T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI TİCARİ YOĞURT STARTER KÜLTÜRLERİNİN İN VİTRO KOLESTEROL ASİMİLASYONU

Safiyye ACAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ocak-2014

KONYA

Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

BAZI TİCARİ YOĞURT STARTER KÜLTÜRLERİNİN İN VİTRO KOLESTEROL ASİMİLASYONU

Safiyye ACAR

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yusuf DURAK

2014, 35 +VIII Sayfa

Jüri
Prof. Dr. Yusuf DURAK
Doç. Dr. Cengiz AKKÖZ
Yrd. Doç. Dr. Mustafa Onur ALADAĞ

Bu çalışmada, ticari olarak satılan yedi farklı liyofilize yoğurt starter kültürü alındı. Bu kültürlerden izole edilen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* suşlarının in vitro olarak kolesterolü indirgeme yetenekleri araştırıldı. Starter kültürlerdeki karışık suşların izolasyonu ve saflaştırılması MRS agar (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) ve M17 agar (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) besiyerlerinde yapıldı. Bakteri kültürleri santrfüj edildi ve süpernatantlar RTU kolesterol kiti yardımı ile incelendi. Çözeltilerin absorbans değerleri spektrofotometre ile ölçüldü ve suşların kolesterol indirgeme yüzdeleri hesaplandı.

Lactobacillus suşlarının % 4.05-24.34 arasında değişen oranlarda besiyerindeki kolesterolü indirgediği saptandı. En yüksek kolesterol indirgeme yüzdesi % 24.34 oranı ile Y30A kültür no'lu suşta gözlenmesine rağmen, en düşük kolesterol indirgeme yüzdesi ise % 4.05 oranı ile Y80A kültür no'lu suşta görüldü. Aynı starter kültürlerde bulunan *Streptococcus* suşlarının % 2.54-11.02 arasında değişen oranlarda kolesterol seviyelerini indirgediği belirlendi. *Streptococcus* suşlarının en yüksek kolesterol indirgeme yüzdesi % 11.02 oranı ile Y80A kültür no'lu suşta belirlenmesine rağmen, en düşük kolesterol indirgeme yüzdesi % 2.54 oranı ile Y30A kültür no'lu suşta belirlendi.

Çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre; aynı starter kültür içerisinde bulunan farklı türdeki yoğurt bakterilerinin farklı oranlarda kolesterol indirgeme kapasiteli oldukları belirlendi. Bu azalmanın bakterilerin asimilasyon mekanizması ile gerçekleştiği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Kolesterol asimilasyonu, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, yoğurt starter kültürleri.

ABSTRACT

MS THESIS

IN VITRO CHOLESTEROL ASSIMILATION OF SOME COMMERCIAL YOGHURT STARTER CULTURES

Safiyye ACAR

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN BIOLOGY

Advisor: Prof. Dr. Yusuf DURAK

2014, 35 + VIII Pages

Jury
Prof. Dr. Yusuf DURAK
Assoc. Prof. Dr. Cengiz AKKÖZ
Asist. Prof. Dr. Mustafa Onur ALADAĞ

In this study, in vitro cholesterol reducing capacity of the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* strains isolated from seven different yogurt starter cultures obtained commercially were studied. Isolation and purification of the strains mixed in the starter cultures were carried out by MRS agar (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) and M17 agar (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) mediums. The cultures of the bacteria were centrifuged and supernatants were mixed with RTU Cholesterol kit. Absorbances of the solutions were measured by spectrophotometer and percentages of cholesterol reducing capacities of the strains were calculated.

It was determined that *Lactobacillus* strains reduced cholesterol levels in the medium ranging between 4.05 and 24.34 % rates. Although the highest cholesterol reduction percentage of the *Lactobacillus* strains was observed in the Y30A numbered cultures at a ratio of 24.34 %, the lowest cholesterol reduction percentage was observed in the Y80A numbered cultures at a ratio of 4.05%. It was determined that *Streptococcus* strains in the same starter cultures reduced cholesterol levels ranging between 2.54 and 11.02% ratios. While the highest cholesterol reduction percentage of the *Streptococcus* strains were determined in the Y80A numbered cultures with a ratio of 11.02%, the lowest cholesterol reduction percentage was determined in the Y30A numbered cultures at a ratio of 2.54%.

Based on the results obtained from the assays it was determined that different types of yogurt bacteria within the same starter cultures were capable of reducing cholesterol in different ratios. This reduction was believed to be due to the assimilation mechanism of bacteria.

Keywords: Cholesterol assimilation, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, yogurt starter culture

ÖNSÖZ

Bu çalışma 2009-2014 yılları arasında Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır. Çalışmada bazı ticari yoğurt starter kültürlerinin in vitro kolesterol asimilasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

Tez çalışmamın yürütülmesinde bilgilerini ve önerilerini benden esirgemeyen, bana her türlü imkânı sağlayan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Yusuf DURAK'a (S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü), karşılaştığım zorluklarda bana yol gösteren ve tezimin düzenlenmesinde büyük rolü olan Sayın Öğr. Gör. Dr. Ahmet UYSAL'a (S:Ü. Sağlık Hizmetleri M. Y. O.), sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında, yardımlarıyla çalışmalarımda büyük kolaylık sağlayan Sayın Arş. Gör. Erdoğan GÜNEŞ'e (S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü), spektrofotometrik ölçümlerde bilgisini benden esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Dr. Evren YILDIZTUGAY'a (S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü), görüş ve fikirleri ile bana yardımcı olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa Onur ALADAĞ'a (S:Ü. Sağlık Hizmetleri M. Y. O.), manevi desteğiyle her zaman yanımda olan ikiz kardeşim Betül ACAR'a, ayrıca maddi-manevi desteklerini benden esirgemeyen anneme ve babama teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde maddi destek sağlayan S.Ü. Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü'ne (BAP-11201062 nolu proje) katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Safiyye ACAR
KONYA-2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **viii**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **3**

3. MATERYAL VE YÖNTEM **11**

3.1. Materyal 11
3.1.1. Kullanılan test suşları 11
3.1.2. Kullanılan besiyerleri 11
3.1.3. Kullanılan boyalar ve diğer solüsyonlar 13
3.2. Yöntem 13
3.2.1. Starter kültürlerin canlandırılması 13
3.2.2. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*'un identifikasyonu 13
3.2.3. Gram Boyama 15
3.2.4. Stok kolesterolün hazırlanması (7 mg/ml) 16
3.2.5. Besiyerlerine kolesterolün ilavesi 16
3.2.6. Spektrofotometre Ölçümleri 17
3.2.7. Yüzde kolesterol asimilasyonunun belirlenmesi 17

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA **19**

4.1. Spektrofotometrik ölçümler 19
4.1.2. Kolesterol konsantrasyonlarının hesaplanması 21
4.1.3. Yüzde kolesterol asimilasyonunun hesaplanması 22

5. SONUÇ VE ÖNERİLER **29**

5.1. Sonuçlar 29
5.2. Öneriler 29

KAYNAKLAR **31**

ÖZGEÇMİŞ **35**

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C: santigrad derece

cm: santimetre

dm^3: desimetre küp

g: gram

l: litre

mg: miligram

ml: mililitre

µg: mikrogram

µl: mikrolitre

nm: nanometre

pH: hidrojen gücü (power of hydrogen)

rpm: rate per minute

subsp: subspecies

spp: species

var: varyete

Kısaltmalar

ATCC: Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu

BSH: Safra tuzu hidrolaz

EPS: Ekzopolisakkarit

GIT: Gastrointestinal sistem

HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein

LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein

MRS: De man Rogasa Sharp

1. GİRİŞ

Kolesterol, hayvansal hücrelerin membranında bulunan ve insan metabolizmasında önemli rol oynayan organik bir maddedir. Kanda ve bütün organizmada belirli miktarda kolesterol bulunmakla birlikte; safra asitleri, cinsiyet ve adrenalin hormonları gibi bazı steroid hormonların biyosentezinde de kolesterol gereklidir. Vücuda gıda maddeleri yolu ile giren ve bağırsaklarda absorbe edilen kolesterolden çok daha fazlası, vücut tarafından ihtiyaca bağlı olarak sentezlenmektedir (Gönç ve ark., 1996).

Yapılan çalışmalar, aşırı gıda tüketiminin kandaki kolesterol seviyesiyle yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. Fazla beslenme kolesterolün artışına neden olarak hiperkolesterolemiye ve dolaşım sisteminde aterosiklerotik değişimlere yol açabilmektedir (Tok ve Aslım, 2007). Çeşitli araştırmalar; kardiyovasküler hastalıkların, kanser hastalıkları gibi ölümlerin önde gelen nedenlerinden biri olduğunu göstermektedir. Çalışma sonuçları, kandaki kolesterol düzeyinin uzun süre yüksek konsantrasyonlarda seyretmesinin, koroner kalp rahatsızlıklarının risk faktörü olduğuna işaret etmektedir (Aloğlu ve Öner, 2006). Çalışmalar, serum kolesterolündeki % 1 gibi küçük bir azalmanın, koroner kalp rahatsızlıkları riskini % 2-3 oranında azaltabileceğini göstermiştir (Manson ve ark., 1992). Bugün pek çok ülkede yapılan araştırmalarda, her yıl koroner kalp hastalıkları nedeniyle meydana gelen ölümlerin, kanserle meydana gelen ölümlerle eşdeğer olduğu göstermektedir (Urkun, 1998). Kalp damar hastalıklarının seyri izlendiğinde, bu hastalarda kan kolesterol seviyelerinin sürekli yüksek olması, kolesterol molekülünün sorgulanmasına neden olmuştur. Kandaki yüksek kolesterol seviyesinin ölümlerin yanı sıra felçlere neden olması, araştırmacılara bu yüksek seviyenin düşürülmesi gerektiğini düşündürmüştür (Urkun, 1998).

Son çalışmalar kan kolesterolünü düşürmek için diyet, düzenli egzersiz ve ilaç tedavisinin olması gerektiğini göstermiştir. Bununla beraber, farmakolojik ajanlar kolesterolü düşürmede etkilidir ancak pahalıdırlar ve birçok yan etkilerinin olduğu bilinmektedir. Bu durum, bilim adamlarını kolesterolü düşürmek için doğal gıdaları araştırmaya itmiştir (Kumar ve ark., 2012).

1970'li yıllardan bu yana insanlar ve deney hayvanları üzerinde yapılan araştırmalarda süt, yağsız süt ve çeşitli süt mamullerinin kolesterolü düşürücü yönde etki gösterdiğini ortaya koymuştur (Gönç ve ark., 1996). Son yıllarda, laktik asit bakterileri, özellikle de laktobasiller anti-kolesterol, antidiyabetik, antipatojenik ve

antikanserojenik özellikleri ve bağışıklık sistemini uyarması gibi sağlık açısından yararlı etkileri nedeniyle büyük ilgi odağı haline gelmiştir (Kumar ve ark., 2012). Bazı laktik asit bakterileri, gelişmeleri sırasında kolesterolü ince bağırsaklarda tutma yeteneğine sahiptir. İnce bağırsak, insanlarda serum kolesterol konsantrasyonunun kontrolünde potansiyel bir yardım sağlamaktadır. Çünkü ince bağırsak kolesterol absorbsiyonunun yapıldığı ilk yerdir (Noh ve ark., 1997). Laktik asit bakterilerinin ve aktif safra tuzu hidrolaz içeren ürünlerin, konak safra tuzu metabolizmasıyla etkileşimi sonucu kolesterol seviyesini düşüreceği öne sürülmüştür. Laktik asit bakterileri, gastrointestinal sistem içindeki safra asitlerinin salgılarını uyarır ve serbest safra asitleri, laktik asit bakterilerinin yüzeyine bağlanır. Sonuçta kan damarlarındaki kolesterolde genel bir azalma olur (Tok ve Aslım, 2007). Liong ve Shah'a (2005) göre, gastrointestinal sistemdeki serbest safra asitleri bakterilere veya diyetle alınan liflere bağlanarak safra asitlerinin atılımını artırır. Bu eylem aynı zamanda safra asitleri içindeki hepatit kolesterol sentezini düzenleyen bir geri beslenmeyi tetikler. Böylece serum konsantrasyonu düşer. Bu durum, safra tuzlarıyla kolesterolün kaldırılması arasındaki ilişkinin önemli olduğunu ortaya koymaktadır (Kim ve ark., 2008).

Bu çalışmada, ticari olarak elde edilen bazı yoğurt starter kültürlerinin (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*), in vitro şartlarda kolesterolü düşürme yeteneklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Lipitlerin ayrı ve özelleşmiş bir tipi olan kolesterol, yaşam için mutlaka gerekli olan bir maddedir (Tok ve Aslım, 2007). Kolesterol, genellikle beslenme yoluyla dışarıdan alınmasına rağmen, vücut: ihtiyaç duyulan tüm kolesterolü üretebilme kabiliyetindedir ve karaciğerdeki kolesterol havuzuna bazı kaynaklardan gelir. Bunlar; diyetle alınan, ekstra hepatik dokularda sentezlenen ve karaciğerde de novo sentez sonucu oluşan kolesteroldür. Bunların yanı sıra; karaciğer ve bağırsaklarda, yağ, protein ve karbonhidrat parçalarından esas olarak sentezlenir (Champe ve Harvey, 1997; Ma, 2004).

Kan dolaşımındaki kolesterol miktarı arttığında fazla kolesterol, kalbi besleyen damarların duvarlarında birikmeye başlar. Kolesterol, damar duvarında birikerek ateroskleroz denilen damar sertliğine neden olur. Kolesterol birikintileri koroner damarı giderek daraltır ve kalbin beslenmesi için gerekli olan kanın ve oksijenin kalbe ulaşmasına engel olur (Tok ve Aslım, 2007).

Yüksek kolesterol ile bağlantılı olan kalp-damar hastalıkları, birçok ülkede en önemli ölüm nedenlerinden biridir. Bu nedenle, serum kolesterol seviyelerinin düşürülmesi, özellikle kalp-damar hastalıklarının önlenmesi bakımından büyük önem taşımaktadır (Lim ve ark., 2004).

Sağlıklı bir insanın sindirim kanalı, çok çeşitli mikroorganizmaların bir arada bulunduğu kompleks bir ekosisteme sahiptir (Luckey, 1977; Savage, 1977). İnsanların yerleşik florasının ve sindirim kanalının en önemli üyeleri *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsine ait türlerdir (Salminen, 1995). *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* bakterilerinin laktoz intoleransına sahip hastalarda laktozu fermente ederek sindirimi kolaylaştırdığı ve probiyotik olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Ouwehand ve Salminen, 2002; Sullivian ve Nord, 2002). Bugüne kadar gerçekleştirilen çeşitli çalışmalar, bağırsaktaki *L. acidophilus*, *B. bifidum* ve *L. bulgaricus* bakterilerinin kolesterol seviyelerini belirgin bir şekilde düşürdüğünü göstermiştir (Ma, 2004).

Lactobacillus acidophilus, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus amylovorus* gibi çeşitli laktik asit bakteri suşlarının besiyerlerindeki kolesterol düzeyini in vitro olarak indirgedikleri birçok araştırıcı tarafından bildirilmiştir (Gilliland ve Nelson, 1985; Rasic ve ark., 1992; Walker ve Gilliland, 1993; Buck ve Gilliland, 1994; Tahri ve Grill, 1996; Noh ve ark.,

1997; Brashears ve ark., 1998; Grill ve ark., 2000; Lin ve Chen, 2000). Benzer aktiviteleri gösteren diğer bakteriler; *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium longum*), *Streptococcus* (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*), *Enterococcus* (*Enterococcus faecium*), La*ctococcus* (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis, Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*) ve *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* olarak belirlenmiştir (Rasic ve ark., 1992; Hosono ve Tono-Oka, 1995; Noh ve ark., 1997; Brashears ve ark., 1998; Dambekodi ve Gilliland, 1998; Kimoto ve ark., 2002). Kolesterolün hücre yüzeyine bağlanması ve hücre zarlarının yapısına katılması gibi sıklıkla ileri sürülen mekanizmalar yolu ile laktik asit bakterilerinin kolesterol düzeyi ile ilgili aktiviteleri açıklanmıştır (Hosono ve Tono-Oka, 1995; Noh ve ark., 1997; Brashears ve ark., 1998; Dambekodi ve Gilliland, 1998).

Sharpe ve ark. (1994), bağışıklık kazanmış ineklerden elde edilen sütün, gastrointestinal flora üzerindeki etkisini incelemişler; plazma kolesterol konsantrasyonunda oluşan değişikliklerde, fermente süt ürünlerinin tüketilmesinin önemine dikkat çekmişlerdir.

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

Araştırıcılar, laktik asit bakterilerinin hipokolesterolemik hareket mekanizmalarını açıklamayı denemiş; mikroorganizmaların besiyeri içerisinden kolesterolü uzaklaştırma mekanizmalarının çok açık olmadığını belirtmişlerdir (Gilliland ve Nelson, 1985; Buck ve ark., 1994; Pigeon ve ark., 2002).

Ziarno ve ark. (2007a), ticari yoğurt starter kültürlerinin kolesterol asimilasyonunu araştırmışlardır. Bu amaçla, MRS broth'da 24 saat boyunca termofilik laktik asit bakterilerinin kolesterol asimilasyonunu incelemişlerdir. Ticari starter kültürlerinin laboratuvar ortamında kolesterol asimilasyonunda farklılıklar gösterdiğini tespit etmişlerdir. İçinde birden fazla bakteri bulunan starter kültürlerin geleneksel yoğurt yapımında kullanılması durumunda kolesterol asimilasyonunun % 27'yi geçmediği, biyo yoğurt üretiminde kullanıldığında ise % 38'e ulaştığını saptamışlardır. Sadece *Lactobacillus acidophilus*'tan oluşan kültürün kolesterol asimilasyonunun ise % 49-55 olduğunu belirlemişlerdir.

Pigeon ve ark. (2002), laktik asit bakterilerinin kolesterol düşürücü fonksiyonunu açıklayabilmek için birçok çalışma yapıldığını ve bunun için iki temel mekanizma olduğunu kaydetmişlerdir. Bunların; diyetle alınan kolesterolün bağırsaklardan emiliminin azaltılması ve safra tuzlarının dekonjugasyonu ile gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Broth kültüründe *Lactobacillus acidophilus* tarafından kolesterol azaltımının incelendiği bir çalışmada, bu bakterinin ATCC 4356, B, E, Farr, LA-1 ve N-1 suşları kullanılmıştır. Tüm suşların broth kültürlerinde, çeşitli seviyelerde kolesterolü azaltabildiğini bildirmişlerdir. Özellikle *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 suşunun, kolik asit ve oxgal varlığında en fazla miktarda kolesterolü azalttığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, *L. acidophilus* hücrelerinin yüzeyine kolesterolün bağlanarak asimile olduğunu ve kolesterol seviyesinin bu şekilde düştüğünü ileri sürmüşlerdir (Lin ve Chen, 2000).

Somkuti ve Johnson (1990), *Bifidobacterium spp*., *Lactobacillus acidophilus* ve *Eubacterium coprostenoligenes* gibi çeşitli bağırsak bakterilerinin kolesterol redüktaz olarak adlandırılan ve kolesterolün koprostanol molekülüne dönüşmesini sağlayan bir enzime sahip olduğunu; bağırsaklardan çok az emilen bir form olan koprostanol şeklindeki kolesterolün, kana karışmak yerine, feçes yoluyla vücuttan uzaklaştırıldığını ve kolesterol düzeyinin azaldığını bildirmişlerdir.

Lactobacillus acidophilus izolatlarının in vitro kolesterol indirgemesinin incelendiği bir çalışmada, bu izolatların yapay gastrik ve duedonal sıvılarda kolesterol alınımı araştırılmıştır. Lactobacillus izolatlarının, MRS broth ve yapay gastrointestinal sistem (GIT) sıvılarından kolesterol alınımının değişkenlik gösterdiği saptanmıştır. Bu izolatların yapay duedonal sıvılardan yapılan kolesterol alınımının yapay gastrik sıvılardan yapılan kolesterol alınımından daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Ziarno, 2008).

Lye ve ark. (2010), Lactobacillus'un beş türünün in vitro koşullarda kolesterolü uzaklaştırma yeteneğini incelemişler ve bunun insan gastrointestinal sistem ile benzerliği üzerinde durmuşlardır. En yüksek kolesterol asimilasyonu oxgal varlığında gözlenirken, en düşük asimilasyon taurokolik asit varlığında gözlenmiştir. Kolesterolün laktobasil hücrelerinin yüzeylerine yapıştığı elektron mikroskobuyla tespit edilmiştir. Ayrıca, safra tuzu varlığında kolesterol misellerinin oluşumunun engellendiğini belirlemişlerdir.

Taranto ve ark. (1998), İsviçre Albino farelerini yüksek kolesterol içeren diyetle besleyerek hiperkolesterolemi oluşturmuşlardır. Daha sonra içme sularına *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 ilave edilen farelerde, yedi gün sonra toplam kolesterol oranlarında belirgin bir düşüş olduğunu gözlemişlerdir.

Yıldız ve ark. (2011), anne sütüyle beslenen bebeklerin dışkılarından izole edilen 28 *Lactobacillus spp*. suşunun safra tuzu dekonjugasyon yeteneklerini araştırmışlardır. % 0.3 (w/v) safra varlığında bakteri canlılığında azalma olmasına rağmen, GD2 suşunda kolesterol gideriminin fazla olduğunu (% 42) belirtmişlerdir. *Lactobacillus* suşlarının düşük pH'da hayatta kalma yeteneklerinin mükemmel olduğu, safra dekonjugasyonlarının yüksek olduğu ve in vitro koşullarda hipokolesterolemik etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

Aloğlu ve Öner (2006), 10 adet probiyotik laktik asit bakterisinin kolesterolü asimile etme yeteneklerini, sıvı besiyeri, kaymak ve tereyağı ortamlarında karşılaştırmışlardır. Bakterilerin kolesterol asimilasyon miktarını gaz kromatografisi ile ölçmüşlerdir. Sıvı besiyeri, kaymak ve tereyağı ortamlarının hepsinde bu bakterilerin kolesterol seviyesini düşürdükleri gözlenmiştir. Bakterilerin sıvı besiyerindeki kolesterol asimilasyonunun, kaymaktaki ile benzer olduğu görülmüştür.

Pereira ve Gibson (2002a), insan bağırsağında bulunan laktik asit bakterisi ve bifidobakterilerin in vitro koşullarda kolesterol seviyesi üzerine etkisini araştırmak için yaptıkları çalışmada, sağlıklı ve gönüllü insanlardan elde ettikleri dışkı örneklerini kullanmışlardır. Bu dışkı örneklerinden izole edilen yedi probiyotik suş (*Lactobacillus fermentum* F53 ve KC5b suşları, *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 suşu, *Streptococcus bovis* ATCC 43143 suşu, *Enterococcus durans* DSM 20633 suşu, *Enterococcus gallinarum* ve *Enterococcus faecalis* suşları) ile ticari olarak elde edilen probiyotik suşlar arasında karşılaştırmalı bir değerlendirme yapılmıştır. *Lactobacillus fermentum* KC5b suşunun gram başına kolesterolün 14.8 mg'ını uzaklaştırdığı tespit edilmiştir.

Noh ve ark. (1997), *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 suşu tarafından kolesterol asimilasyonunu kanıtlamak için yaptıkları çalışmada, suş tarafından asimile edilen kolesterolün metabolik olarak parçalanmadığını, besiyerinden alınan kolesterolün büyük kısmının, hücrelerden tekrar geri kazanılabildiğini bildirmişlerdir. Kolesterol ve safra tuzlarının varlığında geliştirilen hücrelerin, bunlar olmaksızın geliştirilen hücrelere kıyasla sonikasyon ile parçalanmaya daha dayanıklı olduğunu görmüşlerdir. Hücrelerin

sonikasyona karşı daha dirençli hale gelmesinin, hücre duvarı veya zarının besiyerindeki kolesterol ile değişikliğe uğramasından kaynaklandığını öne sürmüşlerdir.

Usman ve Hosono (1999), in vitro yaptıkları çalışmada 28 *Lactobacillus gasseri* suşunun, safra içeren besiyerindeki kolesterolü bağlama yeteneği açısından belirgin farklılıklara sahip olduğunu gözlemişlerdir. 28 suşun tamamının kolesterolü bağlama yeteneğine sahip olduğunu, ancak bu yeteneğin suşlara bağlı olarak değişiklik gösterdiğini saptamışlardır. Bu farklılığın, bakteri hücre duvarındaki peptidoglikanların kimyasal ve yapısal farklılığı ile alakalı olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Liong ve Shah (2005), *Bifidobacter* suşlarının kolesterolü azaltma yeteneklerini, asit ve safraya karşı toleranslarını araştırdıkları çalışmalarında, beş farklı *Bifidobacter* suşunu incelemişlerdir. Tüm suşlar pH : 2 olan ortamda iki saat tutulmuş ve asitliğe değişik oranlarda tolerans göstermişlerdir. Bir saat sonunda yaşayan hücrelerin oranının % 72.74'den % 42.49'a düştüğü görülmüştür. Suşların çoğu kolik asit ve oxgal'a yüksek tolerans göstermiş, fakat taurokolik asit tarafından inhibe edilmişlerdir. İnkübasyon öncesinde ve sonrasında, kolesterolün miktarında fark gözlenmiştir. Çalışılan tüm suşların kolesterolü asimile ettiği görülmüştür.

Tahri ve ark. (1995), kolesterolün asimilasyon veya serbest safra asitleriyle çökelmesi mekanizmasını *Bifidobacterium* türlerini kullanarak araştırmışlardır. Kolesterol ve hücre yüzeyi arasında belirgin bir bağlantının gerçekleştiğini gözlemişlerdir. Bu durum, besiyerindeki kolesterolün hücrelerin içine alındığı şeklinde yorumlanmıştır. Bu asimilasyon için safra tuzları varlığında, hücre gelişiminin olmasının öncelikli olarak gerekli olduğu belirtilmiştir. Bu çalışma ile besiyerindeki kolesterol miktarının azalması, kolesterolün hücre yüzeyi ile kurduğu bağlantı ve kolesterolün serbest safra asitleriyle çökelmesi olayının birlikte rol alabileceği öne sürülmüştür.

Parvez ve ark. (2006), *Bifidobacterium bifidum* NRRL 1976'nın safra tuzu varlığında kolesterolü uzaklaştırma yeteneğini araştırmışlardır. *Bifidobacterium bifidum*'un kolesterolü uzaklaştırması için, kolesterolün bakteriyel asimilasyonu ve çöktürme yöntemlerinin ikisinin de etkili olduğu sonucuna varmışlardır.

Li (2012), bağırsak sisteminde bulunan probiyotiklerin safra tuzu ve yiyeceklerle alınan kolesterol arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Çalışmada, safra tuzlarının membran bileşimi üzerine etkisi, probiyotiklerin kolesterolü uzaklaştırma mekanizmaları gibi son zamanlardaki gelişmeler gözden geçirilmiştir.

Zhank ve ark. (2008), 14 *Lactobacillus* suşunun sıvı besiyeri ortamında kolesterol indirgemesini araştırmışlardır. Safra tuzu ilavesinin kolesterol azaltımını etkilediğini ve incelenen bu suşların insan serum kolesterolünü düşürmek için potansiyel probiyotik suşlar olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir.

Yoğurt bakterileri tarafından in vitro kolesterol asimilasyonunun incelendiği bir çalışmada, anaerobik şartlarda ve safra tuzlarının farklı konsantrasyonlarında, çalışılan aynı ve farklı bakteri suşları arasında kolesterol asimilasyonu açısından farklılıklar gözlenmiştir. *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* suşlarının safra tuzlarına dirençli olduğu ve bu suşların varlığında kolesterolün asimilasyonunda artış olduğu bildirilmiş ve yoğurttaki laktik fermentlerin toplam kolesterol seviyesini azalttığı saptanmıştır (Dilmi-Bouras, 2006).

Klaver ve ark. (1993), *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum* bakterilerinin kolesterol asimilasyon mekanizmasını araştırmışlardır. Safra tuzu içeren besiyerindeki kolesterol miktarının azalışını, kolesterolün bakteri tarafından alınmasına değil, safra tuzlarının dekonjuge olmasıyla meydana gelen asidik ortamda, kolesterolün serbest safra asitleriyle çökelmesine bağlamışlardır.

Pigeon ve ark. (2002), serbest safra asitlerinin bakteri hücrelerine bağlanmasında, laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritler (EPS)'in etkili olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, bu polimerlerin safra asitlerini veya kolesterolü bağlayarak barsaklardan emiliminde, bitki kaynaklı polisakkaritler veya lifli gıdaların mekanizmasına benzer bir yol izleyerek vücuttan uzaklaştırılmalarına yardımcı olduklarını göstermişlerdir.

Gilliland ve Nelson (1985), *Lactobacillus acidophilus* suşlarının anaerobik koşullarda ve safra varlığında besiyerindeki kolesterolü azaltabileceğini göstermişlerdir. Denemelerdeki invitro koşullar bağırsaklardaki koşullar ile aynı olduğu için, bu olayın diyetle alınan kolesterolün en azından bir kısmının kana karışmasını önleyebileceği sonucuna varmışlardır.

Brashears ve ark. (1998), insan kaynaklı *Lactobacillus casei* türlerinin safra tuzu dekonjugasyonları ve besiyerindeki kolesterolü uzaklaştırma özelliklerini incelemişlerdir. pH'ın 6'dan daha düşük olduğu durumlarda kolesterol misellerinin safra tuzlarına tutunarak beraber çökeldiği ve böylece kolesterol seviyesinin düştüğü sonucuna varmışlardır.

Grill ve ark. (2000), *Lactobacillus amylovorus* ve *Bifidobacterium breve*'nin kolesterol üzerine etkisini incelemişlerdir. Safra tuzu içermeyen ortamda her iki bakteri

de kolesterolü asimile edememiş; taurokolik asit içeren ortamda sırasıyla % 81 ve % 69 oranında asimilasyon meydana gelmiştir. Ayrıca safra içeren ortamda bu oranlar sırasıyla % 77 ve % 68 olarak belirlenmiştir.

Benzer çalışmalar laktobasillerin yanı sıra laktokoklar üzerinde de yapılmıştır. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* N7'nin % 97.3 oranında kolesterolü azalttığı belirlenmiştir. İnsan mide-bağırsak sistemindeki şartlara dayanıklı laktokokların fermente süt ürünlerinde ve peynir yapımında starter olarak kullanılmasının, yeni probiyotik gıdaların geliştirilmesine olanak sağladığı düşünülmektedir. (Kimoto ve ark., 2002).

Serum kolesterol seviyesinin düşmesinde laktobasillerin safra tuzu hidrolaz aktivitelerinin rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Ahn ve Kwak, 1999; Ahn ve ark., 2003).

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

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

Tok ve Aslım (2010), ev yapımı yoğurtlardan izole edilen *Lactobacillus debbrueckii* subsp. bulgaricus'un, ekzopolisakkarit üretimi ile kolesterolü düşürme yetenekleri arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Yüksek ekzopolisakkarit üreten B3, ATCC 11842 ve G11 suşlarının düşük miktarda ekzopolisakkarit üreten B2 ve A13 suşlarına göre kolesterolü uzaklaştırmada daha etkili olduğunu görmüşlerdir. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 suşunun, 3 mg/ml safra konsantrasyonunda yüksek miktarda ekzopolisakkarit ürettiği ve yüksek kolesterolü % 31 oranında düşürdüğü gözlenmiştir. Ayrıca kolesterolün ekzopolisakkarit üretimini artırdığı tespit edilmiştir.

Nakajima ve ark. (1992), ekzopolisakkarit (EPS) üreten ve üretmeyen iki *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris* suşunun kolesterolü bağlama yeteneklerini test

etmiş ve sonuçta ekzopolisakkarit üreten suşun, üretmeyen diğer suşa kıyasla daha fazla kolesterol bağlayabileceğini göstermişlerdir. Hücreler tarafından üretilen EPS miktarının yüksek olması durumunda, bu polisakkaritlerin, diyetle alınan lifli gıdalara benzer bir etki gösterebileceğini ve bu suretle kolesterolün bakteriler tarafından üretilen EPS'ye bağlanarak feçesle atılan kolesterol miktarının artabileceğini, böylece bağırsaklardan emilerek kana karışan kolesterol miktarında azalma meydana gelebileceğini öne sürmüşlerdir.

Pan ve ark. (2011), kolesterolü % 66 azaltılmış fermente bir süt içeceği olan kımızdan, *Lactobacillus fermentum* SM-7'i izole etmişlerdir. *L. fermentum* SM-7 hücreleri, ortamdaki kolesterolün % 61.5'ini asimile etmişler, % 38.5'ini ise absorbe etmişlerdir. Dibe çöken kolesterol, kolik asit ile pH:6 seviyesinin altında hızlı bir artış göstermiştir. Deney fareleri üzerinde yapay olarak indüklenen *L. fermentum* SM-7 serumlarında total kolesterol ve total trigliserit seviyelerinde anlamlı derecede azalma görülmüştür. LDL kolesterol konsantrasyonları ve aterojenik indeksi $P<0.01$ iken, HDL kolesterol konsantrasyonunda anlamlı bir artış gözlenmiştir ($P>0.05$). SM-7 gruplarında vücut ağırlığı ve karaciğer ağırlığının vücut ağırlığına oranının, laktobasil verilmeyen yüksek kolesterolle beslenen farelere göre daha düşük olduğu görülmüştür.

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

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan test suşları

Çalışmada kullanılmak üzere *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* suşları, Mayasan (Konya) firmasından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan yoğurt starter kültürlerinin seri ve lot numaraları, çizelge 3.1.1'de verilmiştir.

Kültür Seri No	Lot Numarası
VALİREN Y10A	E 36C23
VALİREN Y20A	F 6602
VALİREN Y30A	F 6587
VALİREN Y51A	H 37C11
VALİREN Y60A	F 5422
VALİREN Y80A	H 37C08
VALİREN Y70B	F 6766

Çizelge 3.1 Yoğurt starter kültürlerinin seri ve lot numaraları

3.1.2. Kullanılan besiyerleri

Çalışmada kullanılan besiyerlerinin hazırlanışları aşağıda verilmiştir.

De Man Rogasa Sharp (MRS) agar (Merck):

	500 ml için;
Distile su	500 ml
MRS broth	26 g
Agar	7 g

MRS broth toz besiyeri distile su içinde 60 ºC'de eritildi. Agar ilave edilerek homojen karışım sağlandı. Otoklavda 121 ºC'de 15 dakika steril edildi. 45-50 ºC sıcaklıkta iken 9 cm çapındaki steril petri kutularına 15'er ml olarak dağıtıldı.

De Man Rogasa Sharp (MRS) broth (Merck):

	500 ml için;
Distile su	500 ml
MRS broth	26 g

MRS broth toz besiyeri distile su içinde eritildi. Steril cam deney tüplerine 10'ar ml olarak dağıtıldı. 121 ºC'de 15 dakika steril edildi.

M17 agar (Merck):

	500 ml için;
Distile su	500 ml
M17 broth	21.25 g
Agar	6.38 g

M17 broth toz besiyeri distile su içinde 60 ºC'de eritildi. Agar ilave edilerek 121 ºC'de steril edildi. 45-50 ºC sıcaklıkta iken 9 cm çapındaki steril petri kutularına 15'er ml olarak dağıtıldı.

M17 broth(Merck):

	500 ml için;
Distile su	500 ml
M17 broth	21.25 g

M17 broth toz besiyeri distile su içinde eritildi. Steril cam deney tüplerine 10'ar ml olarak dağıtıldı. 121 ºC'de 15 dakika steril edildi.

3.1.3. Kullanılan boyalar ve diğer solüsyonlar

Cholesterol, RTU® kiti kolesterol ölçümü yapmak amacıyla Biomerieux firmasından temin edildi. Jansiyen moru, lugol, sulu füksin solüsyonları gram boyama işleminde kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Starter kültürlerin canlandırılması

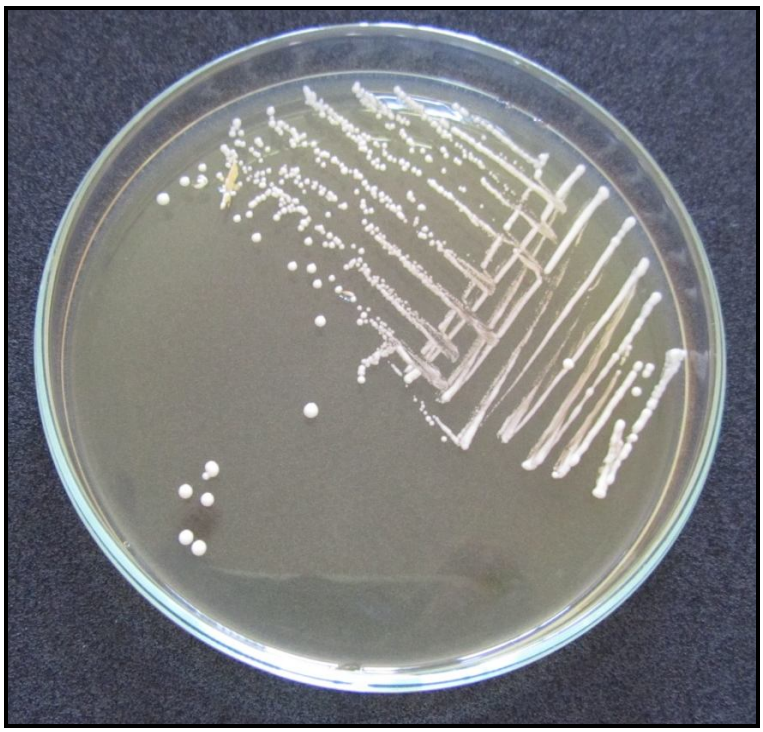
Ticari olarak temin edilen liyofilize haldeki starter kültürler, paketleri açılmadan steril olarak laboratuvara getirildi. Liyofilize kültürleri canlandırmak amacı ile numunelerden aseptik şartlarda 1 g tartılarak, 10 ml steril MRS broth besiyeri içeren tüplere aktarıldı ve tüpler 37 ºC'de 48-72 saat inkübasyona bırakıldı. Üremenin pozitif olduğu karışık kültür içeren tüplerden; *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşunu saflaştırmak amacı ile MRS agar; *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* suşunu saflaştırmak amacı ile de M17 agar besiyerlerine ekimler yapıldı ve plaklar 37 ºC'de 48-72 saat inkübasyona bırakıldı. Seçici besiyeri plaklarında oluşan tek kolonilerden örnekler alınarak, suşların gram boyanma özellikleri belirlendi. İzole edilen ve saflaştırılan suşlar, MRS agar ve M17 agar besiyerine belirli aralıklarla pasajlanarak +4 ºC'de saklandı (Ziarno, 2007a).

3.2.2. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*'un identifikasyonu

İzole edilen tüm suşlar; koloni morfolojisi, gram boyama, mikroskobik görünüm yönünden incelendi. Plakların ve Gram Boyama yöntemi ile boyanan suşların fotoğrafları çekildi (Şekil 3.1, Şekil 3.2).



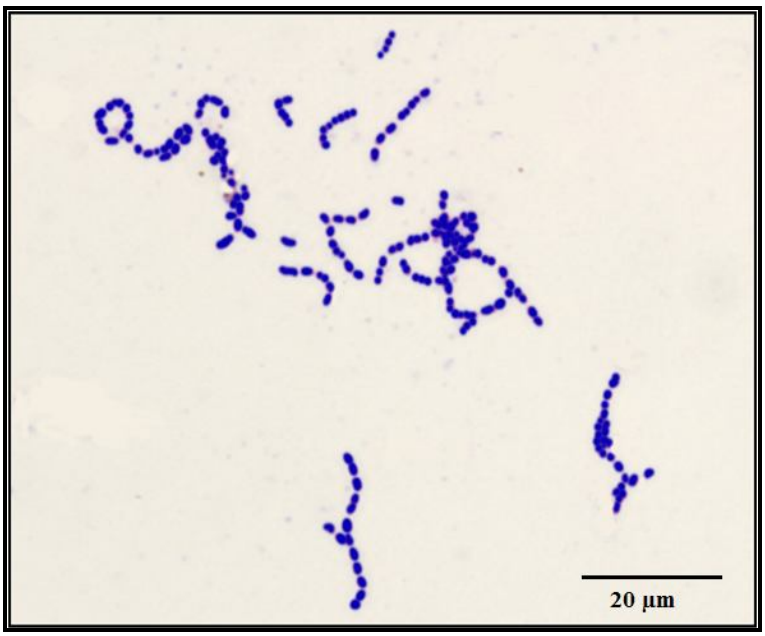
Şekil 3.1. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* suşlarının M17 agar besiyerindeki koloni görünümleri (Y60A no'lu kültür)



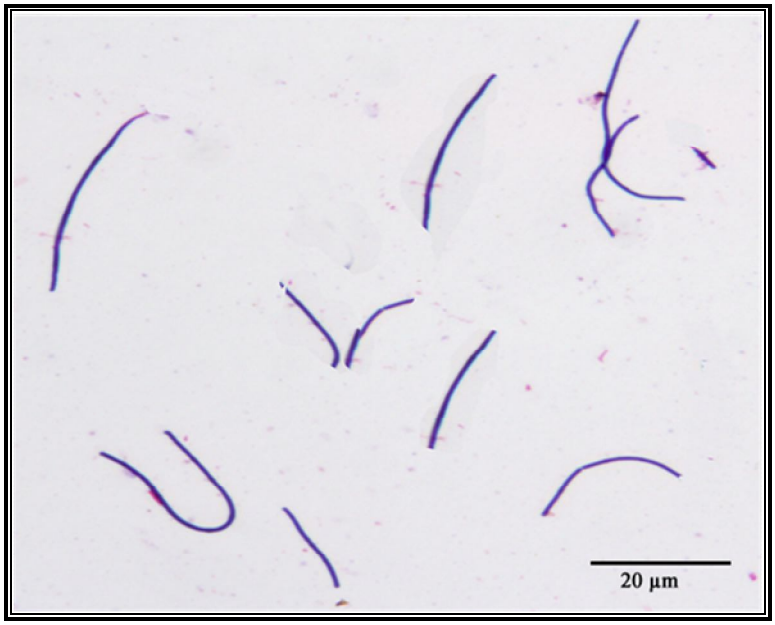
Şekil 3.2. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarının MRS agar besiyerindeki koloni görünümleri (Y10A no'lu kültür)

3.2.3. Gram Boyama

MRS agar ve M17 agar besiyerlerinden öze ile alınıp lam üzerine yayılan bakteri kültürünün havada kuruması sağlandı. Üç defa alevden geçirilerek fiziksel tespit yapıldı. Lamın üzerini tamamen kaplayacak şekilde jansiyen moru boya solüsyonu kondu ve iki dakika beklendi. Süre sonunda boya lam üzerinden dökülerek kalan boya üzerine lugol ilave edildi ve iki dakika beklendi. Süre sonunda lam, % 95'lik etil alkol ile yıkandı. Lam üzerine sulu fuksin ilave edildi ve 30 saniye beklendi. Lam, saf su ile yıkandı ve mikroskopta inceleme işlemine geçildi. Objektif sahasında görülen mor renkli bakteriler Gram (+), pembe renkli olanlar ise Gram (–) olarak tespit edildi (Şekil 3.3, Şekil 3.4) (Durak, 2000).



Şekil 3.3. Gram (+) *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*'un mikroskobik görünümü (10x100'lük büyütme)



Şekil 3.4. Gram (+) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'un mikroskobik görünümü (10x100'lük büyütme)

3.2.4. Stok kolesterolün hazırlanması (7 mg/ml)

	40 ml
Etil alkol	30 ml
Tween 80	10 ml
Kolesterol	280 mg

Etil alkol üzerine Tween 80 ve kolesterol ilave edildikten sonra manyetik karıştırıcı üzerinde 10-15 dakika ısıtılarak homojen karışım sağlandı. Bu solüsyon, MRS broth besiyerinde laktik asit bakterilerinin kolesterolü asimile etme deneylerinde kullanıldı. Hazırlanan bu stok kolesterol solüsyonundan 1 ml alınarak 9 ml MRS broth besiyerine ilave edildi. Böylece kolesterolün besiyeri içerisindeki final konsantrasyonu 0.7 g/l olarak ayarlandı (Ziarno ve ark., 2007a).

3.2.5. Besiyerlerine kolesterolün ilavesi

Streptococcus salivarius subsp. *thermophilus* suşları için steril M17 broth besiyeri (9 ml) ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşları için steril MRS broth besiyeri (9 ml) hazırlandı. Her bir starter kültür için kolesterol içeren ve

içermeyen 3 farklı tüp hazırlandı ve A, B, C şeklinde harflendirildi. Bu tüplerin içeriği aşağıdaki gibidir:

A: MRS broth/ M17 broth içine ilave edilen bakteri hücreleri ve kolesterol solüsyonu.

B: MRS broth/M17 broth içine ilave edilen bakteri hücreleri.

C: MRS broth/M17 broth içine ilave edilen kolesterol (Kontrol tüpü).

Bu ilavelerden sonra tüpler 37 ºC'lik etüvlerde 48-96 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüpler 12000 rpm devirde +4 ºC'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Bu işlemin ardından tüp içerisindeki süpernatant, steril başka bir tüpe otomatik pipet yardımı ile alındı. Bu süpernatantların absorbansları ölçüldü (Ziarno ve ark, 2007a).

3.2.6. Spektrofotometre Ölçümleri

Reaktif körü: Cholesterol, RTU® (Biomerieux) kitinden 1ml steril bir cam tüpe aktarıldı.

Standart: 10 µl standart ve 1 ml reaktif, steril bir cam tüpte homojen olarak karıştırıldı.

Numune:10 µl numune ve 1 ml kolesterol reaktifi, steril cam bir tüpte homojen olarak karıştırıldı.

Her bir starter kültür için bu işlemler 3 tekrarlı olarak yapıldı.

Tüpler 37 ºC'lik etüvde 5 dakika bekletildi. Renk değişimi gözlendikten sonra spektrofotometre cihazı (Hitachi U-1900) 500 nm dalga boyuna ayarlanarak okutma işlemi yapıldı. Öncelikli olarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan kolesterol solüsyonlarının 500 nm dalga boyunda absorbansları okutularak standart eğrisi hazırlandı. Bu eğriye göre numunelerin içerisinde bulunan kolesterol miktarları hesaplandı (Ziarno ve ark., 2007a).

3.2.7. Yüzde kolesterol asimilasyonunun belirlenmesi

Absorbans ölçümleri ve kolesterol konsantrasyon tayininin ardından, yoğurt bakterilerinin kolesterol asimilasyon yüzdeleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (Ziarno ve ark., 2007a):

$$\% D = 100 - \frac{A - B}{C} \times 100$$

A: MRS broth/ M17 broth içine ilave edilen bakteri hücreleri ve kolesterol solüsyonu.

B: MRS broth/M17 broth içine ilave edilen bakteri hücreleri.

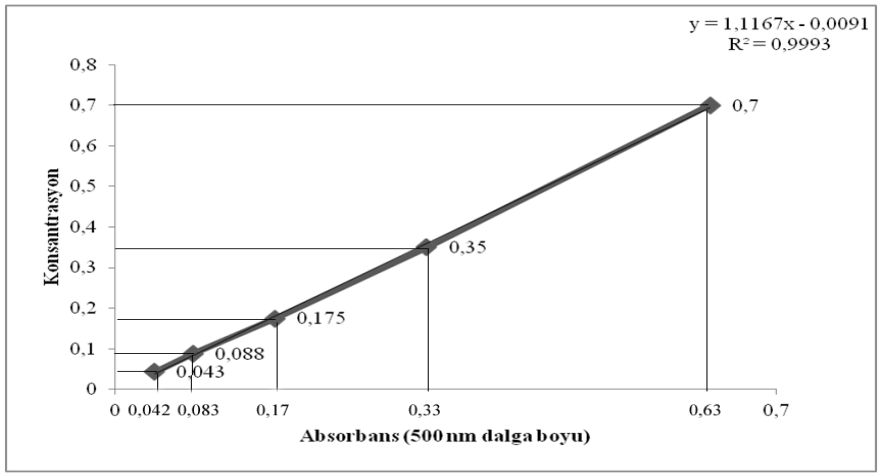
C: MRS broth/M17 broth içine ilave edilen kolesterol (Kontrol tüpü).

D: % kolesterol asimilasyonu

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Spektrofotometrik ölçümler

Çalışma için ticari olarak temin edilen deney suşları, izolasyonları ve identifikasyonlarının ardından özgün sıvı besiyerlerinde çalışma öncesi pasajlanarak inkübe edildi. Yoğun olarak üremenin tespit edildiği tüplerden alınarak içerisinde kolesterol bulunan besiyerlerine aktarıldı. Spektrofotometrik analizlerden önce, besiyerlerine belirli konsantrasyonlarda ilave edilen stok kolesterole ait standart eğri grafiği çıkarıldı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Hazırlanan standart kolesterol konsantrasyonları ve bunların ölçülen absorbans değerleri

Cholesterol, RTU® kiti ile muamele edilen ve 500 nm dalga boyunda absorbansları ölçülen standart kolesterol konsantrasyonları ile yukarıdaki grafikte görülen y=1.1167x-0.0091 formülü elde edildi. Daha sonra içerisinde kolesterol ve test suşlarını ihtiva eden kültürlerin öncelikli olarak absorbansları ölçüldü. Farklı suşlara ait 3 tekrarlı olarak ölçülen absorbans değerleri Çizelge 4.1, Çizelge 4.2'te verildi.

Çizelge 4.1. MRS Broth besiyerinde üretilen (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) bakteri suşlarının 500 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri

Kültür seri no	Tüp	Ortalama±Standart sapma
Y20A	**A**	0.073 ±0.002
	B	0
	C	0.082±0.014
Y60A	**A**	0.072±0.012
	B	0
	C	0.082±0.014
Y70B	**A**	0.073±0.008
	B	0
	C	0.082±0.014
Y80A	**A**	0.079±0.001
	B	0
	C	0.082±0.014
Y30A	**A**	0.064±0.014
	B	0
	C	0.082±0.014
Y10A	**A**	0.074±0.005
	B	0
	C	0.082±0.014
Y51A	**A**	0.076±0.005
	B	0
	C	0.082±0.014

A:MRS broth içine ilave edilen bakteri hücreleri ve kolesterol solüsyonu.
B:MRS broth içine ilave edilen bakteri hücreleri.
C:MRS broth içine ilave edilen kolesterol (Kontrol tüpü).

Çizelge 4.2. M17 Broth besiyerinde üretilen (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) bakteri suşlarının 500 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri

Kültür seri no	Tüp	Ortalama±Standart sapma
Y60A	**A**	0.118±0.005
	B	0
	C	0.126±0.03
Y70B	**A**	0.113±0.02
	B	0
	C	0.126±0.03
Y80A	**A**	0.113±0.006
	B	0
	C	0.126±0.03
Y30A	**A**	0.123±0.018
	B	0
	C	0.126±0.03
Y10A	**A**	0.118±0.005
	B	0
	C	0.126±0.03
Y51A	**A**	0.120±0.011
	B	0
	C	0.126±0.03

A:M17 broth içine ilave edilen bakteri hücreleri ve kolesterol solüsyonu.
B:M17 broth içine ilave edilen bakteri hücreleri.
C:M17 broth içine ilave edilen kolesterol (Kontrol tüpü).

4.1.2. Kolesterol konsantrasyonlarının hesaplanması

Daha önce Çizelge 4.1 ve 4.2'de tespit edilen absorbans değerlerine göre; A, B ve C tüplerinde üreme sonrası kolesterol konsantrasyonu hesaplandı. Bu değerler Çizelge 4.3 ve 4.4'de verildi.

Çizelge 4.3. MRS besiyerinde üretilen (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) bakteri suşlarının ölçülen kolesterol konsantrasyonları

Kültür Seri No	Suşlar	A	B	C
Y20A	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*	0.072 mg/ml	0	0.082 mg/ml
Y60A	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*	0.071 mg/ml	0	0.082 mg/ml
Y70B	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*	0.072 mg/ml	0	0.082 mg/ml
Y80A	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*	0.079 mg/ml	0	0.082 mg/ml
Y30A	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*	0.062 mg/ml	0	0.082 mg/ml
Y10A	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*	0.073 mg/ml	0	0.082 mg/ml
Y51A	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*	0.075 mg/ml	0	0.082 mg/ml

A: MRS broth içine ilave edilen bakteri hücreleri ve kolesterol solüsyonu.
B: MRS broth içine ilave edilen bakteri hücreleri.
C: MRS broth içine ilave edilen kolesterol (Kontrol tüpü).

Elde edilen verilere göre; MRS besiyerlerinde üreyen *Lactobacillus* suşlarının A tüplerinde en fazla kolesterol konsantrasyonu Y80A no'lu suşta, en az kolesterol konsantrasyonu ise Y30A no'lu suşta tespit edildi. C tüpündeki kolesterol konsantrasyonu her suş için sabit olup 0.082 mg/ml olarak belirlendi.

Çizelge 4.4. M17 besiyerinde üretilen (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) bakteri suşlarının ölçülen kolesterol konsantrasyonları

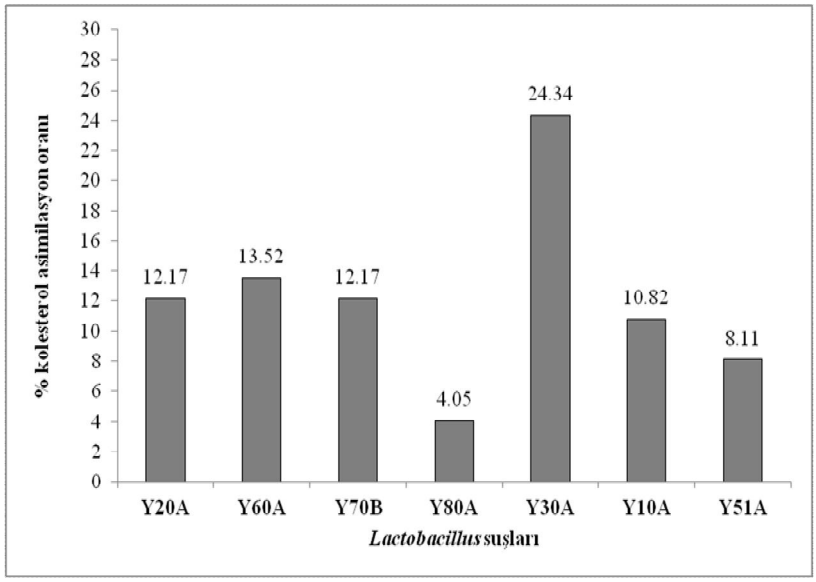
Kültür Seri No	Suşlar	A	B	C
Y60A	*Str. salivarius* subsp. *thermophilus*	0.122 mg/ml	0	0.131 mg/ml
Y70B	*Str. Salivarius* subsp. *thermophilus*	0.118 mg/ml	0	0.131 mg/ml
Y80A	*Str. salivarius* subsp. *thermophilus*	0.117 mg/ml	0	0.131 mg/ml
Y30A	*Str. salivarius* subsp. *thermophilus*	0.128 mg/ml	0	0.131 mg/ml
Y10A	*Str. salivarius* subsp. *thermophilus*	0.122 mg/ml	0	0.131 mg/ml
Y51A	*Str. salivarius* subsp. *thermophilus*	0.124 mg/ml	0	0.131 mg/ml

A: M17 broth içine ilave edilen bakteri hücreleri ve kolesterol solüsyonu.
B: M17 broth içine ilave edilen bakteri hücreleri.
C: M17 broth içine ilave edilen kolesterol (Kontrol tüpü).

M17 besiyerinde üretilen *Streptococcus* suşlarının A grubu besiyeri deney tüpleri incelendiğinde; en fazla kolesterol konsantrasyonununY30A no'lu suşta, en az kolesterol konsantrasyonun iseY80A no'lu suşta olduğu belirlendi. C grubu tüplerdeki kolesterol konsantrasyonları, her suş için 0.131 mg/ml olarak belirlendi. Tüplerdeki kolesterol konsantrasyonlarının tespitinden sonra % kolesterol asimilasyon oranları belirlendi.

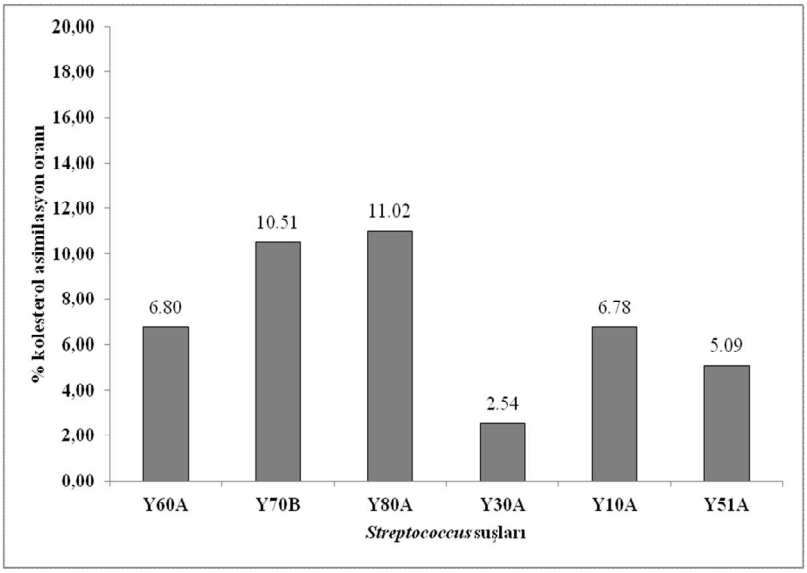
4.1.3.Yüzde kolesterol asimilasyonunun hesaplanması

Yoğurt bakterilerinin kolesterolu indirgeme ölçümleri; Ziarno ve ark. (2007a)'nın belirttiği formüle göre hesaplandı. Tespit edilen % kolesterol asimilasyon oranları Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.2.*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarının kolesterol indirgeme % oranları

Belirlenen ölçümlere göre, en yüksek kolesterol indirgeme oranı % 24.34 ile Y30A no'lu *Lactobacillus* bakteri suşuna karşı görülmüştür. Bunu ikinci sırada % 13.52 oranı ile Y60A no'lu bakteri suşu ve üçüncü sırada ise % 12.17 oranı ile Y20A ve Y70B no'lu bakteri suşları izledi. En düşük kolesterol indirgeme oranı ise % 4.05 ile Y80A no'lu suşa karşı tespit edildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.3.*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* suşlarının kolesterol indirgeme % oranları

M17 besiyerinde kültürü yapılan *Streptococcus* suşları içerisinde en yüksek kolesterol asimilasyon oranı, % 11.02 ile Y80A no'lu suşa karşı belirlendi (Şekil 4.3). Bunu ikinci sırada çok yakın bir fark ile (% 10.51) Y70B no'lu suş, üçüncü sırada ise % 6.80 oranı ile Y60A no'lu suş takip etti. Suşlar içerisinde en düşük kolesterol asimilasyon oranı, (% 2.54) Y30A no'lu *Streptococcus* bakteri suşuna karşı tespit edildi (Şekil 4.3).

Kolesterol hayvan türlerine ait sütlerde ve bu süt yağlarında bulunan doğal bir bileşiktir. Hücre zarlarının organik bir materyalidir ve insan metabolizması için önemlidir (Aloğlu ve Öner, 2006). Bazı çalışmalar kandaki kolesterol seviyesinin kolesterol bakımından zengin besinlerin tüketilmesi ile yakın ilişkili olduğunu göstermiştir. Artan kolesterol alımı, hiperkolesterolemi'ye neden olabilir ve bu durum dolaşım sisteminde aterosiklerotik değişimlerin oluşumunu hızlandırabilir (Akalın ve ark., 1997; Anderson ve Gilliland, 1999; Lin ve Chen, 2000; Juskiewicz ve Panfil-Kuncewicz, 2003; Ahn ve ark., 2003). Kardiyovasküler hastalıkların ölümlere neden olduğu ve bunun da uzun süreli kan kolesterol seviyesinin yüksekliği ile doğrudan ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Kolesterol konsantrasyonu ve koroner kalp hastalıkları arasındaki yakın ilişki tıp uzmanlarını, hastalarını bu yüksek kolesterol seviyelerini düşürmeleri konusunda yönlendirmelerini sağlamıştır (Urkun, 1998). Kan kolesterol seviyelerini düşürmek için uygulanan en son tedavi yöntemleri arasında, perhiz

uygulaması, düzenli egzersiz ve ilaç tedavisi yer almaktadır. Tedavide kullanılan çeşitli farmakolojik ajanlar ile yüksek kolesterol seviyelerini etkili bir şekilde düşürmek mümkündür, ancak bu ilaçlar pahalı olmalarının yanı sıra bir takım yan etkilere de sahiplerdir (Jones ve ark., 2004).

Laktik asit bakterileri probiyotikler olarak adlandırılır ve gıdalarla alınan bu bakteri grubunun sağlık yönünden birçok faydasının olduğu bilinmektedir. Probiyotiklerin yüksek kolesterol seviyelerini azaltabilme yeteneği de bu yararlı etkiler arasında yer alır ve son yıllarda bu konu üzerine yapılan araştırmalar büyük bir artış göstermiştir (Tok ve Aslım, 2007). Laktik asit bakterilerinin sağlığa faydalı etkileri arasında yer alan serum kolesterol konsantrasyonlarının azaltılması üzerine yapılmış çalışmaların bulunması ve bu çalışmalardan elde edilen olumlu sonuçlar, probiyotiklerin kolesterol düşürücü özelliklerine karşı duyulan ilgiyi daha da artırmıştır (Roos ve Katan, 2000). Probiyotik bakteriler ile fermente edilmiş süt ürünlerinin kan lipidleri üzerine olan etkileri ile ilgili ilk kayıt, günümüzden yaklaşık olarak 30 yıl öncesine dayanmaktadır. Bu tarihten günümüze kadar, bu konu üzerinde birçok in vitro ve in vivo çalışma yapılmış ve özellikle belirli *Lactobacillus* veya *Bifidobacterium* türlerini içeren probiyotik ürünlerin kandaki yüksek kolesterol seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (Pereira ve Gibson, 2002b).

Laktik asit bakterilerinin kolesterol düşürücü fonksiyonunun mekanizmasını açıklayabilmek için çeşitli araştırmalar yapılmış ve iki olası mekanizma öne sürülmüştür (Tok ve Aslım, 2007). Birincisi; Laktobasillerin diyetle alınan kolesterolün barsaklardan emilimini azalttığı, ikincisi ise Laktobasillerin safra tuzlarının dekonjugasyonunda rol oynadığı şeklinde açıklanmıştır.

İlk mekanizma kolesterolün asimilasyonu ile ilgilidir. Laktobasiller ve bifidobakteriler ile yapılan çeşitli deneyler, bu bakterilerin belirli suşlarının, safra tuzları varlığında, kolesterolü asimile edebilme yeteneğine sahip olduğunu kanıtlamıştır.

Çalışmamızda; ticari olarak satılan yoğurt starter kültürleri içerisindeki *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* suşları, spesifik besiyerlerinde ayrı ayrı izole edilmiş ve besiyerlerine kolesterol ilavesi sonrasında kolesterol asimilasyon yetenekleri değerlendirilmiştir. *Lactobacillus* suşları içerisinde kolesterol asimilasyon oranının en yüksek (% 24.34) olduğu suş Y30A no'lu suş olarak belirlenmiştir. Y60A, Y20A, Y70B ve Y10A no'lu *Lactobacillus* suşlarının ise birbirlerine yakın oranlarda kolesterol indirgeme özelliği gösterdikleri tespit edilmiştir (Şekil 4.2). En düşük oran ise (% 4.05) Y80A no'lu suşta

görülmüştür. Çalışmamızda yoğurt starter kültürlerinden izole edilen *Streptococcus* suşları içerisinde en yüksek (% 11.02) Y80A no'lu suşta, çok yakın bir oranda da (% 10.51) Y70B no'lu suşta kolesterol asimilasyonu gerçekleşmiştir (Şekil 4.3). Y60A, Y10A ve Y51A no'lu suşlarda ise yakın oranlarda kolesterol asimilasyonu gözlenmiştir. Benzer bir çalışmada Ziarno ve ark. (2007a), mandıra endüstrisinde kullanılan termofilik laktik asit bakterilerinin MRS broth besiyerinde 24 saatlik sürede kolesterolü indirgeme gücünü araştırmışlardır. Ticari starter kültürlerden izole edilen *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'un başlangıçtaki kolesterolü asimile etme oranlarının % 27'yi geçmediğini tespit etmişlerdir. Bulgularımıza göre *Lactobacillus* suşları, Ziarno ve ark. (2007a)'nın sonuçlarına benzer şekilde en yüksek olarak % 24.34 oranında kolesterol asimilasyonu gerçekleştirmiş ve % 27 oranını geçmemiştir. Bu durumda sonuçlarımız araştırmacıların sonuçları ile büyük bir uyum içerisindedir. Başka bir çalışmada Ziarno ve ark (2009), ticari yoğurt kültürlerinden izole edilen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'un serum kolesterol seviyesini etkileyip etkilemediğini araştırmışlardır. Elde edilen izolatlar yapay gastrit sıvılarda, kolesterolü MRS broth'daki izolatlara kıyasla daha az miktarda uzaklaştırmıştır. Sadece iki izolat, yapay gastrit sıvıda kolesterolü MRS broth besiyerindekinden daha fazla miktarda uzaklaştırmıştır. Yapay gastrit sıvılarda kolesterolü uzaklaştırma miktarları 20 μg/ml ile 78 μg/ml arasında değişmiştir. Elde edilen sonuçlar, *Lactobacillus bulgaricus*'un MRS broth ve yapay gastrit sıvılarından kolesterolü uzaklaştırma yeteneğinin; kolesterolün miktarına, izolata ve inkübasyon ortamına göre değişebileceğini göstermiştir. Çalışmamızdan izole edilen her iki suşun aynı kültür no'suna sahip izolatlarının farklı oranlarda kolesterol asimilasyonu yaptığı gözlenmiştir. Y30A kültür no'lu *Lactobacillus* suşları en fazla (% 24.34) asimilasyon yapmasına rağmen, Y30A kültür no'lu *Streptococcus* suşları en az (% 2.54) asimilasyonu gerçekleştirmiştir. Benzer şekilde Y80A kültür no'lu *Lactobacillus* suşları % 4.05 oranında asimilasyon yaparken, aynı kültürdeki *Streptococcus* suşları % 11.02 oranında kolesterol asimilasyonu yapmıştır. Bulgularımız Ziarno ve ark. (2009)'nın çalışmalarında belirttiği, kolesterol indirgeme yeteneğinin bakterinin türüne ve üreme ortamlarına bağlı olarak değiştiği görüşünü güçlü bir şekilde desteklemektedir.

Ziarno ve ark. (2007b), *Lactobacillus sp.*'nin bazı suşlarının kolesterol üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada, liyofilize starter kültürlerden izole ettikleri üç suşu (*Lb. casei, Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. acidophilus*) ve ticari olarak farmasötik merkezlerden alınan üç suşu (*Lb. plantorum, Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus, Lb.*

acidophilus) kolesterol asimilasyon oranlarını belirlemek için kullanmışlardır. MRS broth'da *Lactobacillus*'un üreme sürecinde kolesterol seviyesinde azalma olduğunu, başlangıçtaki kolesterol konsantrasyonuyla final konsantrasyon arasındaki farkın 0.053-0.153 g/dm³ arasında değiştiğini ve kolesterol seviyesinde azalma olduğunu gözlemişlerdir. Gilliland ve Nelson (1985), yaptıkları in vitro çalışmada, belirli *Lactobacillus acidophilus* suşlarının anaerobik koşullar altında ve safra varlığında, besiyerindeki kolesterol miktarını azaltabildiğini göstermişlerdir. Bu koşullar, barsaklarda mevcut koşullar ile aynı olduğu için yazarlar, bu olayın, diyetle alınan kolesterolün en azından bir kısmının kana karışmasını engelleyebileceği sonucuna varmışlardır. Ancak, safra varlığında üreme ve besiyerindeki kolesterolü uzaklaştırabilme gücü, suşlara bağlı olarak farklılık göstermiştir. Çalışmamızda, suşların üretildiği besiyeri ortamlarına safra katılmamasına rağmen, suşlarımızın kolesterolü belirli oranlarda indirgediği görülmüştür. Safra katılması noktasında farklılık gösteren çalışmamız, sonuç itibari ile farklı suşların farklı oranda kolesterol indirgediğini göstermiş, Gilliand ve Nelson (1985)'un sonuçlarını desteklemiştir. Gilliland ve Walker (1990) bu çalışmayı, domuzlar üzerinde in vivo olarak da gerçekleştirmiştir. Çalışmanın sonuçları, yüksek oranda yağ içeren bir diyetle beslenen domuzların, safra varlığında kolesterolü asimile etme yeteneğine bağlı olarak seçilen *L. acidophilus* RP32 şusu ile beslenmesinin, serum kolesterol seviyelerinde belirgin bir düşüşe yol açtığını göstermiştir. Bu etkinin temelinde yatan mekanizma, *L. acidophilus* suşunun kolesterolü asimile etmesine bağlanmıştır. Sonuçlarımıza göre *Lactobacillus* suşları (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) Gilliland ve Walker (1990)'ın tespit ettiği gibi, kültürler içerisinde en fazla asimilasyonu yapan suş grubu olmuştur. *L. acidophilus*'un kolesterol asimile etmesi ile ilgili olan bir diğer çalışmada Rasic ve ark. (1992) tarafından yapılmıştır. *L. acidophilus*'un, *Streptococcus thermophilus* ve ticari bir yoğurt kültüründen daha çok kolesterolü asimile edebildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, yoğurt bakterileri ve bifidobakterilerin kolesterol asimilasyon kabiliyetleri arasında farklılıklar görmüşlerdir. Bulgularımıza göre çalışmamızda kullanılan *Lactobacillus* suşları bazı kültürlerde (Y10A, Y70B) *Streptococcus* suşlarına yakın, bazı kültürlerde ise (Y30A, Y51A) bu suşlardan daha yüksek asimilasyon oranları ortaya koymuştur (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3). Bu durumda araştırmacıların sonuçları ile bulgularımız oldukça uyumlu bulunmuştur.

Bakterilerin, kolesterolün barsaklardan emilimini azaltması ile ilgili bir diğer mekanizma da kolesterolün bakterinin hücre duvarına bağlanması veya hücre zarının

yapısına katılması ile ilgilidir (Tok ve Aslım, 2007). Bu konuyla ilgili Noh ve ark. (1997)'nın yaptığı çalışmada *L. acidophilus* ATCC 43121 suşu tarafından asimile edilen kolesterolün metabolik olarak parçalanmadığını, besiyerinden alınan kolesterolün büyük kısmının, hücrelerden tekrar geri kazanabildiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, kolesterol miselleri ve safra tuzlarının varlığında üretilen bakterinin bunlar olmaksızın üretilen bakteriye kıyasla sonikasyon ile parçalanmaya karşı daha dayanıklı olduğunu gözlemlemişlerdir. Elde edilen bu sonuçlara göre, kolesterol ile değişikliğe uğrayan bakteri hücre duvarı veya zarının sonikasyon ile parçalanmaya karşı daha dayanıklı bir hale gelmiş olabileceğini öne sürmüşlerdir. Başka bir çalışmada Usman ve Hosono (1999), 28 *Lactobacillus gasseri* suşu üzerinde, hücrelerin kolesterolü bağlama yeteneği üzerinde yoğunlaşmıştır. Araştırmacılar 28 suşun tamamının kolesterolü bağlama yeteneğine sahip olduğunu, ancak kolesterol bağlama kabiliyetinin suşlara bağlı olarak değişiklik gösterdiğini saptamışlardır. Bu farklılığın bakteri hücre duvarındaki peptidoglikanın kimyasal ve yapısal farklılığı ile alakalı olabileceğini öne sürmüşlerdir. Çalışmamızda kolesterolün hangi mekanizma ile düşürüldüğü belirlenmemiş olup, besiyerlerindeki kolesterolün parçalandığı, yani diğer bir deyişle asimile edildiği düşünülmüştür. Buna rağmen araştırmacıların sonuçlarına benzer şekilde *Lactobacillus* suşlarının, starter kültür numaralarına göre farklı oranlarda asimilasyon yaptığı belirlenmiştir.

Laktik asit bakterilerinin kolesterolü düşürmesi ile ilgili ikinci olarak öne sürülen görüş ise laktobasillerin safra tuzlarının dekonjugasyonunda rol oynadığı ile ilgilidir. Barsak mikroorganizmaları tarafından safra tuzlarının dekonjugasyona uğraması, serum kolesterol seviyelerinin düşürülmesi bakımından çok önemlidir (Corzo ve Gilliland, 1999). Safra tuzları, ince barsağa besinlerle alınan yağların, kolesterolün, hidrofobik vitaminlerin ve yağda çözünen diğer bileşiklerin emiliminde yardımcı olmak üzere salgılanırlar. Safra tuzlarının % 97'si ince barsaktan geri emilerek enterohepatik döngü ile karaciğere geri döner. Safra tuzlarının çok az bir kısmı ise geri emilmeyerek, serbest safra asitleri şeklinde feçes vasıtasıyla vücuttan atılır (Tanaka ve ark., 1999).

Dekonjugasyon reaksiyonu, *Enterococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides* ve *Lactobacillus* cinslerinin de dahil olduğu birtakım barsak bakterileri tarafından üretilen safra tuzu hidrolaz (BSH) enziminin faaliyeti ile, glisin veya taurin ile konjuge olmuş safra asitlerinden oluşan safra tuzlarının, aminoasit kalıntısı ve serbest safra asidine hidroliz olmasıdır (Tanaka ve ark., 1999; Jackson ve Lovergrove, 2002). Serbest safra asitleri, konjuge safra tuzlarına

kıyasla daha az çözünür özelliktedir ve barsak kanalından daha az emilirler. Pigeon ve ark (2002) tarafından yapılan bir çalışma ile serbest safra asitlerinin bakteri hücrelerine bağlanmasında, laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritler (EPS)'in de etkili olduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar, EPS'in safra asitlerini veya kolesterolü bağlayarak, vücuttan uzaklaştırılmasına yardımcı olduğunu bildirmişlerdir. Klaver ve Van der Meer (1993), *L. acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum* tarafından kolesterol asimilasyonu mekanizmasını araştırmışlardır. Besiyerindeki kolesterol miktarının azalışını, kolesterolün bakteri tarafından alınmasına değil, safra tuzlarının dekonjuge olmasıyla meydana gelen asidik ortamda, kolesterolün serbest safra asitleriyle çökelmesine bağlamışlardır. Tahri ve Grill (1996), kolesterolün asimilasyon ve serbest safra asitleriyle çökelmesi mekanizmasını *Bifidobacterium* türlerinde araştırmışlardır. Kolesterol ile hücre yüzeyi arasında belirgin bir bağlantının gerçekleştiğini gözlemiş ve bu gözleme dayanarak besiyerindeki kolesterolün hücrelerin içine alındığını öne sürmüşlerdir. Çalışmada safra asitlerinin de kullanılması gerektiğini belirtmelerine rağmen, kolesterol azalmasının direkt olarak dekonjuge olmuş safra asitleriyle çökelmesine bağlanamayacağını bildirmişlerdir.

Dekonjugasyon mekanizması ile ilgili yapılan yukarıdaki çalışmalar dikkate alındığında, çalışmamızda safra asitleri besiyeri ortamına ilave edilmediği için meydana gelen kolesterol azalmasının dekonjugasyon yoluyla değil asimilasyon yolu ile oluştuğu öne sürülebilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu çalışmada, ticari olarak satılan yoğurt starter kültürlerinden *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* suşlarının izolasyonları yapılmış ve stok olarak hazırlanan kolesterol solüsyonları belirli oranlarda spesifik besiyerlerine ilave edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda bakterilerin in vitro kolesterol asimilasyon yetenekleri değerlendirilmiştir. *Lactobacillus* suşlarının % 4.05-24.34 arasında değişen oranlarda besiyerindeki kolesterolü indirgediği saptanmıştır. Aynı starter kültürlerde bulunan *Streptococcus* suşlarının ise % 2.54-11.02 arasında değişen oranlarda kolesterolü indirgediği görülmüştür. Literatürlerden elde edilen verilerle kıyaslandığında, çalışma sonuçlarımız daha önce yapılan çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu bulunmuş ve yoğurt kültürlerinde bulunan farklı bakterilerin farklı oranlarda in vitro olarak kolesterolü indirgediği belirlenmiştir. Çalışmalar sırasında besiyerine safra tuzları ilave edilmediğinden dolayı, mevcut kolesterol azalmasının safra tuzu dekonjugasyon yolu ile değil, asimilasyon mekanizmasıyla olduğu düşünülmüştür.

5.2. Öneriler

Kalp damar hastalıkları ile beslenme arasındaki ilişki ortaya konulduktan sonra kolesterolü azaltılmış gıdalara talep artmıştır. Bu bağlamda çeşitli yöntemlerle gıdalardan kolesterolün azaltılması ile ilgili çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Aynı zamanda kan kolesterol seviyesini düşürücü ilaçların yan etkileri ve maliyetlerinin yüksek olmasından dolayı, özellikle kimyasal ve fiziksel yöntemlerle yapılan kolesterol azaltılması çalışmalarına ek olarak, biyolojik yolla kolesterol azaltılması da gündeme gelmiş ve bu konuda araştırmalar başlamıştır. Son dönemlerde laktik asit bakterileri ve probiyotiklerin bu kolesterol azaltma sürecinde etkin rol oynadıkları tespit edilmiştir. Bu noktada bu biyolojik yöntemlerin kimyasal yöntemlere alternatif olabileceği ya da kimyasalların daha az kullanılarak kolesterol azaltma etkilerine katkı sağlayabileceği düşünülebilir. Ayrıca bundan sonraki çalışmalarda, özellikle ev yapımı yoğurtlardan izole edilen doğal yoğurt bakterilerinin kolesterol azaltma yetenekleri çalışılabilir ve iyi sonuç verebilecek suşlar bir araya getirilerek daha faydalı bir yoğurt kültürü

hazırlanabilir ve liyofilize edilerek ticari preparat haline getirilebilir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların, ileride bu konuda yapılacak çalışmalara ışık tutacağı, aynı zamanda bu özelliğe sahip laktik asit bakteri kültürlerinin tıp alanındaki klinik uygulamalarda da kullanıma sunulabileceği kanaatini taşımaktayız.

KAYNAKLAR

Ahn, J., Kwak, H. S., 1999, Optimizing cholesterol removal in cream using b-cyclodextrin and response surface methodology, *J. Food Sci.,*64, 629-632.

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

Akalın, A. S., Gönç, S., Düzel, S., 1997, Influence of yogurt and acidophilus yogurt on serum cholesterol levels in mice, *J. Dairy Sci.*, 80, 2721-2725.

Aloğlu, H., Öner, Z., 2006, Assimilation of cholesterol in broth, cream, and butter by probiotic bacteria, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.,* 108, 709-713.

Anderson, J. W., Gilliland, S. E., 1999, Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans, *J. Am. Coll. Nutr.*, 18, 43-50.

Brashears, M. M., Gilliland, S. E., Buck, L. M., 1998, Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus casei*, *J. Dairy Sci.,* 81, 2103-2110.

Buck, M. L., Gilliland, S. E., 1994, Comparison of freshly isolated strains of *L. acidophilus* of human intestinal origin for ability to assimilate cholesterol during growth, *J. Dairy Sci.,* 77, 2925-2933.

Champe, P. C., Harvey, R. A., 1997, Biyokimya, 2. Baskı, *Nobel Tıp Kitabevi*, İstanbul, 205-206.

Corzo, G., Gilliland, S. E., 1999, Bile salt hydrolase activity of three strains of *Lactobacillus acidophilus*, *J. Dairy Sci.*, 82, 472-480.

Dambekodi, P. C., Gilliland, S. E., 1998, Incorporation of cholesterol into the membrane of *Bifiobaacterium longum*, *J. Dairy Sci.*, 81, 1818-1824.

Dilmi-Bouras, A., 2006, Assimilation (in vitro) of cholesterol by yogurt bacteria, *Ann. Agric. Environ. Med.*, 13, 49-53.

Durak, Y., 2000, Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Tekniği, Konya, 75-76.

Gilliland, S. E., Nelson, C. R., Maxwell, C., 1985, Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 49 (2), 377-381.

Gilliland, S. E., Walker, D. K., 1990, Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans, *J. Dairy Sci.*, 73, 905-911.

Gönç, S., Akalın, A. S., Kılıç, S., 1996, Fermente süt mamülleri ve kolesterol arasındaki ilişkiye ait bir değerlendirme, *Gıda Dergisi*, 21(2), 89-94.

Grill, J. P., Cayuela, C., Antoine, J. M., Schneider, F., 2000, Effects of *Lactobacillus amylovorus* and *Bifidobacterium breve* on cholesterol, *Lett. Appl. Microbiol*., 31, 154-156.

Hosono, A., Tono-oka, T., 1995, Binding of cholesterol with lactic acid bacterial cells, *Milchwissenschaft*, 50, 556-560.

Jackson, K. G., Lovergrove, J. A., 2002, Functional foods, blood lipids and coronary heart disease, *Food Scien. and Technol. Bull: Functi. Food*, 1(1), 1-11.

Jaziri, I., Slama, M., Mhadhbi, H., Urdaci, M., Hamdi, M., 2009, Effect of green and black teas (*Camellia sinensis* L.) on the characteristic microflora of yogurt during fermentation and refrigerated storage, *Food Chemistry*, 112, 614-620.

Jones, M. L., Chen, H., Ouyang, W., Metz, T., Prakash, S., 2004, Microencapsulated genetically engineered *Lactobacillus plantarum* 80 (pCBH1) for bile acid deconjugation and its implication in lowering cholesterol, *Biomed. Biotechnol.*, 2004, 61-69.

Juskiewicz, M., Panfil-Kuncewicz, H., 2003, Reduction of cholesterol content in milk with dairy thermophilic cultures application, *Milchwissenschaft*, 58, 370-373.

Kim, Y., Whang, J., Whang, K., Oh, S., Kim, S., 2008, Characterization of the cholesterol-reducing activity in a cell-free supernatant of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72 (6), 1483-1490.

Kimoto, H., Ohmomo, S., Okamoto, T., 2002

Klaver, F. A. M., Van der Meer, R., 1993, The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity, *Appl. and Environ. Microb.,* 59 (4), 1120-1124.

Kumar, M., Nagpal, R., Kumar, R., Hemalatha, R., Verma, V., Kumar, A., Chakraborty, C., Singh, B., Marotta, F., Jain, S., Yadav, H., 2012, Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases, *Experimental Diabetes Research*, 2012, 902-917.

Li, G., 2012, Intestinal probiotics: Interactions with bile salts and reduction of cholesterol, *Procedia Environ. Sci.,* 12, 1180-1186.

Lim, H., Kim, S., Lee, W., 2004, Isolation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use, *J. Vet. Sci.*, 5(4), 391-395.

Lin, M. Y., Chen, T. W., 2000, Reduction of cholesterol by *Lactobacilus acidophilus* in culture broth, *J. Food Drug. Anal.*, 8, 97-102.

Liong, M. T., Shah, N. P., 2005, Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of *Lactobacilli* strains, *Journal of Dairy Sci.,* 88 (1), 55-66.

Luckey, T. D., 1977, Bicentennial overview of intestinal microecology, *Am. J. Clin. Nutr.*, 30, 1753-1761.

Lye, H., Rahmat-Ali, G., Liong, M., 2010, Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract, *International Dairy Journal*, 20, 169-175.

Ma, H., 2004, Concept and protocol to isolate cholesterol-reducing bacteria from carnivores, *Nature and Sci*., 2(4), 11-17.

Manson, J. E., Tosteson, H., Ridker, P. M., 1992, The primary prevention of myocardial infarction, *The New England Journal of Medicine*, 32, 1406-1416.

Nakajima, H., Suzuki, Y., Hirota, T., 1992, Cholesterol lowering activity of ropy fermented milk, *J. of Food Sci.*, 57, 1327-1329.

Noh, D. O., Kim, S. H., Gilliland, S. E., 1997, Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121, *J. Dairy Sci.,* 80, 3107-3113.

Ouwehand, A. C., Salminen, S., 2002, Isolauri E: Probiotics: an overview of beneficial effects, *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 279-289.

Pan, D., Zeng, X., Yan, Y., 2011, Characterisation of *Lactobacillus fermentum* SM-7 isolated from koumiss, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects, *J. of the Sci. of Food and Agric.*, 91(3), 512-518.

Parvez, S., Kim, H., Lee, H., Kim, D., 2006, Bile salt hydrolase and cholesterol removal effect by *Bifidobacterium bifidum* NRRL 1976, *World Journal of Microbiology&Biotechnology,* 22, 455-459.

Pereira, D. I. A., Gibson, G. R., 2002a, Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut, *Appl. Environ. Microbiol.,* 68, 4689-4693.

Pereira, D. I. A., Gibson, G. R., 2002b, Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology,* 37 (4), 259-281.

Pigeon, R. M., Cuesta, E. P., Gilliland, S. E., 2002, Binding of free bile acids by cells of yogurt starter culture bacteria, *J. Dairy Sci.*, 85, 2705-2710.

Psomas, E. I., Fletouris, D. J., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetaki, N., 2003, Assimilation of cholesterol by yeast strains isolated from infant feces and feta cheese, *J. Dairy Sci.*, 86, 3416-3422.

Rasic, J. L., Vujcic, I. F., Skrinjar, M., Vulic, M., 1992, Assimilation of cholesterol by some cultures of lactic acid bacteria and bifidobacteria, *Biotechnol. Lett.*, 14, 39-44.

Roos, N. M., Katan, M. B., 2000, Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis, a review of papers published between 1988 and 1998, *Am. J. Clin. Nutr.*, 71, 405-411.

Salminen, S., Isolauri, E., Onnela, T., 1995, Gut microflora in health and disease, *Chemotherapy*, 41, 5-15.

Savage, D. C., 1977, Microbial ecology of the gastrointestinal tract, *Annu. Rev. Microbiol.*, 31, 107-133.

Sharpe, S. J., Gamble, G. D., Sharpe D. N., 1994, Cholesterol-lowering and blood pressure effects of immune milk, *Am. J. Clin. Nutr.*, 59, 929-934.

Somkuti, G. A., Johnson, T. L., 1990, Cholesterol uptake by *Propionibacterium freudenreichii*, *Current Microbiology*, 20(5), 305-309.

Sullivian, A., Nord, C. E., 2002, The place of probiotics in human intestinal infections, *Int. J. Antimicrob. Ag.*, 20, 313-319.

Tahri, K., Crociani, J., Ballongue, J., Schneider, F., 1995, Effects of three strains of bifidobacteria on cholesterol, *Lett. Appl. Microbiol.*, 21, 149-151.

Tahri, K., Gril, J. P., 1996, Schneider, F., *Bifidobacteria* strain behavior toward cholesterol: coprecipitation with bile salts and assimilation, *Curr. Microbiol.*, 33, 187-193.

Tanaka, H., Doesburg, K., Iwasaki, T., Mierau, I., 1999, Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity, *J. Dairy Sci.*, 82, 2530-2535.

Taranto, M. P., Gonzales, De Llano, D., Ronriguez, A., Ruiz, H. A. P., Valdez, G. F., 1996, Bile tolerance and cholesterol reduction by *Enterococcus faecium*, a candidate microorganism for the use as a dietary adjunct in milk products, *Milchwissenschaft*, 51(7), 383-385.

Taranto, M. P., Medici, M., Perdigon, G., Ruiz, H. A. P., Valdez, G. F., 1998, Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice, *J. Dairy Sci.*, 81, 2336-2340.

Tok, E., Aslım, B., 2007, Probiyotik olarak kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin kolesterol asimilasyonu ve safra tuzları dekonjugasyonundaki rolleri, *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg.*, 37 (1), 62-68.

Tok, E., Aslım, B., 2010, Cholesterol removal by some lactic acid bacteria that can be used as probiotic, *Microbiol. Immunol.*, 54(5), 257-264.

Urkun, T., 1998, Kolesterolü azaltılmış tereyağı ve bazı özelliklerinin araştırılması, Doktora Tezi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Süt Teknolojisi Bilim Dalı*, İzmir (Türkiye), 25-27.

Usman, Hosono, A., 1999, Bile tolerance, taurocholate deconjugation, and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri* strains, *J. Dairy Sci.,* 82, 243-248.

Walker, D. K., Gilliland, S. E., 1993, Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*, *J. Dairy Sci.,* 76, 956-961.

Yıldız, B., Öztürk, M., Aslım, B., 2011, Identification of *Lactobacillus* strains from breast-fed infant and investigation of their cholesterol-reducing effects, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 2397-2406.

Zhank, F., Hang, X., Fan, X., Li, G., Yang, H., 2007, Selection and optimization procedure of symbiotic for cholesterol removal, *Anaerobe*, 13, 185-192.

Zhank, M., Hang, X., Fan, X., Li, D., Yang, H., 2008, Characterization and selection of *Lactobacillus* strains for their effect on bile tolerance, taurocholate deconjugation and cholesterol removal, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 7-14.

Ziarno, M., Sekul, E., Lafraya, A., 2007a, Cholesterol assimilation by commercial yoghurt starter cultures, *Acta. Sci. Pol., Technol. Aliment.,* 6(1), 83-94.

Ziarno, M., 2007b, The influence of cholesterol and biomass concentration on the uptake of cholesterol by *Lactobacillus* from MRS broth, *Acta. Sci. Pol., Technol. Aliment.*, 6(2), 29-40.

Ziarno, M., 2008, In vitro cholestrol uptake by *Lactobacillus acidophilus* isolates, *Acta. Sci. Pol., Technol. Aliment*, 7(3), 65-74.

Ziarno, M., 2009, In vitro cholesterol uptake by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* isolates, *Acta. Sci. Pol., Technol. Aliment.*, 8(2), 21-32.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Safiyye ACAR
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Uşak/Banaz 18.08.1986
Telefon :
Faks :
e-mail : scar_345@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise :	Güventaş Anadolu Lisesi	2003
Üniversite :	Selçuk Üniversitesi	2009
Yüksek Lisans :	Selçuk Üniversitesi	2014
Doktora :		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**
2010-2014	Necmettin Erbakan Üniversitesi	Biyolog

YABANCI DİLLER

İngilizce