4.1 : Asit toleransı deneyinde elde edilen sonuçlar	20
Çizelge 4.2 : Test edilen kültürlerin pH 2.5. değerinde canlılıkları.....	21
Çizelge 4.3 : % 0.4 (v/v) fenol içeren MRS broth ortamında 24 saat sonunda test edilen bakterilerin canlılıkları.....	24
Çizelge 4.4 : Safra tuzu hidrolaz testi sonucu ölçülen zon çapları	25
Çizelge 4.5 : Antibiyotik disklerinde ölçülen zon çaplarına göre direnç değerlendirmeleri	27
Çizelge 4.6 : Kültürlerin % kolesterol asimilasyon değerleri.....	28
Çizelge 4.7 : Kültürlerin test edilen ürünlerde gösterdikleri canlılık ve ürünlerin pH değerleri	29
Çizelge A.1 : Antibiyotik direnç testlerinde ölçülen zon çapları (mm).....	44
Çizelge A.2 : BSH akvitesi ve safra suyu direnci karşılaştırması.....	44
Çizelge B.1 : Osgall içeren standart kolesterol çözeltilerinde ölçülen absorban değerleri	45
Çizelge B.2 : TCDA içeren standart kolesterol çözeltilerinde ölçülen absorban değerleri	46

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 : Sindirim sistemi organları	4
Şekil 4.1 : Antibiyotik diskleri çevresinde oluşan zonlar	26
Şekil 4.2 : Probiyotik özellik gösteren kültürlerin UHT sütte 4°C’de 4 hafta süresince canlılıkları.....	30
Şekil 4.3 : Probiyotik özellik gösteren kültürlerin portakal suyunda 4°C’de 4 hafta süresince canlılıkları.....	30
Şekil 4.4 : Probiyotik özellik gösteren kültürlerin elma suyunda 4°C’de 4 hafta süresince canlılıkları.....	31
Şekil B.1 : Ovgall içeren ortamdaki kolesterol ölçüm eğrisi	45
Şekil B.2 : TCDA içeren ortamdaki kolesterol ölçüm eğrisi	46

BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Günümüzde tüketicilerin fonksiyonel ve doğal gıdalara olan ilgisi artmış ve buna bağlı olarak da probiyotiklerin market payında artışlar ortaya çıkmıştır. Fermente ürünlerin uzun geçmişleri olması nedeniyle probiyotik gıda üretiminde laktik asit bakterileri yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada çeşitli laktik asit bakterilerinin probiyotik özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda kültürlerin öncelikle mide-bağırsak ortamında düşük pH, safra suyu ve fenol konsantrasyonu gibi farklı koşullarda canlılıklarının korunumu incelenmiştir. Daha sonra seçilen kültürlerin kolesterol düşürücü etkilerinin belirlenmesi için safra tuzu hidrolaz aktivitesi ve kolesterol asimilasyon özellikleri incelenmiştir. Ayrıca kültürlerin antibiyotik direnç profilleri de incelenmiştir.

Probiyotik özellik gösteren kültürlerin gıdalarda kullanıma uygunluğunu test etmek için kültürlerin marketten temin edilen UHT süt, portakal suyu ve elma suyu ürünlerinde canlılıkları 4 hafta boyunca 4°C’de incelenmiştir.

Analiz sonuçları test edilen kültürlerinin çoğunluğunun % 0,3 (w/v) oxgall içeren MRS broth ortamında canlılığını koruduğunu göstermiştir. Ancak pH ve fenol testleri probiyotik adayı kültürler arasında ayırım sağlamıştır. Safra tuzu hidrolaz aktivitesi ve safra suyu direnci arasında bir bağ olmadığı tespit edilmiş, kolesterolü düşürücü etki ile safra tuzu hidrolaz aktivitesi arasında ise bir ilişki bulunamamıştır. Öte yandan antibiyotik dirençlerinde kültürler arasında belirgin farklılıklar gözlenmiştir.

İncelenen toplam 29 bakteri arasında 3 kültürün probiyotik özelliğe sahip olduğu bulunmuştur. Probiyotik özelliğe sahip kültürler test edilen gıdalarda yeterli canlılık gösterdiği de tespit edilmiştir.

INVESTIGATION OF PROBIOTIC PROPERTIES SOME LACTIC ACID BACTERIA

SUMMARY

Nowadays, in parallel with the consumer's demand for functional and natural, interest in the probiotics have increased and with respect to that market share of probiotic products had a serious increase. Because of the long term history of the fermented foods, they are preferred in probiotic food production.

The aim of this study was to investigate the probiotic potential of the some lactic acid bacteria. Accordingly, cultures were tested for their survival in low pH, bile and phenol concentration of gastrointestinal tract. Cultures that are chosen from the previous test results are further tested for their cholesterol lowering effect by investigating their bile salt hydrolase (BSH) activity and cholesterol assimilation properties. In addition, antibiotic resistance profiles were investigated.

Cultures that have probiotic properties are further tested for their survival in commercial UHT milk, orange juice and apple juice for 4 weeks at 4°C.

The results indicated that most of the cultures were able to survive in MRS broth medium containing 0.3(w/v) oxgall. However, their survival at low pH and phenol tests allowed distinction between the cultures to be a probiotic candidate. No relationship between BSH activity and bile salt resistance was observed. Also, cholesterol reduction was not related with BSH activity. Moreover, antibiotic resistance demonstrated a considerable distinction between the test cultures.

These results suggest that out of 29 cultures tested, 3 of them has probiotic properties. Cultures that have probiotic properties also showed satisfying survival in tested food products.

1. GİRİŞ

Son yıllarda tüketicilerin sindirim sistemi florasının sağlık üzerindeki etkileri ve beslenme aracılığıyla sağlıklarını koruma konularındaki bilinci giderek artmaktadır (De Vuyst ve ark., 2004). Bu doğrultuda oluşan talep sonucu fonksiyonel gıda kavramı oluşmuştur. Fonksiyonel gıdalar “Besinsel değerinin ötesinde sağlık üzerinde olumlu etkileri olan gıda ve gıda bileşenleri” olarak tanımlanmaktadır (Huggett ve Verschuren, 1996).

Günümüzde fonksiyonel gıda pazarında en büyük payı probiyotik gıdalar almaktadır. (Saarela, 2007). Probiyotik ürünlerin tüketiminin her geçen gün arttığı belirtilmektedir. Bu artışın göstergeleri olarak Amerika Birleşik Devletleri’ndeki yoğurtların %60’nın probiyotik kültür içermesi (Campagne ve Gardner, 2005) ve Finlandiya’da tüketicilerin %64’nün probiyotik ürün tüketmesi (Saarela, 2007) gösterilebilir. Günümüzde probiyotik katkı ürünlerin küresel market payının 1,5 milyar doların üzerinde olduğu belirtilmektedir (Heller, 2009).

Probiyotikler, “Yeterli miktarda vücuda alındığında sağlık üzerinde yararlı etkiler sağlayan canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlanmaktadır (FAO/WHO, 2002). Probiyotiklerin kullanımındaki en önemli faktör, gıdalarla birlikte tüketilmeleri sonucu doğabilecek risklerdir (Saarela, 2000). Risklerin değerlendirilmesinin çok zaman alması ve yüksek maliyetli olması gibi nedenlerin etkisiyle çalışmalar ağırlıklı olarak laktik asit bakterilerine (LAB) yönelmiştir. Laktobasiller ve Bifidobakterler gibi laktik asit bakteriler geleneksel kullanım süreçlerine bağlı olarak GRAS (Generally Recognised as Safe) statüsündedir (Vesterlund ve ark., 2007). Ayrıca bu türlerin sindirim sisteminde doğal olarak bulunması ve sindirim ortamına uyum sağlayabilmesi de diğer bir önemli faktördür (O’Sullivan, 2006). Bu nedenlerle probiyotik olarak gıdalarda en sık kullanılan mikroorganizmalar Laktobasiller ve Bifidobakterler’dir (Ziemer ve Gibson, 1998; Prado ve ark., 2008).

Bu çalışmanın amacı gıdalardan izole edilen ve çeşitli kuruluşlardan temin edilen LAB’nin sindirim sisteminde canlı kalma, safra tuzu hidrolaz (BSH) aktivitesi,

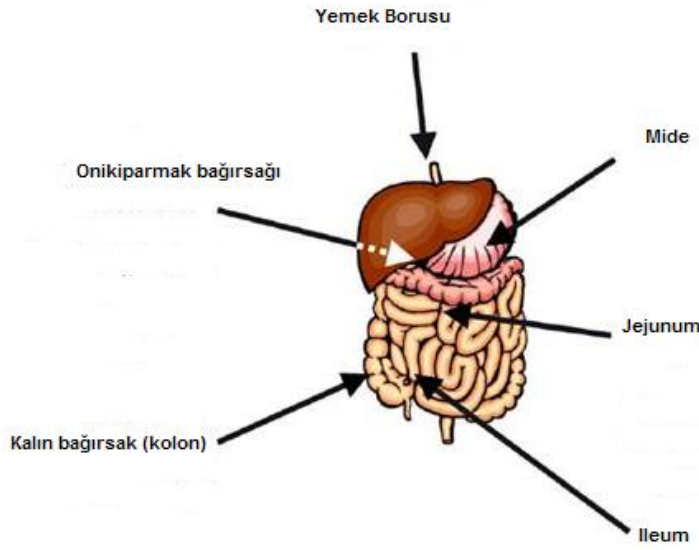
kolesterol asimilasyonu ve antibiyotik direnci gibi probiyotik bakteri adayı olabilme potansiyelini belirleyen özelliklerinin ve yeterli potansiyele sahip bakterilerin çeşitli gıdalarda canlılıklarının incelenmesidir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Sindirim Sistemi ve Probiyotikler

Sindirim sistemindeki mikrobiyal yük uzun zamandan beri bilim dünyası tarafından bilinmektedir. Fakat son zamanlarda bu mikrobiyal yükün sağlık üzerindeki etkileri belirlendikçe daha fazla önem vermeye başlanmıştır. Sindirim sisteminin beslenme dışında farklı yollarla sağlık üzerinde etkili olduğu ortaya çıktıkça sindirim sistemindeki mikrobiyal popülasyonun değiştirilmesi konusundaki çalışmalar da artmıştır.

Mikrobiyal yük, sindirim sistemi boyunca dağılmış olsa da mikrobiyal yoğunluğun ve metabolik aktivitelerinin en yüksek olduğu organ kalın bağırsaktır. Sindirim sistemine dahil olan organlar Şekil 2.1’de verilmiştir. Mikrobiyal yoğunluk yemek borusunda beslenmeye bağlı olarak değişirken midede 10^1 - 10^3 kob/g, jejunumda 10^7 kob/g, ileumda 10^9 kob/g değerlerinde olurken kalın bağırsakta 10^{11} - 10^{12} kob/g yoğunluğa ulaşmaktadır (Isolauri ve ark., 2004). Kalın bağırsaktaki mikrobiyal yoğunluk içerisinde 400’den fazla tanımlanmış farklı tür olduğu ve bunlar dışında birçok türün daha tanımlanabileceği belirtilmektedir (Fooks ve ark., 1999). Normal bir kalın bağırsak mikroflorasındaki mikroorganizma dağılımı Çizelge 2.1’de verilmiştir. Çizelge 2.1’den de anlaşılacağı üzere bu mikroorganizmaların ağırlıklı olarak anaerobik olduğu belirtilmektedir (Ziemer ve Gibson, 1998). Sindirim sistemindeki mikrobiyal yük ve çeşitlilik beslenme şekli, bağırsıklık, pH, redoks potansiyeli, yaş ve antimikrobiyal bileşenler gibi birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir (Fooks ve ark., 1999).



Şekil 2.1. Sindirim sistemi organları (Isolauri ve ark., 2004)

Kalın bağırsakta *Bacteriodes*, *Clostridia* ve *Escherichia coli* gibi potansiyel patojenler bulunmaktadır. Bu mikroorganizmaların patojenik etkilerinin kalın bağırsak mikroflorasındaki dengeden dolayı kontrol altında tutulduğu tahmin edilmektedir (Ziemer ve Gibson, 1998). Ancak, patojenlerle kontamine olmuş gıdaların vücuda alınmasıyla veya mikrobiyal florayı etkileyen faktörlerin değişmesine bağlı olarak patojenler çoğalarak sağlık sorunlarına yol açabilmektedir. Vücuda yararlı mikroorganizmaların alınması veya bu mikroorganizmaların gelişimini teşvik edecek faktörlerin oluşması durumunda sağlık üzerinde olumlu etkiler gözlenmektedir (Holzapfel, 2006).

Kesin olmamakla birlikte gıdalarda 10^6 - 10^8 kob/g arasında bir probiyotik bakteri yoğunluğu olduğu takdirde bakterilerin kalın bağırsağa ulaşarak etki yapabileceği düşünülmektedir. Gıda endüstrisi probiyotik ürünlerde 10^6 kob/g'ın üzerindeki değerleri hedeflemektedir. Ancak ilerleyen yıllarda probiyotik üründen beklenen etkiye, ürünün bileşimine ve kullanılan mikroorganizmalara göre bu limitlerin değişebileceği belirtilmektedir (Champagne ve Gardner, 2005).

Ürünlerdeki mikrobiyal yoğunluklarının yanında probiyotiklerin tüketimi ile ilgili bir diğer önemli konu, sindirim sisteminde tutunarak aktive göstermelerine rağmen probiyotiklerin sindirim sisteminde uzun süre kolonize olamamasıdır. Ayrıca sindirim sisteminde çoğalmaları yavaş olmaktadır. Bu süreçte metabolik olarak aktif

durumdadırlar (Marco ve ark., 2006). Probiyotik tüketimi mide-bağırsak sisteminde kalıcı değişimler sağlamamaktadır.

Çizelge 2.1. Kalın bağırsakta baskın bulunan anaerobik mikroorganizmalar (Macfarlane ve Gibson, 1994)

Mikrobiyal Grup	Kalın bağırsaktaki mikrobiyal yükü (log / g kuru madde)
Bacteroides	9.2–13.5
Eubacteria	5.0–13.3
Bifidobacteria	4.9–13.4
Clostridia	3.3–13.1
Lactobacilli	3.6–12.5
Ruminococci	4.6–12.8
Peptostreptococci	3.8–12.6
Peptococci	5.1–12.9
Streptococci (anaerobic)	7.0–12.3
Methanobrevibacter	7.0–10.3
Desulfovibrios	5.2–10.9

Bir laktik asit bakterisinin probiyotik olarak kabul edilebilmesi için FAO/WHO (2002) tarafından aşağıdaki basamaklardan geçmesi gerekmektedir;

- 1- Tanımlama: Probiyotik özellikleri incelenecek mikroorganizmanın türü net olarak bilinmelidir.
- 2- Probiyotik potansiyelin ölçümü için *in vitro* testler: En sıklıkla araştırılan özellikler gastrik asiditeye direnç, safra suyu direnci, mukoza ve epitel dokuya tutunma, antimikrobiyal aktivite, patojenlerin tutunma özelliklerini azaltma, safra tuzu hidrolaz aktivitesidir. Probiyotik özelliklerin incelenmesi için mevcut *in vitro* test yöntemleri kullanışlı olmakla birlikte tek başlarına yeterli değildir.
- 3- Gıda güvenliği testleri: Laktik asit bakterileri GRAS statüsünde olmasına rağmen antibiyotik direnç yapısının belirlenmesi, bazı metabolik aktivitelerinin belirlenmesi (Örn: safra tuzu dekonjugasyonu) ve insanlar üzerinde yapılan çalışmalardaki yan etkilerinin incelenmesi gerekmektedir.
- 4- Hayvanlar ve insanlar kullanılarak yapılan *in vivo* testler: Bir probiyotik kültürün herhangi bir sağlık sorunun giderdiği yönünde bir iddia ortaya atılmadan önce bu iddianın insan denekler üzerinde yapılan sağlam bilimsel kanıtlarla ispatlanması gerekmektedir. İnsanlar üzerindeki denemelerin

doğrulanması amacıyla bu denemelerin birden fazla merkez tarafından tekrarlanması tavsiye edilmektedir.

Belirtilen aşamalardan geçen bir mikroorganizma probiyotik olarak adlandırılabilir. Bir gıda ürününün probiyotik iddiasına sahip olabilmesi içinse bu tip bir mikroorganizmadan raf ömrü boyunca en az 10^6 kob/g içermesi gerekmektedir. Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinin Genel Etiketleme ve Beslenme Yönünden Etiketleme Kuralları Tebliği (2002)'de de bir gıda ürününün probiyotik beyanına sahip olabilmesi için raf ömrü boyunca en az 10^6 kob/g probiyotik bakteri içermesi gereği belirtilmiştir.

2.2. Prebiyotikler ve Sinbiyotikler

Prebiyotikler, “Gıdaların sindirim sistemi tarafından sindirilemeyen ancak sindirim sistemindeki bir veya birden fazla faydalı mikroorganizmaların gelişimini seçici olarak arttıran bileşenler” olarak tanımlanmaktadır (Gibson ve Robertfroid, 1995). Genellikle, bakteriyel aktivite dışında sindirilemeyen çeşitli oligosakkaritler prebiyotik olarak kullanılmaktadır (Fooks ve ark., 1999). Bir gıda bileşeninin prebiyotik olarak adlandırılması için sindirim sisteminin üst bölgelerinde hidrolize olmaması veya emilememesi, faydalı mikroorganizmaların seçici olarak gelişimini sağlaması, kalın bağırsaktaki mikrobiyal kolonizasyonu faydalı yönde değiştirmesi ve sağlık üzerinde olumlu etkilere yol açması gerekmektedir (Gibson ve Robertfroid, 1995). Eğer bir gıda hem probiyotik hem de prebiyotik içeriyorsa sinbiyotik olarak adlandırılmaktadır (Saarela ve ark., 2000).

2.3. Probiyotiklerin Faydalı Özellikleri ve Etki Mekanizmaları

Probiyotiklerin tüketimi sonucu belirtilen faydaları; laktoz toleransını arttırması, sindirim sistemi enfeksiyonlarını engellemesi, kanser riskini azalması, kolesterolü düşürmesi ve kalp-damar hastalıklarını engellemesi, sindirim zorluklarını gidermesi, çeşitli vitaminler sentezleyerek besleyiciliği artması ve bağışıklık sisteminin kuvvetlenmesi olarak özetlenmektedir (Fooks ve ark., 1999; Salminen ve ark., 1998; Saarela ve ark., 2000; O'Sullivan, 2006). Bu etkilerin etki mekanizmaları hakkındaki bilgiler henüz kesin olmamakla birlikte bir faydalı etki için çoklu etki

mekanizmalarının olabileceği ve her bir suşun kendine has etki sağlayan fonksiyonları olabileceği belirtilmektedir (Gueimonde ve Salminen, 2006).

2.3.1. Laktoz toleransının arttırması

Bazı probiyotikler, β -galaktosidaz enzimini sentezleyebilmeleri nedeniyle laktozu parçalayabilmektedir. Dolayısıyla laktoz vucüt tarafından parçalanamasa da probiyotikler aracılığıyla parçalarak emilimi sağlanabilmektedir. Bu sayede probiyotikler laktoz toleransını arttırılmasını sağlamaktadır (Zhao ve ark., 2007).

2.3.2. Sindirim sistemi enfeksiyonlarını engellemesi

Probiyotikler, sindirim sistemi enfeksiyonlarına karşı bakteriyosin ve diğer antimikrobiyal üretimi ile patojenleri inhibe ederek fayda sağlayabilmektedir. Bu antimikrobiyallere organik asitler, kısa zincirli yağ asitleri, hidrojen peroksit, etanol ve diasetil gibi bileşenler örnek gösterilebilir (De Vuyst ve ark., 2004). Ayrıca sindirim sistemindeki epitel hücreler ile etkileşimi sonucu antikor ve immunoglobulin üretimini arttırmaktadır. Bunlar dışında mukoza tabakasının bariyer özelliğini ve geçirgenliğini geliştirmesi, patojenlerin sindirim sisteminde tutunmalarını engellemesi de sindirim sistemi enfeksiyonlarına karşı etki mekanizmaları olarak gösterilmektedir (Salminen ve ark., 1998a).

2.3.3. Kanser riskini azaltması

Probiyotiklerin antikanserojen etkileri birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışmada tespit edilmiştir (Comanne ve ark., 2005). Probiyotiklerin antikanserojen etkilerini prokanserojenlerin degradasyonu; β -glukoüronidaz, nitroredüktaz, azoredüktaz gibi kanserojen enzimlerin aktivitesi azaltması ve antimutajenik bileşenler oluşturması ile sağladığı düşünülmektedir (Saarela ve ark., 2000; Hirayama ve Rafter, 2000; Comanne ve ark., 2005). Ayrıca mutajen bileşenleri bağladıkları da düşünülmektedir (Holzapfel, 2006). Tümör oluşumuna sebep olan koliformlar gibi bazı bakterilerin sindirim sistemindeki miktarları düşürmesi de dolaylı yoldan kanser ve tümör riskini azaltmasını sağlamaktadır (Hirayama ve Rafter, 2000).

Bir diğer önemli faktör de asetat, bütirat ve propiyonat gibi kısa zincirli yağ asitleri oluşturmalarıdır. Kısa zincirli yağ asitleri antikanserojen bileşenler arasında gösterilmektedir. Özellikle bütiratın histon proteinlerinin fosforilasyonu ve

asetilasyonu ile gen ekspresyonunu etkilemektedir. Probiyotiklerin prebiyotik bileşenleri parçalayarak kısa zincirli yağ asitleri oluşturmaktadır. Bu sebeple oluşan sinerjistik etki sonucu sinbiyotiklerin daha etkin antikanserojen etkiye sahip olduğu belirtilmektedir. Bu görüş birçok çalışma ile de desteklenmektedir (Comanne ve ark., 2005).

2.3.4. Kolesterolü düşürmesi ve kalp-damar hastalıklarını engellemesi

Probiyotik özellik gösteren canlıların yaygın olarak kabul edilen özelliklerinden birisi de kolesterol seviyesini düşürmeleridir (Pinto ve ark. 2006). Yüksek kolesterol seviyesi kalp-damar hastalıklarının gelişimi açısından çok önemlidir. Kolesterol düşürücü ilaçlar mevcut olmasına karşın fiyatları veya yan etkileri gibi çeşitli faktörlerden dolayı kullanımları tercih edilmemektedir. Laktik asit bakterilerinin kalp-damar hastalıkları riskini arttıran LDL-kolesterol ve fibrinojen seviyelerini düşürdüğü tespit edilmiştir (De Vries ve ark., 2006)

Bu etkinin nedenlerinden biri olarak safra asitlerinin enzimatik dekonjugasyonu gösterilmektedir. Safra suyundaki bu bileşenler kolesterol kullanılarak sentezlenmektedir. Sindirim sisteminden salgılandıktan sonra tekrar absorbe olduklarında kolesterolün yeniden sentezinde kullanılabilirler (Pinto ve ark. 2006). Dekonjuge safra tuzları konjuge formlarına oranla daha zor emildikleri için vücuttan daha fazla safra asidi atılımı gerçekleşir.

Safra tuzu hidrolaz enzimi (BSH)'nin safra dekonjugasyonundan sorumlu enzim olduğu belirtilmektedir. BSH aktivitesi sonucu oluşan dekonjuge safra tuzları tekrar absorbe olması daha düşük seviyelerde olmaktadır (Pereira ve ark., 2003). Ayrıca oluşan dekonjuge safra tuzlarının çözünürlüğü daha düşük olduğu için sindirim sistemine alınan yağların çözündürülmesi ve emilimini de azalmaktadır (Begley, 2006). Dolayısıyla safra asitlerinin dekonjugasyonu ile vücuttan atılan safra asitlerinin tekrar sentezlenmesi için kolesterol kullanımına ihtiyaç duyulması ve vücutta alınan kolesterolün çözünürlüğünün düşürülerek emiliminin azaltılması sayesinde kolesterol seviyesi düşürülebilmektedir. Ayrıca kolesterol asimilasyonu ile safra dekonjugasyonu arasında bir bağ olabileceği belirtilmektedir.

BSH enzimlerinin kolesterol ve safra suyunun hücre membranlarına dahil olmasını kolaylaştırdığı da ileri sürülmektedir (Dambekodi ve Gilliland, 1998; Taranto ve ark. 2003). Membranda meydana gelen bu değişikliğin hücre membranının bütünlüğünün

sağlanmasına katkıda bulunması ve dış etkilere karşı direnci arttırması mümkündür. Safra suyundaki bileşenlerin parçalanması sonucu hücrenin safra suyuna karşı direncinin artabileceği belirtilmektedir (Begley, 2006).

BSH'lerin membran zarına ve safra suyuna karşı direnç etkileri sonucu sindirim sistemindeki zararlı etkilere karşı kültürlerin direncini arttırabileceği belirtilmesine rağmen diğer fonksiyonlar da olduğu gibi bu konuda da yapılan çalışmalarda çelişkiler bulunmaktadır ve BSH enzimlerinin fonksiyonları ile ilgili çalışmaların geliştirilmesi gerekmektedir. Bu bağlamda farklı genler tarafından kodlanan homolog BSH enzimlerinin göz önüne alınmasının çalışmalar açısından faydalı olacağı belirtilmektedir (Begley, 2006).

BSH aktivitesine ilave olarak bakterilerin kolesterol asimilasyonu, kolesterolün hücre duvarına tutunması ve prebiyotiklerin parçalanması sonucu oluşan kısa zincirli yağ asitlerinin fizyolojik aktiviteleri nedeniyle de kolesterol düşürücü etki gözlenmektedir (Begley, 2006; Pereira ve Gibson, 2002).

Dekonjuge safra tuzlarının olumsuz etkileri olduğu belirtilmektedir. Bunlardan ilki yağların emilimini azaltarak beslenmede dengesizliğe yol açabilmesidir. Ayrıca dekonjuge safra tuzlarının modifikasyonu sonucunda oluşan ikincil safra asitleri DNA'ya zarar verdiği, bağırsak kanseri riskini arttırdığı ve diyare gibi hastalıkları yol açabildiği belirtilmektedir. Bir diğer önemli sorun da safra suyundaki kolesterol miktarının safra tuzları ve lesitin ile orantılı olmasıdır. Safra tuzu oranı yükseldiği zaman safra suyunda kolesterol da yükselmektedir. Bu durumda safra suyu kolesterole süpersature hale geldiği takdirde kolesterol, kalsiyum tuzları ve safra pigmentleri ile çökelmektedir. Oluşan bu bileşime de safrataşları adı verilmektedir (Begley, 2006).

Bu bilgiler göz önüne alındığında BSH aktivitesinin istenen veya istenmeyen bir özellik olması tartışma konusu olabilir. Bu konuda dikkat edilmesi gereken husus BSH aktivitesinin probiyotik bakterilerin sindirim koşullarında canlılığını koruması için yararlı bir özellik olması ve probiyotik olarak kullanılan *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerinin safra tuzlarını dehidroksile etme özelliklerinin olmayışıdır. Dolayısıyla oluşan BSH ürünleri genellikle çökelme sonucu dışkı ile birlikte vücuttan atılmaktadır (Begley, 2006).

2.3.5. Sindirim zorluklarını gidermesi ve besleyiciliği arttırması

Sindirim sisteminde kolonize olan probiyotikler enzimatik faaliyetleri sonucu sindirim enzimleri tarafından parçalanamayan bileşenlerin parçalanması ve emilimini sağlamaktadır. Bu sayede bu bileşenlerin de kalın bağırsakta emilimi sağlanmaktadır (Cruz ve ark., 2007; Marco ve ark., 2006).

Buna ilave olarak BSH enzimlerinin besinsel rolü incelendiğinde safra tuzlarının dekonjugasyonu sonucu glisin ve taurinin ortaya çıkmaktadır. Glisin, amonyak veya karbondioksite metabolize edilirken taurin amonyak, karbondioksit ve sülfata metabolize edilmektedir (Begley, 2006). Dolayısıyla safra tuzu dekonjugasyonu besinsel kaynaklar ortaya çıkarmaktadır.

Bunlara ilave olarak bazı laktik asit bakterilerinin vitamin sentezleme özellikleri sayesinde ekstra besleyicilik sağladığı belirtilmektedir (Morelli, 2007; Magarinos ve ark., 2007).

2.3.6. Bağışıklık sisteminin kuvvetlenmesi

Yapılan çalışmalarda probiyotiklerin bağışıklık sistemini kuvvetlendirdiği fakat bu özelliğin etki mekanizmasının bakteriler arasında farklılık gösterdiği belirtilmiştir. Bu mekanizmlar arasında mukozanın IgA ve IgM tepkisini teşvik etmesi, lenfosit üretimi arttırması ve fagositik aktiviteyi arttırması gösterilmektedir (Saarela ve ark., 2000; Comanne ve ark., 2005; Kleanhammer ve Kullen, 1999). Ayrıca sitokin ve T hücrelerinin sentezini tetiklediği, Th1/Th2 dengesini düzenlediği de tespit edilmiştir (Holzapfel, 2006; De Vries, 2006).

Bunlar dışında farklı kültürlerin kendine özgü mekanizmalarla bağışıklık sistemini kuvvetlendirmesi mümkündür. Bu konuya örnek olarak probiyotik özelliklere sahip olarak gösterilen *Escherichia coli* Nissle 1917 kültürünün β -defensin-2 (hBD2) antimikrobiyal peptit sentezini tetiklemesi verilebilir. Bu sayede mide-bağısak sisteminde patojenlerin gelişimi engellenebilmektedir (Marco ve ark., 2006).

2.4. Probiyotikler ile İlgili Riskler

Starter olarak kullanılan laktik asit bakterilerinin kullanımının uzun bir geçmişi olmasına rağmen bazı probiyotiklerin kullanımlarının uzun bir geçmişi yoktur. Ayrıca çok nadir de olsa günümüze kadar bazı laktik asit bakterinin yol açtığı

enfeksiyonlara rastlanmıştır. Bu enfeksiyonların sebebi olarak genellikle bağışıklık sistemi üzerinde yarattığı manipülasyon gösterilmiştir (Ouwehand ve ark., 2006; Vesterlund, 2007). Gerçekleşen bu sorunların kaynağının beslenme ile vücuda alınan bakterilerden olmadığı, bireylerin doğal florasındaki bakterilerden kaynaklandığı belirtilmektedir (Salminen ve ark., 1998b).

Laktik asit bakterileri konjuge primer safra tuzlarını serbest dekonjuge ve ikincil dehidroksile safra tuzlarına çevirebilir. Oluşan serbest safra tuzlarının diyare ve bağırsak lezyonlarına; ikincil safra tuzlarının ise kanserojen etkiye yol açtığı belirtilmektedir. Dolayısıyla yüksek dozda probiyotik alımının potansiyel bir risk teşkil ettiği belirtilmektedir. Ayrıca hemolitik etkiye sahip kültürlerin anemi gibi hastalıklara neden olabileceği belirtilmektedir (Ouwehand ve ark. 2006; Salminen ve ark., 1998b).

Probiyotiklerin bağışıklık sistemini kuvvetlendirmesi ve antikanserojen etkileri olmasına rağmen aşırı Th1 (Type-I helper) hücre tepkisi olması durumunda kalın bağırsakta inflamatuvar hastalıklara yol açması ve bağırsak kanseri riskini arttırması da mümkün olabilmektedir (Comanne ve ark., 2005).

Probiyotiklerle ilgili en önemli risk faktörü olarak antibiyotik direnç genlerinin özellikle patojenler olmak üzere diğer türlere aktarılmasıdır. Antibiyotik direnci tüm dünyada giderek artan bir sağlık problemi haline gelmektedir. Artan antibiyotik kullanımı antibiyotiklere karşı dirençli kültürlerin ortaya çıkmasına sebep olmuştur (Ouoba ve ark., 2008). Antibiyotik direnci, kültürün kendine has özelliği olabildiği gibi seri mutasyonlarla veya gen transferi ile kazanılabilmektedir. Kendine has olan veya mutasyonlar sonucu oluşan direncin aktarımı çok düşük bir ihtimal olarak görülürken gen transferi ile edinilen direncin aynı şekilde aktarılması mümkün olmaktadır. Transfer edilen direnç genleri kendi başlarına bir hastalık etkeni olmamakla birlikte patojenlerin direnç kazanması sonucu hastalık oranının artması, hastalık süreçlerinin uzaması, tedavilerin maliyetlerinin artması ve ölüm oranlarının artması gibi sonuçlara yol açmaktadır (Ammor ve ark., 2007).

Birçok laktik asit bakterisi antibiyotiklere karşı direnç göstermesine rağmen bu özelliklerinin doğal özellikleri (intrinsik direnç) olduğu ve diğer canlılara aktarılamayacağı belirtilmektedir. Ancak bazı kültürlerde plasmidlerde kodlanmış ve diğer canlılara aktarılabilen antibiyotik direnç genlerine rastlanmıştır (Zhou ve ark.,

2005; Ouoba ve ark., 2008). Probiyotik kültürler farklı gıda ürünlerine kullanılabileceği için antibiyotik direnç genlerinin yayılması için önemli bir potansiyel kaynak olma ihtimalleri bulunmaktadır (D'Aimmo ve ark., 2006).

Antibiyotik direnci, intrinsik olması durumunda ise istenen bir özellik haline gelmektedir. Bu durumda antibiyotik tedavi sürecinde probiyotikler canlı kalarak bozulan floranın olumsuz etkilerine karşı vücudu korumaktadır (Salminen ve ark., 1998b).

2.5. Probiyotikler ile İlgili Çalışmalar

Probiyotiklerin seçimi her zaman iki ana prensibi içermelidir: seçilen organizmanın güvenliğinin belirlenmesi ve amaçlanan kullanımına uygun özelliklerinin incelenmesi (O'Sullivan, 2006).

Neredeyse çalışılan her etkinin suşlara özel olduğu belirtilmektedir. Herhangi bir tür için tüm suşları sindirim sisteminde kolonize olur ve probiyotik etki gösterir denmesi mümkün değildir (De Vuyst ve ark., 2004).

Probiyotikler sindirim sisteminde birçok engelle karşılaşmaktadırlar. Bu engellerden en önemlileri midedeki asidik ortam ve ince bağırsaktaki safra suyudur (Gueimonde ve Salminen, 2006). Eğer bir probiyotik mide ve bağırsak ortamlarında sağ kalamıyorsa etkisi çok az olacaktır veya hiç olmayacaktır (O'Sullivan, 2006). Bu ortamlardan canlı olarak geçen probiyotiğin kalın bağırsağa gelerek burada tutunması ve aktivite göstermesi gerekmektedir (Morelli, 2007). Tutunma ile ilgili çalışmalarda genellikle insan veya hayvanlardan elde edilen bağırsak dokuları (Caco2 ve HT29 hücreleri) kullanılmaktadır. Aktivitenin ölçülmesi ile ise izole edilen kültürlerin sentezledikleri bileşenleri ve enzimleri ölçen çeşitli analitik metotlar ile olmaktadır.

Probiyotikler ile yapılan çalışmalarda test edilen kültürlerin hiçbirinin uzun süreli olarak sindirim sisteminde kolonize olamadığını göstermektedir. Ancak bu kültürlerden bir kısmı biyopsi işlemleri ile araştırıldığında fekal analizlere oranla çok daha uzun süre izole edilebildiği için sindirim sistemine tutunabildikleri kesin olarak belirtilmektedir. (Gueimonde ve Salminen, 2006).

3. MATERYAL METOT

3.1. Kullanılan Kùltürler ve Muhafazası

Çalışmada kullanılan kùltürler ve kodları Çizelge 3.1’de verilmiştir. Bu kùltürlerden 1-20 kodlu olanlar çeşitli fermente et ve süt ürünlerinden izole edilmiştir. Diğer kùltürler Türkiye’deki farklı bilimsel kurumlardan temin edilmiştir. Kùltürler %25 (v/v) gliserol (Sigma Aldrich, A.B.D.) içeren De-Man Rogosa Sharp (MRS, Merck, Almanya) broth besiyerinde -20°C’de muhafaza edilmiştir (Sharpe; 1979; Harrigan; 1998). Gliserolle muhafazanın yanında kùltürlerin liofilizasyonu yapılarak +4°C’de muhafaza edilmesi sağlanmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kùltürler ve kodları

Kod	Tür	Kod	Tür
1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	17	<i>Lactobacillus casei</i>
2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	18	<i>Lactobacillus plantarum</i>
3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	19	<i>Lactobacillus plantarum</i>
4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	20	<i>Lactobacillus casei</i>
5	<i>Lactobacillus casei</i>	21	<i>Lactobacillus casei</i>
6	<i>Lactobacillus casei</i>	22	<i>Enterococcus faecalis</i>
7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	23	<i>Lactobacillus brevis</i>
8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	24	<i>Lactobacillus casei</i>
9	<i>Lactobacillus paracasei</i>	27	<i>Pediococcus acidilacti</i>
10	<i>Lactobacillus plantarum</i>	28	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
11	<i>Lactococcus lactis</i>	32	<i>Lactobacillus plantarum</i>
12	<i>Lactobacillus helveticus</i>	33	<i>Lactobacillus brevis</i>
14	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	34	<i>Lactobacillus curvatus</i>
15	<i>Lactobacillus casei</i>	35	<i>Lactobacillus casei</i>
16	<i>Lactobacillus casei</i>		

3.2. Kullanılan Besiyerleri

Laktik asit bakterilerinin stoklanması, aktivasyonu ve probiyotik özelliklerinin incelenmesi çalışmalarında MRS besiyeri kullanılmıştır. Antibiyotik direci ile ilgili çalışmalar sırasında kùltürlerin inokulasyonu için % 1 (w/v) Agar-agar (Merck, Almanya) içeren MRS kullanılmıştır.

3.3. Deneysel Çalışmalar

3.3.1. Asit toleransının ölçülmesi

Asit tolerans deneyinde Klingberg ve ark. (2005) tarafından belirtildiği şekilde hidroklorik asit (HCL, Sigma Aldrich, A.B.D.) kullanılarak pH değeri 2,5'e getirilen MRS brothlar kullanılmıştır. MRS brothlarda iki kez aktive edilen edilen kültürler (18 saat) pH değeri 2,5 olan deney tüpleri içindeki 10 ml'lik MRS brothlara inoküle (%1) edilerek 0., 2. ve 4. saatlerde MRS agarlara ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petrilere 37°C'de 48 saat inkübe edilerek kültürlerin pH 2,5 değerinde canlılıkları takip edilmiştir.

3.3.2. Safra Suyu Toleransı

Safra tuzu toleransı deneyi için Suomalainen ve ark. (2008) ve Maragkoudakis ve ark. (2006)'nın uyguladığına benzer şekilde %0,3 Ovgall (Bile bovine, Sigma-Aldrich, A.B.D.) ile zenginleştirilmiş MRS broth kullanılmıştır. İki kez MRS brothlarda aktive edilen kültürler %0,3 (w/v) Ovgall içeren 10 ml'lik MRS brothlara inoküle (%1) edilmiştir. Daha sonra 0., 2. ve 4. saatlerde örnekler alınıp MRS agarlara ekim yapılmış, 37°C'de 48 saat inkübasyon sonucunda canlı bakteri sayımları yapılmıştır.

3.3.3. Fenol varlığında canlılık

Fenol varlığında gelişimin incelenmesi için Xanthopoulos ve ark.'nın (2000) uyguladığı metot kullanılmıştır. Analiz için iki kez MRS brothta aktive edilen kültürler (v/v) fenol (Sigma-Aldrich, A.B.D.) içeren ve içermeyen 10ml'lik MRS brothlara inoküle (%1) edilmiştir. Bakterilerin canlılıklarının takibi için 0. ve 24. saatlerde seri seyreltilimler hazırlanarak MRS agara yayma plak yöntemiyle ekim yapılmış ve 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

3.3.4. Safra Tuzu Hidrolaz (BSH) aktivitesi

Safra tuzu hidrolaz aktivitesi analizi için Du Toit ve ark. (1998) tarafından belirtilen yarı kalitatif bir yöntem kullanılmıştır. Analiz için iki kez aktive edilmiş kültürleri içeren MRS brotha daldırılan steril filtre kağıtları (Whatman Grade 1), %0.5 (w/v) oranında sodyum taurodeoxykolat (Na-TCDA, Sigma Aldrich, A.B.D.) ve 0.37 g/l kalsiyum klorür (CaCl₂, Sigma Aldrich, A.B.D.) içeren MRS agarlara

yerleştirilmiştir. Petriler 37°C’de 72 saat inkübe edildikten sonra petri kutusunda çökme oluşumu gözlenen zonların çapları ölçülmüştür.

3.3.5. Antibiyotik Hassasiyeti

Antibiyotik hassasiyeti analizi için Charteris ve ark. (2001) tarafından kullanılan disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem çerçevesinde 15 ml MRS agar içeren petrilere 200µl 10^6 - 10^7 kob/g aktif kültür içiren 4ml yumuşak ayar yayılmıştır. Petrilerdeki agarın donması için yaklaşık 15 dak. oda sıcaklığında bekletildikten sonra petriler üzerine antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir. Kullanılan diskler Çizelge 3.2’de verilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda (37°C / 24 saat) inhibisyon zonları ölçülmüştür. Sonuçlar, zonların çaplarına bağlı olarak Çizelge 3.3’te verilen kriterlere göre dirençli (R), orta dereceli hassas (MS) ve hassas (S) olmak üzere kategorize edilerek verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri (Oxoid, İngiltere)

Antibiyotik ismi	Disk Kodu	µg/disk
Ampicillin	AMP	10
Cephalothin	KF	30
Chloramphenicol	C	30
Erythromycin	E	15
Novobiocin	NV	5
Gentamicin	CN	10
Penicillin G	P	10
Rifampicin	RP	5
Tetracycline	TE	30
Vancomycin	VA	30

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan antibiyotik disklerde görülen zonların antibiyotik direnç karşılıkları (Charteris ve ark., 1998)

Antimikrobiyal adı	Disk konsantrasyonu (µg)	Zon çaplarının (mm) direnç karşılıkları		
		S	MS	R
Ampicillin	10	≤12	13-15	16≥
Cephalothin	30	≤14	15-17	18≥
Chloramphenicol	30	≤13	14-17	18≥
Erithromycin	15	≤13	14-17	18≥
Novobiocin	5	≤13	14-17	18≥
Gentamicin	10	≤12	-	13≥
Penicillin G	10	≤19	20-27	28≥
Rifampicin	5	≤14	15-17	18≥
Tetracycline	30	≤14	15-18	19≥
Vancomycin	30	≤14	15-16	17≥

Dirençli (R), orta dereceli hassas (MS) ve hassas (S)

3.3.6. Kolesterol Asimilasyonu

İki kez aktive edilmiş kültürler %0.3 oxgall ve 0.1g/l kolesterol (Sigma Aldrich, A.B.D.) içeren 10 ml'lik MRS brotlara %1 oranında inoküle edilmiştir. Benzer şekilde %0.3 Na-TCDA ve 0.1g/l kolesterol içeren MRS tüplere de inokülasyon yapılmıştır. İnokülasyon sonrası brotlar 37°C'de 24 saat fermantasyona bırakılmıştır. Fermantasyon işlemi takiben MRS brotlar 3500 rpm'de 20 dak. santrifüj işlemine (Nüve CN 180, Türkiye) tabi tutulmuş ve süpernatantlar elde edilmiştir.

Kolesterol analizi için Rudel ve Morris'in (1973) kullandığı yöntem kullanılmıştır. Süpernatantlardan 1 ml örnekler alınarak her tüpe 3 ml %95 etanol (Sigma Aldrich, A.B.D.) ve 2 ml potasyum hidroksit (KOH, Sigma Aldrich, A.B.D.) ilave edilmiştir. Her kimyasal ilavesi sonra karışımlar homojenize edilmiştir. Daha sonra tüpler su banyosunda 60°C'de 10 dak. bekletilmiş, soğuk su altında soğutulduktan sonra tüplere 5 ml hekzan (Sigma Aldrich, A.B.D.) ilave edilerek karıştırılmıştır. Daha sonra 1 ml distile su ilavesi ve karıştırmayı takiben tüper faz ayrımı için oda sıcaklığında 15 dak. tutulmuştur. Faz ayrımından sonra 3 ml hekzan tabakası temiz tüpe alınmış ve hekzan azot gazı akışı altında 60°C'de uçurulmuştur. Uçurma işleminden sonra tüplere 4 ml *o*-fitalaldehit çözeltisi (0.5mg *o*-fitalaldehit/1ml asetik asit) ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 10 dak. beklenmiştir. Daha sonra 2 ml sülfirik asit (Sigma Aldrich, A.B.D.) ilave edilmiş ve oda sıcaklığında tekrar 10dak. bekletilmiştir. Elde edilen çözeltinin absorbans değeri 550 nm'de kör çözeltiliye karşı

spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar standart kolesterol çözeltileri ile karşılaştırılarak kolesterol tüketimi hesaplanmıştır (EK B).

3.3.7. Bazı gıda ürünlerinde bakterilerin canlılıklarının korunumu

MRS brotlarda iki kez aktive edilen edilen kültürler marketlerden temin edilen UHT (Ultra heat treatment) süt, portakal suyu ve elma suyu ürünlerine Campagne ve Gardner (2008)'in çalışmasındakine benzer şekilde %1 oranında inoküle edilmiştir. Ürünler +4°C'de inkübe edilerek 0, 1, 2 ve 4. haftalarda kültürlerin sayımı yapılmış ve ürünlerin pH değerleri ölçülmüştür. Kültürlerin sayımı için uygun dilüsyonlardan MRS agara ekim yapılarak 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Laktik Asit Bakterilerinin Asidik Ortama Dirençleri

Sindirim sırasında mideden salgılanan sıvının pH değeri 0,9 olmasına rağmen gıda maddesi içerisindeki bileşenler nedeniyle midede sıvının pH değeri 3'e kadar çıkmaktadır (Erkkila ve Petaja, 2000). Asit toleransı ile ilgili çalışmalarda sabit bir pH değeri kullanılmamakla birlikte genel olarak sonuçlara bakıldığında daha asidik ortamlarda (pH 1-3 arası) çalışıldığında küçük değişimlerin bile önemli farklar yarattığı görülmektedir. Bu analizlerde pH değeri 2,0 olan bir koşul bazen çok seçici bir ortam sağlarken pH 3,0 değerinde ise bakterilerin gelişim gösterdiği gözlenebilmektedir. Dolayısıyla pH 2,5 değeri çok sık kullanılmamakla birlikte uygun bir değer olmaktadır (Pennacchia ve diğ., 2004). Bu çalışmada da mevcut bilgiler ışığında kültürlerin asit toleransı pH 2,5 değerinde analiz edilmiş ve 0., 2. ve 4. saatlerde canlılıkları izlenmiştir.

Asit toleransı analizine alınan 29 kültür için elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1.' de verilmiştir. Analiz edilen kültürlerden *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis* ve *L. casei* türlerinin asit toleransının suşlara özgü olduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçlara genel olarak bakıldığında benzer bazı çalışmalarda da belirtildiği üzere laktik asit bakterilerinin önemli bir kısmının pH 2,5 değerinde canlılıklarını koruyabildiği gözlenmektedir (Maragkoudakis ve ark. 2006; Dunne ve Mahony 2001; Mathara ve ark. 2008). Test edilen kültürlerin pH dirençlerinin Klingberg ve ark. (2005), Jacobsen ve ark. (1999)'un yaptığı çalışmalardaki kültürlerle oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmalarda pH 2,5 değerinde kültürlerin canlılıklarını önemli ölçüde kaybettikleri belirtilmektedir. Benzer şekilde Rashid ve ark. (2007) pH 3'te yaptıkları çalışmada önemli ölçüde canlılık kaybı tespit etmişlerdir. Elde edilen sonuçlara bakılarak test kültürlerinden bir kısmının pH dirençlerinin yüksek olduğu kabul edilmiştir.

Çizelge 4.1. Asit toleransı deneyinde elde edilen sonuçlar

Kültür		Bakteri sayısı (log kob/ml)*			Azalma	Azalma
Kod	Kültür	0. saat	2. saat	4. saat	(0-2)	(0-4)
1	<i>L. plantarum</i>	7,32 ± 0,29	7,18 ± 0,05	>6.48	0,14	<0,84
2	<i>L. plantarum</i>	7,14 ± 0,20	7,12 ± 0,25	>6.48	0,02	<0,66
3	<i>L. plantarum</i>	7,39 ± 0,09	7,31 ± 0,14	>6.48	0,08	<0,91
4	<i>L. lantarum</i>	7,46 ± 0,05	7,37 ± 0,07	>6.48	0,09	<0,98
5	<i>L. casei</i>	6,96 ± 0,29	6,67 ± 0,45	6,21 ± 0,26	0,29	0,75
6	<i>L. casei</i>	7,05 ± 0,10	7,08 ± 0,03	>6.48	-0,03	<0,6
7	<i>L. plantarum</i>	7,13 ± 0,40	6,90 ± 0,33	>6.48	0,23	<0,65
8	<i>L. plantarum</i>	6,19 ± 0,24	5,88 ± 0,13	4,57 ± 0,25	0,31	1,62
9	<i>L. paracasei</i>	7,61 ± 0,41	6,82 ± 0,22	<4.23	0,79	>3,38
10	<i>L. lantarum</i>	7,22 ± 0,14	7,17 ± 0,08	>6.48	0,05	<0,74
11	<i>L. lactis</i>	7,55 ± 0,20	7,23 ± 0,025	>6.48	0,32	1,07
12	<i>L. helveticus</i>	7,34 ± 0,06	6,83 ± 0,34	6,29 ± 0,21	0,51	1,05
14	<i>P. pentosaceus</i>	6,97 ± 0,12	6,94 ± 0,06	6,32 ± 0,01	0,03	0,65
15	<i>L. casei</i>	6,81 ± 0,64	<5,79	<4,33	>1,02	>2,48
16	<i>L. casei</i>	6,27 ± 0,32	6,13 ± 0,12	<4	0,14	>2,27
17	<i>L. casei</i>	7,36 ± 0,11	7,22 ± 0,02	>6.48	0,14	<0,88
18	<i>L. plantarum</i>	6,87 ± 0,37	6,85 ± 0,39	>6,37	0,02	<0,50
19	<i>L. plantarum</i>	7,27 ± 0,20	6,97 ± 0,10	5,95 ± 0,12	0,3	1,32
20	<i>L. casei</i>	7,00 ± 0,34	6,88 ± 0,27	>6,48	0,12	<0,52
21	<i>L. casei</i>	7,06 ± 0,24	7,06 ± 0,13	>6,48	0	<0,58
22	<i>E. faecalis</i>	6,89 ± 0,27	6,86 ± 0,28	>6,48	0,03	<0,41
23	<i>L. brevis</i>	6,71 ± 0,33	6,76 ± 0,07	>6,48	-0,05	<0,35
24	<i>L. casei</i>	7,41 ± 0,28	6,73 ± 0,04	>6,48	0,68	<0,93
27	<i>P. acidilacti</i>	7,53 ± 0,05	7,23 ± 0,02	>6,48	0,3	<1,05
28	<i>P. pentosaceus</i>	7,06 ± 0,09	5,45 ± 0,17	5,4 ± 0,08	1,61	1,66
32	<i>L. plantarum</i>	7,27 ± 0,29	7,11 ± 0,14	>6,48	0,16	<0,79
33	<i>L. brevis</i>	7,71 ± 0,15	6,25 ± 0,11	<4	1,46	>3,71
34	<i>L. curvatus</i>	7,79 ± 0,11	5,77 ± 0,73	<4,37	2,02	>3,42
35	<i>L. casei</i>	7,56 ± 0,23	<5,15	<4	>2,41	>3,56

Yapılan istatistiksel değerlendirmelerde iki paralelli iki tekrarlı (n=2) deneylerin sonuçları kullanılmıştır.

*Bakteri yoğunluklarının logaritmik değerleri verilmiştir.

4.2. Laktik Asit Bakterilerinin Safra Tuzu İçeren Ortama Dirençleri

Safra suyu karaciğerde kolesterol kullanılarak sentezlenir ve safra kesesinde depolanarak gerek duyulduğunda ince bağırsağa salgılanırlar (Mathara ve ark., 2008; Begley ve ark., 2006). Salgılanmasının temel nedeni biyolojik bir deterjan görevi görerek yağları emülsifiye etmesi ve çözündürmesidir. Yağlara olan etkisinden

dolayı mikroorganizmaların hücre zarına zarar vererek antimikrobiyal etki de sağlamaktadır. Hücre zarına etkisi dışında DNA'ya zarar vermesi, bazı proteinlerin denatürasyonuna yol açması ve serbest radikal oluşumuna neden olması gibi diğer antimikrobiyal etkilerini de bulunmaktadır (Begley ve ark., 2005b).

Safra suyu toleransı ile ilgili fizyolojik Ovgall konsantrasyonu %0,3-%0,5'tir (Mathara ve ark., 2008). Ovgall antimikrobiyal etki gösterebilecek konjuge ve dekonjuge safra bileşenlerini içermektedir (Liong ve Shah, 2005). Yapılan bazı çalışmalarda sonucunda safra tuzuna dirençli kültürlerin tespiti için %0,3 safra tuzu konsantrasyonunun kritik değer olduğu belirtilmektedir (Erkkila ve Petaja, 2000; Gilliland ve ark., 1985). Papamanoli ve ark. (2003) %0,1-2,0 aralığında beş farklı Ovgall konsantrasyonunda yaptıkları çalışmada %0,3 konsantrasyonda kültürlerin canlılıklarını koruması konusunda farklılıkların ortaya çıktığını ve %0,3 konsantrasyon değerinin probiyotik bakteri taramaları sırasında kullanılabilir kritik değer olduğunu belirtmiştir. Safra tuzu ile ilgili bir diğer önemli konu da asidik ortamda yapılan ön uygulamaların safra tuzu direnci ile çapraz bir koruma sağlamadığı ve safra tuzu direncinde artışa yol açmadığıdır (Flahaut ve ark. 1996). Dolayısıyla midedeki düşük pH değerinde canlı kalan bakterilerin safra tuzu dirençlerinde artış olmayacaktır.

Çizelge 4.2. Test kültürlerinin pH 2,5 değerinde canlılıkları

Kod	Kültürler Tür	Bakteri sayısı (log kob/ml)*			Azalma (0-2)	Azalma (0-4)
		0. saat	2. saat	4. saat		
1	<i>L. plantarum</i>	7,64 ± 0,03	7,57 ± 0,15	7,54 ± 0,10	0,07	0,10
2	<i>L. plantarum</i>	7,55 ± 0,25	7,61 ± 0,10	8,01 ± 0,07	-0,06	-0,46
3	<i>L. plantarum</i>	7,51 ± 0,13	7,53 ± 0,13	7,75 ± 0,10	-0,02	-0,25
4	<i>L. plantarum</i>	7,46 ± 0,17	7,54 ± 0,14	7,95 ± 0,11	-0,08	-0,50
5	<i>L. casei</i>	6,35 ± 0,48	6,35 ± 1,00	6,32 ± 0,90	0,01	0,03
6	<i>L. casei</i>	7,43 ± 0,07	7,31 ± 0,14	7,48 ± 0,11	0,11	-0,05
7	<i>L. plantarum</i>	7,50 ± 0,16	7,44 ± 0,12	7,90 ± 0,08	0,06	-0,40
10	<i>L. plantarum</i>	7,55 ± 0,04	7,68 ± 0,18	8,27 ± 0,11	-0,13	-0,72
14	<i>P. pentosaceus</i>	7,45 ± 0,15	7,56 ± 0,24	7,46 ± 0,05	-0,11	-0,02
17	<i>L. casei</i>	6,95 ± 0,14	6,90 ± 0,26	7,08 ± 0,29	0,05	-0,13
18	<i>L. plantarum</i>	7,21 ± 0,55	6,95 ± 0,65	7,69 ± 0,45	0,25	-0,49
20	<i>L. casei</i>	7,14 ± 0,29	7,29 ± 0,14	7,47 ± 0,08	-0,15	-0,33
21	<i>L. casei</i>	7,01 ± 0,14	7,14 ± 0,20	7,56 ± 0,10	-0,13	-0,56
22	<i>E. faecalis</i>	7,35 ± 0,14	7,29 ± 0,24	7,43 ± 0,31	0,06	-0,08
23	<i>L. brevis</i>	6,89 ± 0,41	7,21 ± 0,31	7,70 ± 0,10	-0,32	-0,81
24	<i>L. casei</i>	7,39 ± 0,06	7,29 ± 0,07	7,59 ± 0,14	0,10	-0,20
27	<i>P. acidilacti</i>	6,89 ± 0,72	7,03 ± 0,60	7,20 ± 0,69	-0,14	-0,31
32	<i>L. plantarum</i>	7,40 ± 0,21	7,40 ± 0,35	7,67 ± 0,18	0,00	-0,28

Safra suyunun test edilen kültürlerin üzerine etkisi Çizelge 4.2.'de verilmiştir. Bu sonuçlara genel olarak bakıldığında test edilen kültürlerin %0,3 (w/v) oxgall içeren MRS broth besiyerinde canlılıklarını koruduğu görülmektedir. Bu konsantrasyonda kültürlerin gelişmelerinin yavaşladığı ve bakteri yoğunluğundaki artış veya azalışın 1 log değerinin altında olduğu görülmektedir. Jacobsen ve ark. (1999) da yaptıkları çalışmada benzer şekilde %0,3 (w/v) oxgall konsantrasyonunun gelişmeyi yavaşlattığını ve bakterilerin bu ortamda bir birlerine yakın canlılık göstermeleri nedeniyle direnç konusunda benzer özellikte olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer diğer bazı çalışmalarda da *Lactobacillus* kültürlerinin %0,3 konsantrasyonda gelişmelerinin yavaşladığı tespit edilmiştir (Pennacchia ve ark. 2004; Gupta ve ark. 1996; Maragkoudakis ve ark. 2006). Aynı şekilde Suomalainen ve ark. (2007) *Propionibacterium* türleri üzerinde yaptıkları çalışmada %0,3 konsantrasyonun gelişimi engellediğini ve konsantrasyon %0,5'e çıkarıldığında ise bakterilerin gelişimlerinde %0,3 konsantrasyona oranla önemli bir fark göstermediğini belirtmiştir. Erkkila ve Petaja (2000) ise yaptıkları çalışmada bu sonuçların aksine %0,3'lük safra tuzu konsantrasyonunun kültürlerin gelişimini önemli ölçüde engellediğini ve kültürlerin direnç özellikleri bakımından fark gösterdiğini tespit etmiştir. Papamanoli ve ark. (2003) da %0,3 safra suyunun *L. curvatus* ve *L. sakei* kültürleri üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiğini tespit etmişlerdir. Klingberg ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmada %0,3 oranında safra tuzu varlığının inhibisyona yol açabildiğini ancak test edilen kültürlerin en az %86'sının probiyotik özellik gösterebilmesi için yeterli canlılığını koruduğunu saptamışlardır. Henüz safra suyu analizinde dirençli kültürlerin tespiti için standart bir metot ve değer olmamakla birlikte (Pinto ve ark., 2006) mevcut çalışmalar göz önüne alındığında test edilen kültürlerin tamamı safra tuzuna dirençli olarak kabul edilmiştir.

4.3. Laktik Asit Bakterilerinin Fenol İçeren Ortamda Canlılıkları

Fenoller, beslenme yoluyla alınan veya vücut tarafından üretilen proteinlerinlerden kaynaklanan amino asitlerin, sindirim sisteminde bazı bakteriler tarafından deaminasyonu sonucu oluşabilmektedir. Oluşan bu fenolik bileşenlerin özellikle *Lactobacillus* kültürleri üzerinde inhibe edici etkisi olabileceği belirtilmektedir (Xanthopoulos, 2000). Çizelge 4.3'de verilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde test edilen kültürlerin %0,4 fenol konsantrasyonuna hassas

oldukları görülmektedir. Sadece *L. casei* 21 test edilen koşullarda gelişim gösterirken *E. faecalis* 22 ve *L. casei* 24, 2 log'un altında bir azalma göstermiştir. Pinto ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmada da test edilen kültürler %0,4 fenole karşı hassas çıkmış ve gelişme gösterememiştir. Xanthopoulos ve ark. (2000) tarafından yapılan çalışmada ise test edilen kültürlerde direnç gösterenlerin oranı bu çalışmadakine oranla daha yüksek olmasına karşın direnç gösteren kültürlerdeki gelişim oranları bu çalışmadakine kültürlerle yakın seviyelerde kalmıştır. Acharya ve Shah (2002), yaptıkları çalışmada 17 *Bifidobacterium* kültürünün %0,2-0,5 arasında 4 farklı fenol konsantrasyonunda canlılığını izlemiştir. Test edilen kültürlerin tamamı %0,2 fenol varlığında gelişim göstermiştir. Konsantrasyon %0,5'e doğru yükseltildikçe canlılığın azaldığı belirtilmiştir. Pancheniak ve Soccol (2005)'in yaptıkları çalışmada da %0,4 fenol konsantrasyonunun 9 log'luk bir azalmaya yol açabildiği tespit edilmiştir. Sindirim sisteminde oluşabilecek fenolik bileşenlerin konsantrasyonu hakkında kesin değerler belirtilmemiş olmakla birlikte %0,4 konsantrasyonda canlı kalan kültürlerin yeterli dirence sahip olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 4.3. % 0,4 (v/v) fenol içeren MRS broth ortamında 24 saat sonunda test edilen bakterilerin canlılıkları

Kod	Kültürler	MRS Broth			MRS Broth + %0,4 fenol		
		0	24	$\Delta\log$	0	24	$\Delta\log$
1	<i>L. plantarum</i>	7,50±0,34	8,57±0,22	1,08	7,68±0,38	<5,56	<-2,12
2	<i>L. plantarum</i>	7,22±0,67	9,01±0,72	1,78	7,67±0,09	<5	<-2,67
3	<i>L. plantarum</i>	7,65±0,54	8,59±0,36	0,94	8,11±1,21	<5,15	<2,96
4	<i>L. plantarum</i>	7,14±0,14	8,23±0,42	1,08	7,15±0,09	<5,15	<-2
5	<i>L. casei</i>	6,95±0,31	8,80±0,53	1,85	6,62±0,36	<4	<-2,62
6	<i>L. casei</i>	7,53±0,22	8,93±0,28	1,40	7,28±0,36	<5	<-2,28
7	<i>L. plantarum</i>	7,38±0,44	8,59±0,22	1,20	7,36±0,56	<5	<-2,36
10	<i>L. plantarum</i>	7,53±0,17	9,27±0,13	1,74	7,47±0,07	<5	<-2,47
14	<i>P. pentosaceus</i>	7,39±0,04	8,77±0,59	1,38	7,43±0,20	<5	<-2,43
17	<i>L. casei</i>	6,63±0,25	8,20±0,18	1,57	6,82±0,11	<5	<-1,82
18	<i>L. plantarum</i>	7,54±0,45	8,85±0,16	1,31	7,50±0,63	<5,08	<-2,42
20	<i>L. casei</i>	7,17±0,07	8,90±0,30	1,73	7,11±0,09	<5	<-2,11
21	<i>L. casei</i>	6,87±0,41	8,85±0,40	1,98	6,73±0,16	8,03±0,13	1,30
22	<i>E. faecalis</i>	7,06±0,08	9,00±0,10	1,94	6,80±0,22	6,66±0,16	-0,14
23	<i>L. brevis</i>	6,99±0,12	9,05±0,11	2,06	6,92±0,14	<5	<-1,92
24	<i>L. casei</i>	7,51±0,10	9,18±0,18	1,67	7,47±0,12	5,71±0,33	-1,76
27	<i>P. acidilacti</i>	7,48±0,31	9,36±0,06	1,88	7,44±0,08	<5	<-2,44
32	<i>L. plantarum</i>	7,36±0,17	8,89±0,08	1,53	7,04±0,36	<5	<-2,04

Yapılan istatistiksel değerlendirmelerde iki paralelli iki tekrarlı (n=2) deneylerin sonuçları kullanılmıştır. Bakteri yoğunluklarının logaritmik değerleri verilmiştir.

4.4. Safra Tuzu Hidrolaz Aktiviteleri

Safra tuzu hidrolaz aktivitesi sıklıkla probiyotik kültürlerin seçiminde kullanılan bir kriter olarak gösterilmektedir. Probiyotik kültürleri tarafından üretilmiş olan farklı BSH enzimleri tanımlanarak karakterize edilmiştir. BSH enzimlerinin fonksiyonları tam olarak belirlenemese de bu konuda bazı hipotezler öne sürülmüştür. Bu hipotezler, besinsel rol, membran özelliklerinin değiştirilmesi, safra suyu detoksifikasyonu ve sindirim sistemindeki sürekliliğin sağlanması olarak gruplandırılmaktadır. Bu fonksiyonlara bağlı olarak konakçı canlı üzerinde sindirim fonksiyonlarının değişmesi, kolesterol seviyesinin düşmesi, kanserojen bileşenlerin aktive olması ve safra taşlarının oluşumu gibi etkilerin olabileceği belirtilmektedir (Begley, 2006).

Safra tuzu aktivitesi incelenmesi sonucu test edilen 18 kültürden 7 tanesi aktivite göstermiştir. Aktivite gösteren kültürlerle ait oluşan çökeltme zonu çapları Çizelge

4.4’de verilmiştir. Safra suyuna direnç testinde tüm kültürlerin canlılığını korumasına rağmen kültürlerden sadece yedi tanesinde BSH aktivitesi görülmesi safra suyu direnci ile BSH aktivitesi arasında ilişki olmadığı şeklinde yorumlanabilir. Benzer durum farklı çalışmalarda da vurgulanmaktadır (Moser ve Savage 2001; Usman ve Hosono 1999; Schillinger ve ark. 2005). Buna karşın diğer bazı çalışmalarmalarda ise safra tuzu hidrolizi ve safra suyu direnci arasında bir bağ olduğu bulunmuştur. Bu farklılığın nedeni olarak BSH enziminin sentezinden sorumlu genlerdeki mutasyon sonucu safra suyuna direncin azalabileceği gösterilmektedir (Grill ve ark. 2000; Begley ve ark. 2005).

Çizelge 4.4. Safra tuzu hidrolaz testi sonucu ölçülen zon çapları

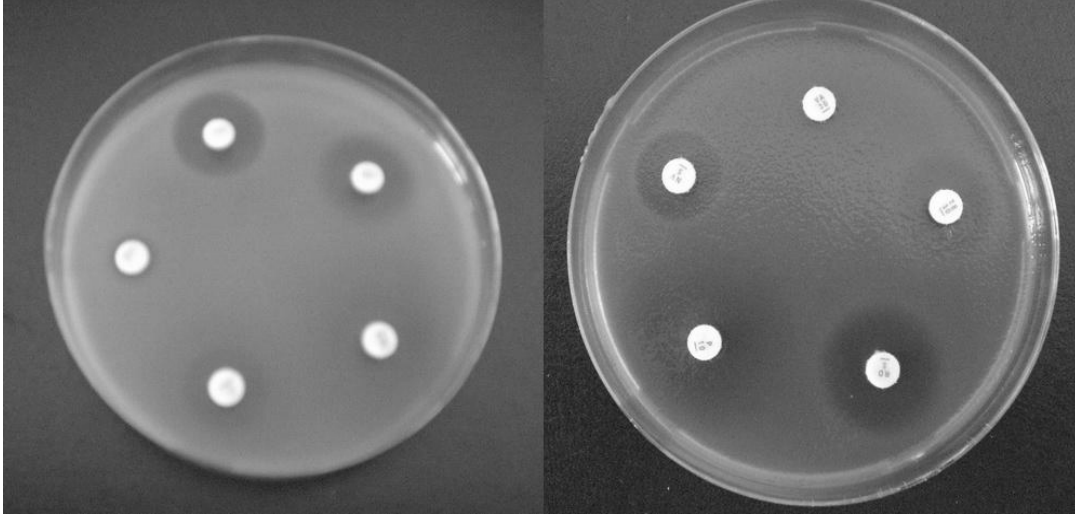
Kod	Tür	Zon çapı (mm)
5	<i>L. casei</i>	11,5
7	<i>L. plantarum</i>	7
17	<i>L. casei</i>	13
18	<i>L. plantarum</i>	13
20	<i>L. casei</i>	11
21	<i>L. casei</i>	7
22	<i>E. feacalis</i>	11
24	<i>L. casei</i>	10,5

Bulgularımızda gözleendiği şekilde aralarında korelasyon saptanamayan çalışmalarda taurokonjuge safra asitlerinin kullanılması (genelde BSH enzimleri glikokonjuge tercihi göstermektedir) ve safra suyu direncinde birçok faktörün etkin olması nedeniyle net bir sonuca varmanın mümkün olmadığı da belirtilmektedir. *In vitro* çalışmalarda BSH enzimleri tarafından dekonjuge hale gelen bileşenlerin inhibisyon etkisinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir ancak *in vivo* koşullarda oluşan dekonjuge bileşenleri çökmesi de mümkündür (Begley, 2006). Çökme olgusu petrielerde uygulanan BSH enzimi analizlerinde de görülmektedir. Bunun dışında oluşan dekonjuge bileşenlerin BSH aktivitesi olan veya olmayan bazı bakteriler tarafından detoksifiye edilmesi mümkündür.

4.5. Antibiyotik Dirençleri

Çalışmalar sırasında 3 farklı inhibisyon mekanizmasına sahip 10 antibiyotik kullanılmıştır. Bu antibiyotikler hücre duvarı sentezini engelleyicileri olarak “Ampicillin”, “Cephalothin”, “Penicillin G”, “Vancomycin”; protein sentezini

engelleyiciler olarak “Clyindamycin”, “Chloramphenicol”, “Erythromycin”, “Gentamicin”, “Tetracycline”; nükleik asit sentezini engelleyici olarak “Novobiocin”, “Rifampicin”den oluşmaktadır.



Şekil 4.1. Antibiyotik diskleri çevresinde oluşan zonlar

Disk difüzyon metodunda gözlemlenen zonlara örnek Şekil 4.1.’de verilmiştir. Ölçülen zon çapları Charteris ve ark. (1998)’in bulguları ile karşılaştırılarak belirlenen antibiyotik hassasiyeti testi sonuçları Çizelge 4.5’te verilmiştir.

Analize alınan kültürlerin tamamı birden fazla antibiyotiğe direnç göstermiştir. Laktik asit bakterilerinin sıklıkla birden fazla antibiyotiğe doğal olarak (intrinsik direnç) direnç gösterebildiği bilinmektedir (Ammor ve Mayo, 2007). Test edilen antibiyotiklere bakıldığında kültürlerden tamamının NV5’e ve dokuzunun AMP10’a hassas olduğu gözlenirken C30 ve TE30’a karşı da hassasiyetin önemli ölçüde olduğu görülmektedir. CN10’a karşı ise test edilen tüm kültürlerin de direnç gösterdiği dikkat çekmektedir. Ayrıca VA30 ve RP5’e karşı direnç gösteren bakteriler çoğunluktadır. Diğer antibiyotiklerde ise direnç konusunda farklılıklara rastlanmaktadır.

Çizelge 4.5. Antibiyotik disklerinde ölçülen zon çaplarına göre direnç değerlendirmeleri

Kod	Bakteri	AMP 10	KF 30	C 30	E 15	CN 10	NV 5	P 10	RP 5	TE 30	VA 30
4	<i>L. plantarum</i>	S	MS	S	S	R	MS	R	R	R	R
5	<i>L. plantarum</i>	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R
7	<i>L. plantarum</i>	S	MS	S	S	R	MS	R	S	MS	R
17	<i>L. casei</i>	S	R	MS	R	R	S	R	R	S	R
18	<i>L. plantarum</i>	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R
20	<i>L. casei</i>	S	MS	MS	R	R	S	R	R	S	MS
21	<i>L. casei</i>	S	MS	MS	R	R	S	MS	R	S	R
22	<i>E. feacalis</i>	S	MS	MS	R	R	S	R	R	S	MS
23	<i>L. casei</i>	S	MS	MS	R	R	S	MS	R	S	R
24	<i>L. rhamnosus</i>	MS	MS	S	S	R	S	R	MS	R	R

AMP: Ampicillin, KF: Cephalothin, C: Chloramphenicol, E: Eritromycin, NV: Novobiocin CN: Gentamicin, P: Penicillin, RP: Rifampicin, TE: Tetracycline, VA: Vancomycin
Dirençli (R), orta dereceli hassas (MS) ve hassas (S)

Laktik asit bakterilerinin “Ampicillin”e karşı hassiyeti benzer çalışmalarda da sıklıkla tespit edilmiştir (Strompfova ve ark., 2004; D’Aimmo ve ark., 2007; Mathara ve ark. 2008). Zhou ve ark. (2005) ise yaptıkları çalışmada test edilen kültürlerin tamamının “Novobiocin”e hassas olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca laktik asit bakterilerinin “Chloramphenicol” ve “Tetracycline” antibiyotiklerine karşı hassas olduğu da belirtilmektedir (Ammor ve Mayo, 2007). Ancak bu çalışmada olduğu gibi “Chloramphenicol” ve “Tetracycline”e dirençli kültürlerin de tespit edildiği çalışmalar bulunmaktadır (Charteris ve ark., 1998; Danielsen ve Wind, 2003). “Vancomycin”e karşı direnç özelliği laktik asit bakterilerinde sıklıkla tespit edilmekte ve intrinsik olduğu belirtilmektedir (Salminen ve ark., 1998b). “Gentamicin”e karşı direnç konusunda yaygın bir görüş olmamakla birlikte direnç gösteren bakterilerin olduğu çalışmalar bulunmaktadır (Lara-Villoslada, 2007; Zhou ve ark., 2005).

4.6. Kolesterol Asimilasyonu

Bazı *Lactobacillus* türlerinin kolesterolü asimile edebildiği belirtilmektedir. İnsanlardaki toplam kolesterol seviyesinin yüksek olmasının kalp-damar hastalıkları riskini arttırdığı yaygın olarak bilinmektedir. Bu yüzden probiyotikler için kolesterolü asimile edebilme kapasitesi önemli bir özellik olarak öne çıkmaktadır (Liong ve Shah, 2005).

Probiyotiklerin ortamdaki kolesterolü düşürebilmesi için safra tuzlarına ihtiyaç duyduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Bakterilerin kolesterolü kullanabilmesi için gerekli safra tuzu seviyesi ise ince bağırsaktakini geçmeyecek seviyede olduğu belirtilmektedir (Gilliland ve ark., 1985).

Çizelge 4.6. Kültürlerin % kolesterol asimilasyon değerleri

Kültür	BSH aktivitesi	Kolesterol Tüketimi			
		Oxgall		TCDA	
		% asimilasyon	pH	% asimilasyon	pH
21	-	97,90	4,24	28,80	4,22
22	+	78,10	4,86	38,00	4,45
24	-	82,30	4,75	22,80	4,78

Yapılan çalışmada sindirim koşullarına dirençleri göz önüne alınarak en fazla direnç gösteren 3 kültür kolesterol testine alınmıştır. Test edilen kültürlerden üçü de ortamdaki kolesterolü düşürmüştür. Çizelge 4.6'da görüleceği üzere en etkin kültür ortamdaki kolesterolün %97,9'unu indigeyen *L. casei* 21 olmuştur. *E. faecalis* 22 ise BSH aktivitesi pozitif olmasına rağmen en düşük aktiviteyi göstermiştir. Dolayısıyla BSH aktivitesinin kolesterol düşürme özelliği ile doğrudan ilgili olmadığı sonucuna varılabilir. Bu sonuç, Youngmoon ve ark. (2008) yaptıkları çalışmadaki BSH aktivitesi ile kolesterol asimilasyonu arasında bağlantı olmayabileceği sonucuyla paralellik göstermektedir. Genel olarak bakıldığında test edilen kültürlerin kolesterol düşürme özelliklerinin diğer bazı çalışmalarla karşılaştırıldığında yüksek olduğu belirlenmiştir (Mishra ve Prasad, 2005; Parvez ve ark., 2005; Pereira ve Gibson, 2002; Youngmoon, 2008).

Bir diğer önemli konu ise kolesterol asimilasyonunun Oxgall içeren ortamda daha yüksek olmasıdır. Elde edilen bu sonuç Mathara ve ark. (2008) yaptıkları çalışmanın tam tersidir. Farklı safra tuzlarının kolesterol asimilasyonu üzerine etkisi üzerinde daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

4.7. Gıdalarda Canlılığın Korunumu

Probiyotik kültürlerin gıdalarda kullanımları için gıdaların raf ömrü boyunca kültürlerin canlılıklarını koruması gerekmektedir. Bu nedenle genelde probiyotik gıda olarak bakterilerin canlılıklarını rahatlıkla koruduğu süt ve süt ürünleri tercih edilmiştir. Son dönemde ise alternatif ürün olarak meyve sularının da probiyotik ürün tasarımı için önemli bir potansiyel teşkil ettiği belirtilmektedir.

Probiyotik özellikleri tespit edilen 3 kültür, ürünlerdeki canlılıklarını ölçmek amacıyla ticari olarak satılan UHT süt, portakal suyu ve elma suyu ürünlerine inoküle edilerek canlılıkları incelenmiştir. Kültürlerin ürünlerdeki 0, 1, 2 ve 4. haftalardaki değerleri Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Kültürlerin test edilen ürünlerde gösterdikleri canlılık ve ürünlerin pH değerleri

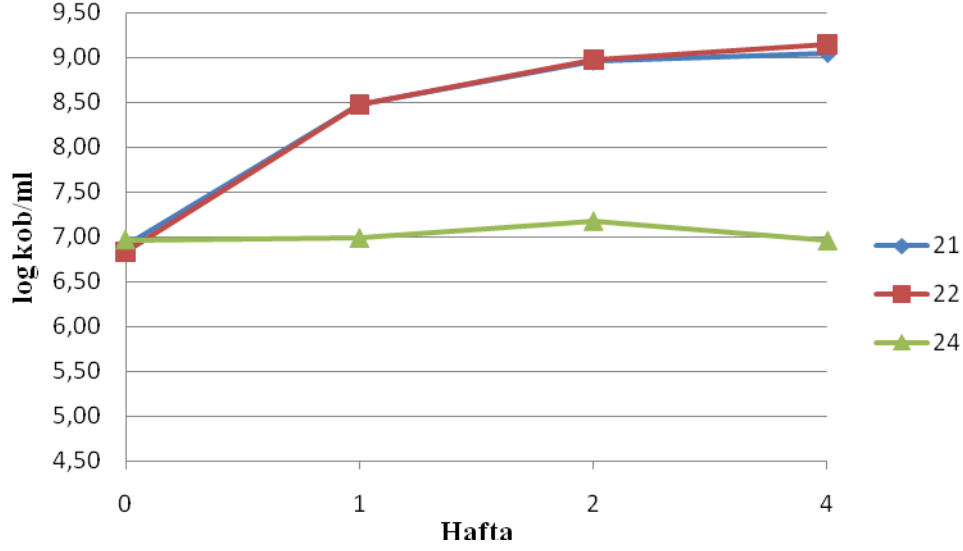
Kültür	Ürün	Hafta							
		0		1		2		4	
		Log*	pH	Log*	pH	Log*	pH	Log*	pH
21	Süt	6,90	6,7	8,48	5,86	8,96	5,43	9,04	4,95
	Portakal suyu	7,04	3,8	7,10	3,75	7,00	3,58	6,83	3,69
	Elma suyu	6,99	3,41	6,79	3,37	6,18	3,27	5,60	3,37
22	Süt	6,83	6,7	8,48	5,73	8,97	5,27	9,15	4,95
	Portakal suyu	6,50	3,8	6,70	3,71	6,80	3,57	6,68	3,69
	Elma suyu	6,67	3,41	6,31	3,37	5,90	3,27	4,79	3,37
24	Süt	6,97	6,7	6,98	6,36	7,17	6,39	6,95	6,49
	Portakal suyu	7,19	3,8	7,08	3,73	6,90	3,56	6,71	3,65
	Elma suyu	6,88	3,41	6,79	3,35	6,03	3,23	6,21	3,35

Verilen değerler 2 paralelli 2 tekrarlı (n=2) olan deneylerden elde edilen ortalama sonuçlardır.

*Kültürlerin ürünlerindeki miktarları log kob/ml olarak verilmiştir.

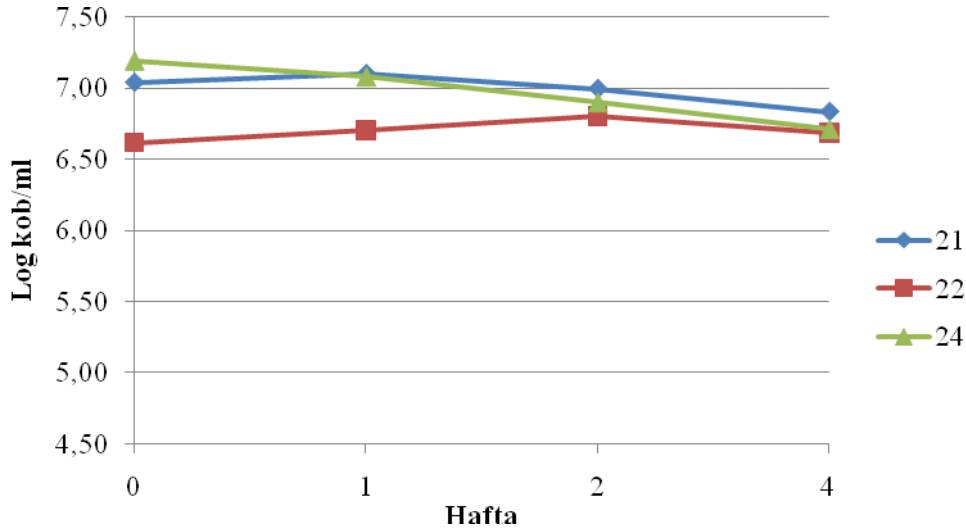
Tablodaki değerler incelendiğinde kültürlerin başlangıç olarak 6,6-7,2 log arasındaki değerlerde olduğu görülmektedir. İlk inokülasyon sonucunda kültürlerin değeri 6 log’tan fazla olduğu için probiyotik ürün olmak için yeterli miktarda kültür içermektedir.

Kültürlerin UHT sütteki canlılıkları Şekil 4.2.’de verilmiştir. Elde edilen değerlere bakıldığında 24 kodlu kültür canlılığını koruyup 10^6 kob/ml değerinin üzerinde sabit kalmıştır. Diğer 2 kültürse üründe gelişme göstererek 2 log’un üzerinde artış göstermişlerdir. Bu değerlere bakıldığında kültürlerin tamamı da süt ürününde yeterli seviyede canlılık göstermişlerdir.



Şekil 4.2. Probiyotik özellik gösteren kültürlerin UHT sütte 4°C’de 4 hafta süresince canlılıkları

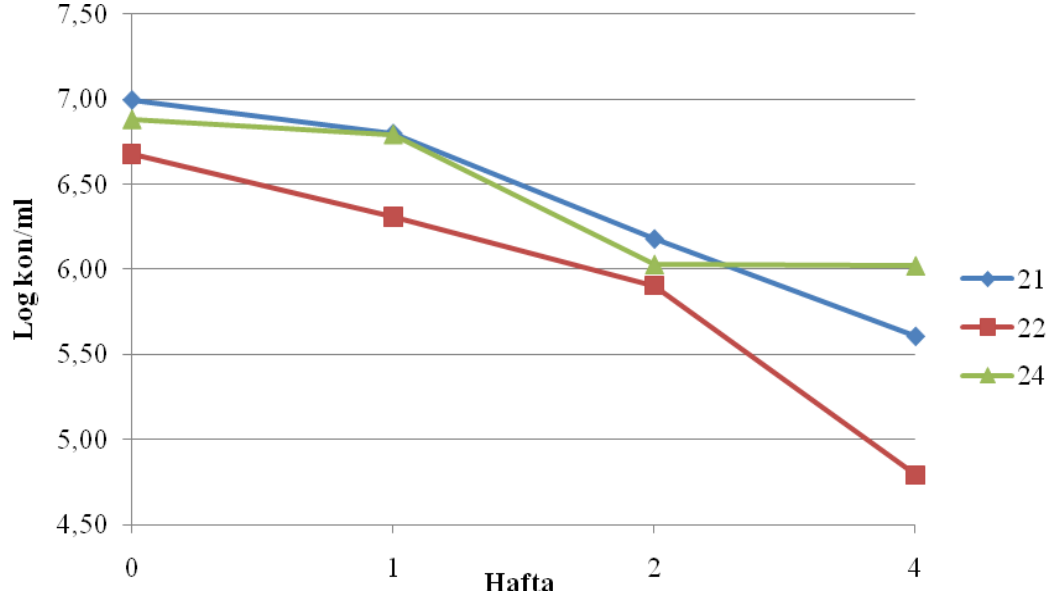
Kültürlerin portakal suyundaki canlılıkları Şekil 4.3’te verilmiştir. Ürünlerin üçünde de değişim 0,5 log’un altında kalmıştır. Bu nedenle kültürlerin tamamı portakal suyuna probiyotik özellik kazandırmak için kullanılma potansiyeline sahiptir.



Şekil 4.3. Probiyotik özellik gösteren kültürlerin portakal suyunda 4°C’de 4 hafta süresince canlılıkları

Kültürlerin elma suyundaki canlılıkları Şekil 4.4’te verilmiştir. Diğer ürünlerinde aksine elma suyunda kültürlerin canlılıklarında 1,5 log’un üzerinde azalma tespit edilmiştir. Gözlenen bu azalma nedeniyle probiyotik kültür miktarı üründe 10^6

kob/g'in altına inmiştir. Bu azalmanın nedeni olarak elma suyunun pH değerinin süt ve portakal suyundan daha düşük olması gösterilebilir. Elma suyunda en yüksek canlılığı 0,89 log'luk azalma ile 24 kodlu kültür göstermiştir. Ürünle ilgili tasarımlarda başlangıç inokülasyon seviyesinin ve beklenen raf ömrünü göz önüne alınması gerekmektedir.



Şekil 4.4. Probiyotik özellik gösteren kültürlerin elma suyunda 4°C’de 4 hafta süresince canlılıkları

Hekmat ve Reid (2007)’in yaptıkları çalışmada, probiyotik olduğu bilinen 2 laktik asit bakterisinden bir tanesi ticari olarak satılan UHT sütte 4°C’de 4 haftalık süre sonucunda azalma gösterirken diğer bakteri 0,5 log’un altında bir gelişme göstermiştir. Vinderola ve ark. (2008) yaptıkları çalışmalarda fermente süt ürünlerini göz önüne alarak sütün pH değerini 4,5 ve 5’e indirerek 19 kültürün canlılığını incelenmiştir. Bu çalışmada pH değeri düştüğünde kültürlerin gelişmelerinin durabildiği fakat 5°C’de 30 gün sonucunda kültürlerin canlılıklarındaki değişimin 1 log’un altında olduğu belirtilmiştir.

Sheenan ve ark. (2007), portakal suyu ve ananas suyu ürünlerinde ticari olarak kullanılan 2 probiyotik kültürle temin ettikleri 4 laktik asit bakterisinin canlılıklarını karşılaştırmıştır. Yaptıkları çalışma sonucunda portakal suyunda 4 haftalık süre sonucunda 2 kültür canlılığını kaybederken diğer 2 kültür ticari probiyotik kültürlerle birlikte 1 log’tan daha az azaltma göstermişlerdir. Bu çalışmadaki kültürler de 4

haftalık süre sonucunda portakal suyunda benzer canlılık göstermişlerdir. Campagne ve Gardner (2008) ticari olarak üretilen karışık meyve suyunda (portakal, elma, ananas, üzüm, kayısı, limon suyu karışımı) probiyotik özellik gösteren 9 laktik asit bakterisinin canlılıklarını incelemiştir. Bu çalışmada test edilen kültürler 2 tanesi istenen canlılığı gösterememiştir. Saarela ve ark. (2006a) da bu çalışmaya benzer şekilde yürüttükleri çalışmada test ettikleri *B. animalis* kültürünün probiyotik portakal suyu için uygun olduğunu belirtmiştir. Saarela ve ark. (2006b)'nin yaptıkları çalışmada lif taşıyıcılarıyla inoküle ettikleri liyofilize kültürlerin elma suyu için uygun olmadığını belirtmiştir. Ancak aynı çalışmada liyofilize kültürlerin aktivasyon sonrası canlılıklarının arttığı belirtilmiştir.

5. SONUÇ

Çalışmada probiyotik olma potansiyeli incelenen bazı laktik asit bakterilerinin öncelikle mide-bağırsak sisteminde canlılıkları *in vitro* analiz metotları kullanılarak araştırılmıştır. İlk aşamada midedeki asidik ortamda canlılığın gözlenmesi için pH değeri 2,5'e ayarlanan MRS kültür ortamında yeterli canlılığı göstermesi incelenmiştir. Analiz sonucunda test edilen 29 kültürden 20'sinin yeterli canlılığı gösterdiği tespit edilmiştir.

Daha sonra yeterli pH direnci olan kültürlerin % 0,3 Ovgall içeren MRS "broth"ta canlılıkları test edilerek ince bağırsakta salgılanan safra suyunun etkisi incelenmiştir. Analize alınan tüm kültürler 4 saatlik inkübasyon sonucunda beklenen canlılığı göstermiştir.

Fenoller sindirim sistemi ortamında sürekli bulunmasa bile çeşitli yollarla sindirim sistemine gelen amino asitlerin deaminasyonu sonucu oluşabilmektedir. Sindirim sisteminde bulunabilecek fenolik bileşiklerin laktik asit bakterileri üzerindeki bakteriyostatik etkilerinin incelenmesi için canlılık gösteren 20 kültürün % 0,4 fenol içeren MRS brothta canlılıkları incelenmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonucunda sadece 21, 22 ve 24 kodlu bakterilerin yeterli canlılığı gösterebildiği tespit edilmiştir.

Yine aynı 20 kültürün safra tuzu hidrolaz aktivitesi (BSH) incelenmiştir.

Kültürlerden sadece 5, 7, 17, 18, 20, 21, 22 ve 24 kodlu olan 8 tanesi BSH aktivitesi göstermiştir. Tüm kültürlerde yüksek safra suyu toleransı görülmesine rağmen sadece 8 kültürün BSH aktivitesine sahip olduğu göz önüne alınarak BSH aktivitesinin safra suyu direnci üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı kanısına varılmıştır. Eğer net bir etki söz konusu olsaydı BSH aktivitesine sahip olan kültürlerin en yüksek safra suyu direncine sahip olması gerekirdi. Ayrıca kültürlerin BSH aktiviteleri ile safra suyu dirençleri karşılaştırıldığında aralarında bir bağ bulunamamıştır (EK A).

Probiyotik bakterilerin gıdalarda kullanımında en büyük risk faktörü olarak antibiyotik direnç genlerini aktarma potansiyelleri görülmektedir. Ancak bu konuda LAB'ın

antibiyotiklere karşı sahip oldukları doğal direnç genleri konusunda genel bilgiler mevcut değildir. LAB'ın antibiyotiklere direnç profilleri konusunda daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır. Ayrıca bu çalışmaların derlenerek ortak bir sonuca varılabilmesi için standart bir metodun kullanılması gerekmektedir.

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda disk difüzyon, "broth" mikrodilüsyon, agar difüzyon gibi farklı metotlar kullanılması nedeniyle sonuçların karşılaştırılmasında zorluklar yaşanmıştır. Bu çalışmada en sık kullanılan disk difüzyon yöntemi tercih edilmiş ve bakterilerin 10 farklı antibiyotiğe karşı dirençleri incelenmiştir.

Yapılan tüm bu *in vitro* testler sonucunda sindirim sisteminde canlı kalabilecek üç kültür belirlenmiştir. Kolesterol asimilasyon testi sonucunda yüksek seviyede aktivite göstermeleri nedeniyle bu kültürlerin probiyotik potansiyele sahip olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte bazı laktik asit bakterilerinin antibiyotik direnç profilleri incelenmiştir.

Probiyotik özellik gösteren kültürlerin teknolojik olarak gıdalara uygunluğunu test etmek amacıyla kültürler ticari olarak satılan UHT süt, portakal suyu ve elma suyuna inoküle edilmiştir. Test edilen tüm kültürler bu gıdalarda yeterli canlılığı göstermiştir. Ancak gıdalarda kullanım sırasında ürünlerin tat ve koku gibi duyuşal özelliklerine etkisi de göz önüne alınmalıdır. Duyusal değerlendirmeler sırasında fark olması durumunda dahi ürünler üzerindeki probiyotik beyanı nedeniyle tüketici tarafından tercih edilme ihtimali bulunmaktadır. Bu özelliklere ilave olarak raf ömrü sonunda gıdalardaki probiyotik kültürlerin probiyotik özelliklerindeki değişimin de tekrar analiz edilerek incelenmesi faydalı olacaktır.

Bu aşamadan sonra bu bakterilerin β -galaktosidaz aktivitesi, prebiyotikleri parçalama ve sindirim sisteminde tutunması gibi probiyotik özelliklerinin *in vitro* analizlerle incelenmesinde fayda vardır. Kolesterol düşürme özelliği bir kültürün yararlı etki göstermesi için yeterli kabul edilebilecek olsa bile daha farklı yararlı etkilerinin incelenmesi de probiyotik potansiyelinin ortaya çıkarılması için önemlidir. Ayrıca tutunma analizleri ile bakterilerin sindirim sisteminde kolonize olması konusunda incelemeler yapılması da gerekmektedir. Bu çalışma içerisinde yapılan analizlerin farklı pH ve konsantrasyon değerleri kullanılarak detaylandırılması da faydalı bilgiler sağlayacaktır.

Bu çalışmada yapılan ve ileride yapılabilecek *in vitro* analizler bu kültürlerin probiyotik olabilmeleri için önemli kanıtlar olmakla birlikte probiyotik iddiası için

yeterli görülmemektedir. Kùltürlerin probiyotik olarak adlandırılabilmesi için insan veya hayvan denekler üzerine yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

Ayrıca bu kùltürlerin endüstriyel ölçekte kullanılabilir olması için uygun gelişim koşullarının incelenmesi de gerekmektedir. Liyofilizasyon ile stoklanmaları nedeniyle kùltürlerin bu işleme dayanıklı oldukları tespit edilmiştir. Dolayısıyla yeterli gelişim göstermeleri durumunda liyofilize olarak kullanılmalarında bir sorun bulunmamaktadır. Ancak bu çalışmada liyofilizasyon sonrası kùltürlerin aktivasyonu yapıldığı için doğrudan liyofilize kùltür kullanımı konusunda bilgi vermemektedir.

KAYNAKLAR

- Anon. 2002.** Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinin Genel Etiketleme ve Beslenme Yönünden Etiketleme Kuralları Tebliği. *Resmi Gazete* No. 24857, Tarih 25.08.2002.
- Ammor, M.S. ve Mayo, B., 2007.** Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: an update. *Meat Science*, 76, 138-146.
- Ammor, M.S., Florez, A.B. ve Mayo, B., 2007.** Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and *Bifidobacteria*. *Food Microbiology*, 24, 559–570.
- Acharya, M.R. ve Shah, R.K. 2002.,** Selection of human isolates of bifidobacteria for their use as probiotics. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 102, 81-97.
- Begley, M., Sleator, R.D, Gahan, C. G. M. ve C. Hill., 2005.** The contribution of three bile-associated loci (bsh, pva, and btlB) to gastrointestinal persistence and bile tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun*, 73, 894–904.
- Begley, M., Gahan, C.G.M., Hill, C., 2005b.** The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 625–651.
- Begley, M., Hill, C. ve Gahan, C.G., 2006.** Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1729-1738.
- Champagne, C.P. ve Gardner, N.J., 2005.** Challenges in the Addition of Probiotic Cultures to Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 61–84.
- Campagne, C.P. ve Gardner, N.J. 2008.** Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. *Food Research International*, 41: 539–543.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. ve Collins, J.K., 1998.** Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic *Lactobacillus* Species. *Journal of Food Protection*, 61(12), 1636-1643.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. ve Collins, J.K., 2001.** Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic *Lactobacilli*. *Journal of Food Protection*, 64(12), 2007-2014.
- Comanne, D., Hughes, R., Shortt, C. ve Rowland, I., 2005.** The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. *Mutation Research*, 591, 276–289.

- Cruz, A.G.D., Faria, J.D.A.F. ve Dender, A.G.F.V.**, 2007. Packaging system and probiotic dairy foods. *Food Research International*, 40, 951–956.
- D’Aimmo, M.R., Modesta, M.M. ve Biavati, B.**, 2007. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. Isolated from dairy and pharmaceutical products. *International Journal of Food Microbiology*, 15, 35-42
- Dambekodi, P. C., ve S. E. Gilliland.**, 1998. Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Bifidobacterium longum*. *Journal of Dairy Science*. 81, 1818–1824.
- De Vuylts, L., Avonts, L. ve Makras, L.**, 2004. Probiotics, prebiotics and gut health. In: Functional Foods, ageing and degenerative disease, Eds. C. Remacle, B. Reusens, Woodhead Publishing Limited and CRC Press Limited, England.
- De Vries, M.C., Vaughan, E.E., Kleerebezem, M. ve De Vos, W.M.**, 2006. *Lactobacillus plantarum*-survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, 16, 1018–1028.
- Du Toit, M., Franz, C.M.A.P., Dicks, L.M.P., Schillinger, U., Haberer, P., Warlies, B., Ahrens, F. ve Holzapfel, W.H.**, 1998. Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. *International Journal of Food Microbiology*, 40, 93-104.
- Erkkilä, S. ve Petäjä, E.**, 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science*, 55, 297-300.
- FAO/WHO.**, 2002. Guidelines for the evaluations of probiotics in food. Food and Agriculture Organization Working Group Report.
- Fooks, L.J., Fuller, R. ve Gibson, G.R.**, 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal*, 9, 53-61.
- Gibson, G.R. ve Roberfroid, M.B.**, 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125, 1401-1412.
- Gilliland, S.E., Nelson, C.R. ve Maxwell, C.**, 1985. Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied And Environmental Microbiology*, 49(2), 377-381.
- Grill, J. P., C. Cayuela, J. M. Antoine, and F. Schneider.**, 2000. Isolation and characterization of a *Lactobacillus amylovorus* mutant depleted in conjugated bile salt hydrolase activity: relation between activity and bile salt resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 553–563.
- Gueimonde, M. ve Salminen, S.**, 2006. New methods for selecting and evaluating probiotics, *Digestive and Liver Disease*, 38, 242-247.

- Harrigan, W.F.**, 1998. Laboratory methods in food microbiology. Sen Diego, Academic Pres.
- Hirayama, K. ve Rafter, J.**, 2000. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes and Infection*, 2, 681–686.
- Hekmat, S. ve Reid, G.**, 2007. Survival of *Lactobacillus reuteri* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 in milk. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 615-619.
- Heller, L.**, 2009. Danisco breaks down probiotics market. <<http://www.nutraingredients-usa.com/Industry/Danisco-breaks-down-probiotics-market>>, alındığı tarih 11.05.2009.
- Holzapfel, W.H.**, 2006. Introduction to Prebiotics and Probiotics. In: Probiotics in Food Safety and Human health, Eds. I. Goktepe, V.K. Juneja ve M. Ahmedna, Taylor and Francis Group, CRC Press Boca Raton, ss 1-35.
- Huggett, A.C. ve Verschuren, P.M.**, 1996. The safety assurance of functional foods. *Nutrition reviews*, 54, 143-140.
- Jacobsen, C.N., Nielsen, V.R., Hayford, A.E., Moller, P.L., Michaelsen, K.F., Pærregaard, A., Sandström, B., Tvede, M., Jakobsen, M.**, 1999. Screening of Probiotic Activities of Forty-Seven Strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro Techniques and Evaluation of the Colonization Ability of Five Selected Strains in Humans. *Applied And Environmental Microbiology*, 65(11), 4949-4956.
- Kleanhammer, T.R. ve Kullen, M.J.**, 1999. Selection and design of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 45–57.
- Klingberg T.D., Axelsson, L., Naterstad, K., Elsser, D. ve Budde, B.B.**, 2005. Identification of potential probiotic cultures for Scandinavia-type fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 419-431.
- Lara-Villoslada, F., Sierra, S., Martin, R., Delgado, S., Rodriguez, J.M., Olivares, M. ve Xaus, J.**, 2007. Safety assessment of two probiotic strains, *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 ve *Lactobacillus gasseri* CECT5714. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 175-184.
- Liong, M.T. ve Shah. N.P.**, 2005. Acid and Bile Tolerance and Cholesterol Removal Ability of *Lactobacilli* Strains. *Journal of Dairy Science*, 88, 55-66.
- Macfarlane, G.T. ve Gibson, G.R.**, 1994. Metabolic activities of the normal colonic flora. In *Human Health: The contrubution of microorganisms.*, ed. Gibson S.A.W. Springer, London, ss 17-52.
- Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulu, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. ve Tsakalidou, E.**, 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16, 189-199.
- Magarinos, H., Selaive, S., Costa, M., Flores, M. ve Pizarro, O.**, 2007. Viability of micro-orgnisms (*Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12) in ice cream. *International Journal of Dairy Technology*, 60(2), 128-131.

- Marco, M.L., Pavan, S. ve Kleereberzem, M.,** 2006. Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Current Opinion in Biotechnology*, 17, 204–210.
- Mathara, J.M., Schillinger, U., Kutima, P.M., Mbugua, S.K., Guigas, C., Franz, C. ve Holzapfel, W.M.,** 2008. Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from maasai traditional fermented milk products in Kenya. *Curr Microbiology*, 56, 315-321.
- Mishra, V. and Prasad, D.N.,** 2005. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 103, 109– 115.
- Morelli, L.,** 2007. In vitro assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality. *International Dairy Journal*, 17, 1278–1283.
- Moser, S. A. ve Savage, D. C.,** 2001. Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in lactobacilli. *Applied Environmental Microbiology*, 67, 3476–3480.
- Nguyen, T.D.T., Kang, J.H. and Lee, M.S.,** 2007. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 358–361.
- O’Sullivan, D.J.,** 2006. Primary sources of probiotic cultures. In: *Probiotics in Food Safety and Human health*, Eds. I. Goktepe, V.K. Juneja ve M. Ahmedna, Taylor and Francis Group, CRC Press Boca Raton, ss. 67-91.
- Ouoba, L.I.I., Lei, V. ve Jensen, L.B.,** 2008. Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and *Bifidobacteria* of African and European origin to antimicrobials: Determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 217–224.
- Ouwehand, A.C., Vankerckhoven, V., Goossens, H., Huys, G., Swings, J., Vancanneyt, M. Ve Lähteenmäki.,** 2006. The Safety of Probiotics in Foods in Europe and its Legislation. In: *Probiotics in Food Safety and Human health*, Eds. I. Goktepe, V.K. Juneja ve M. Ahmedna, Taylor and Francis Group, CRC Press Boca Raton, ss 1-35.
- Pancheniak, E.F.R. ve Soccol, C.R.,** 2005. Biochemical Characterization and identification of Probiotic *Lactobacillus* for Swine. *B. Ceppa, Curitiba*, 23(2), 299-310.
- Papamanoli, E. Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. ve Kotzekidou, P.,** 2003. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science*, 65, 859-867.
- Parvez, S., Kim, H.Y., Lee, H.C. ve Kim, D.S.,** 2006. Bile salt hydrolase and cholesterol removal effect by *Bifidobacterium bifidum* NRRL 1976. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 455-459.

- Pennacchia, C., Ercolini, D., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G. ve Villani, F.,** 2004. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat Science*, 67, 309-317
- Pennacchia, C., Vaughan, E.E. and Villani, F.,** 2006. Potential probiotic *Lactobacillus* strains from fermented sausages: Further investigations on their probiotic properties. *Meat Science*, 73(2006) 90–101.
- Pereira, D.I.A. ve Gibson, G.R.,** 2002. Cholesterol Assimilation by Lactic Acid Bacteria and *Bifidobacteria* Isolated from the Human Gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9): 4689–4693.
- Pereira, D.I.A., McCartney, L. ve Gibson, G.R.,** 2003. An In Vitro Study of the Probiotic Potential of a Bile-Salt-Hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* Strain, and Determination of Its Cholesterol-Lowering Properties. *Applied and environmental microbiology*, 69(8): 4743–4752.
- Pinto, M.G.V., Franz, C.M.A.P., Schillinger, U. and Hopzapfel, W.H.,** 2006. *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *International Journal of Food Microbiology*, 109, 205–214.
- Prado, F.C., Parada, J.L., Padney, A. ve Soccol, C.R.,** 2008. Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*, 41, 111–123.
- Rudel, L.L. ve Morris, M.D.,** 1973. Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde. *Journal of Lipid Research*, 14, 364-366.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J. ve Sandholm, T.M.,** 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84, 197–215.
- Saarela, M., Virkajärvi, I., Alakomi, H.L., Mattila, P.S. ve Mättö, J.,** 2006a. Stability and functionality of freeze dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. *International Dairy Journal*, 16, 1477-1482.
- Saarela, M., Virkajärvi, I., Nohynek, L., Vaari, A. ve Mättö, J.** 2006b. Fibres as carriers for *Lactobacillus rhamnosus* during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 112, 171–178
- Saarela, M.,** 2007. Functional Foods: Probiotics. In: Anti-Angiogenic Functional and Medicinal Foods, Eds. J.N. Losso, F. Shahidi ve D. Bagchi. Taylor and Francis Group, CRC Press Boca Raton, ss 611-625.
- Salminen, S., Ouwehand, A.C. ve Isolauri.,** 1998. Clinical applications of probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 8, 563-572.
- Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., Vos De, W.M., Fonde'n, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E., Sandholm, T.M.,** 1998b. Demonstration of safety of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 44, 93-106.
- Schillinger, U., Guigas, C. ve Holzapfel, W.H.,** 2005. *In vitro* adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *International Dairy Journal*, 15, 1289-1297.

- Sharpe, M.E.**, 1979. Identification of lactic acid bacteria. In F.A. Skinner ve D.W. Lovelock, Eds. Identification methods for microbiologists, London Academic Press. pp. 233-259.
- Sheenan, V.M., Ross, P. ve Fitzgerald, G.F.**, 2007. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8: 279-284.
- Strompfova, V., Laukova, A. ve Ouwehand, A.C.**, 2004. Selection of *enterococci* for potential canine probiotic additives. *Veterinary Microbiology*, 100: 107-114.
- Suomalainen, T., Sigvart-Mattila, P., Mätto, J. ve Tynkkynen, S.**, 2008. In vitro and in vivo gastrointestinal survival, antibiotic susceptibility and genetic identification of *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS. *International Dairy Journal*, 18, 271-278
- Taranto, M. P., M. L. Fernandez Murga, G. Lorca, and G. Font de Valdez.**, 2003. Bile salts and cholesterol induce changes in the lipid cell membrane of *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 86–91.
- Taranto, M.P., Martinez, G.P. ve de Valdez, G.F.**, 2006. Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration. *Research in Microbiology*, 157, 720–725.
- USMAN (The United Graduate School of Agricultural Science) ve Hosono, A.**, 1999. Bile tolerance, taurocholate deconjugation, and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri* strains. *Journal Dairy Science*, 82, 243–248.
- Vesterlund, S., Vankerckhovan, V., Saxelin, M., Goosens, H., Salminen, S. ve Ouwehand, A.C.**, 2007. Safety assessment of *Lactobacillus* strains: Presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 116, 325–331
- Vinderola G., Capellini, B., Villareal, F., Suarez, V., Quiberoni, A. ve Reinheimer, J.**, 2008. Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. *Food Science and Technology*, 41, 1678-1688.
- Xanthopoulos, V., Litopoulou-Tzanetaki, E. ve Tzanetaki, N.**, 2000. Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant faeces as dietary adjuncts. *Food Microbiology*, 17, 205-215.
- Zhao, R., Sun, J. ve Mo, H.**, 2007. Analysis of functional properties of *Lactobacillus acidophilus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 195-200.
- Zhou, J.S., Pillidge, C.J., Gopal, P.K. ve Gill, H.S.**, 2005. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 98, 211-217.

Ziemer, C.J. ve Gibson, G.R., 1998. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *International Dairy Journal*, 8, 473-479.

EK A DEĞERLENDİRME ÇİZELGELERİ

Çizelge A.1. Antibiyotik direnç testlerinde ölçülen zon çapları (mm)

Kod	Bakteri	AMP	KF	C	E	CN	NV	P	RP	TE	VA
4	<i>L. plantarum</i>	24,5	15	21,25	21,5	9,25	15	14,75	14	14	6
5	<i>L. plantarum</i>	11,25	8,75	13	11,25	6	9	6	8,5	21	13,25
7	<i>L. plantarum</i>	26	15,25	20,25	21,5	10,25	15	16	18	14,75	6
17	<i>L. casei</i>	20	13,25	16,25	11,75	6	9,75	18	8,5	24	14
18	<i>L. plantarum</i>	19	17,5	20	21	9	15,5	19,25	18	18,5	6
20	<i>L. casei</i>	18,5	14,75	15,75	12	6	10	19,5	9	21,5	14
21	<i>L. casei</i>	21,5	15,5	17,25	12	6	10,5	21,75	9	22,5	14,5
22	<i>E. feacalis</i>	19	15,25	16,25	12	6	10,5	16,25	9	21,5	14
23	<i>L. brevis</i>	19,75	14,75	16,5	12	6	10,5	20,25	9,5	22	14,5
24	<i>L. casei</i>	14,5	17	18	19,5	7,25	12,5	19,25	15	14	6

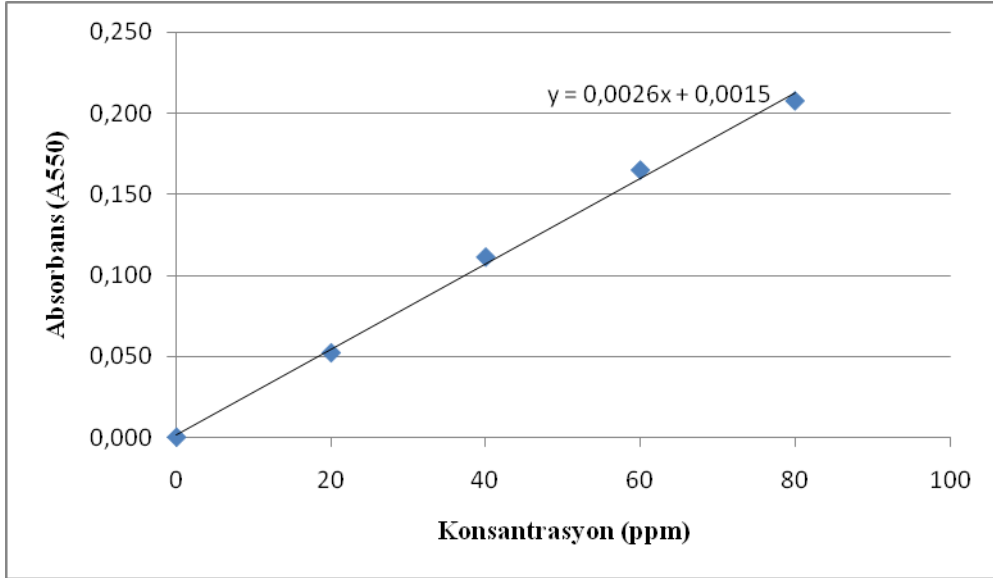
Çizelge A.2. BSH akvitesi ve safra suyu direnci karşılaştırması

Kod	Tür	Değişim (log/cfu)	BSH zon çapı (mm)
18	<i>L. plantarum</i>	-0,49	13
5	<i>L. casei</i>	0,03	11,5
20	<i>L. casei</i>	-0,33	11
22	<i>E. feacalis</i>	-0,08	11
24	<i>L. casei</i>	-0,20	10,5
7	<i>L. plantarum</i>	-0,40	7
21	<i>L. casei</i>	-0,56	7

EK B KOLESTEROL ASİMİLASYONU İÇİN KALİBRASTON GRAFİKLERİ

Çizelge B.1. Ovgall içeren standart kolesterol çözeltilerinde ölçülen absorbands değerleri

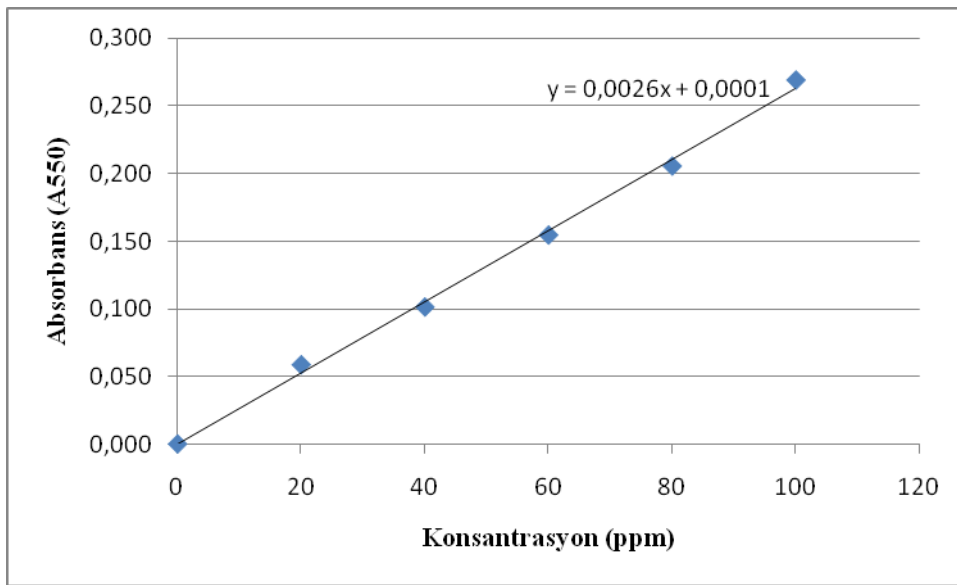
Konsantrasyon (ppm)	Ovgall			Ort. A550
	1	2	3	
0	0	0	0	0,000
20	0,045	0,058	0,053	0,052
40	0,12	0,111	0,102	0,111
60	0,17	0,164	0,16	0,165
80	0,21	0,2	0,212	0,207
100	0,292	0,298	0,301	0,297



Şekil B.1. Ovgall içeren ortamdaki kolesterol ölçüm eğrisi

Çizelge B.2. TCDA içeren standart kolesterol çözeltilerinde ölçülen absorban değerleri

Konsantrasyon (ppm)	TCDA			Ort. A550
	1	2	3	
0	0	0	0	0,000
20	0,058	0,068	0,05	0,059
40	0,094	0,12	0,09	0,101
60	0,142	0,192	0,13	0,155
80	0,208	0,215	0,194	0,206
100	0,24	0,286	0,282	0,269



Şekil B.2. TCDA içeren ortamdaki kolesterol ölçüm eğrisi

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Erdem Akman

Doğum Yeri ve Tarihi: İstanbul - 09.06.2009

Adres: Cumhuriyet M. Hasan Tahsin Üçel S. No:3/5 Büyükçekmece/İstanbul

Lisans Üniversite: İstanbul Teknik Üniversitesi