



**T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ÇİĞ SÜTLERDEN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN KOLESTEROL ASİMİLASYONU AKTİVİTESİ

AYŞE SEÇİL MUTLUCAN

BURDUR, 2021

**T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ÇİĞ SÜTLERDEN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN KOLESTEROL ASİMİLASYONU
AKTİVİTESİ**

AYŞE SEÇİL MUTLUCAN

Danışman: Prof. Dr. Oğuz GÜRSOY

BURDUR, 2021

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum **“Çiğ Sütlerden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Kolesterol Asimilasyonu Aktivitesi”** başlıklı bu tezin;

- Kendi çalışmam olduğunu,
- Sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi,
- Bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi,
- Kullandığım verilerde değişiklik yapmadığımı,
- Tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı,
- Bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı,

bildirir, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

26/08/2021

Ayşe Seçil MUTLUCAN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve bu tez çalışmasında beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Oğuz GÜRSOY'a ve değerli hocam Prof. Dr. Yusuf YILMAZ'a teşekkür ederim.

Her türlü sıkıntıda yanımda olan ve araştırmalarımın katkıları sunan Öğr. Gör. Özge GÖKÇE'ye, çalışmamın katkı sağlayan Öğr. Gör. Orhan YAVUZ'a, çalışmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm Arş. Gör. Hande Özge GÜLER DAL'a ve tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

0590-YL-19 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Eğitim hayatımın her aşamasında beni her anlamda destekleyen aileme sonsuz sevgilerimi sunarım.

Ağustos, 2021

Ayşe Seçil MUTLUCAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ ve/veya TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL DİZİNİ.....	iii
ÇİZELGE DİZİNİ	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Laktik Asit Bakterileri (LAB)	3
2.2. Kolesterol	4
2.3. LAB'nin Kolesterol Düşürücü Etkilerini Açıklayan Olası Mekanizmalar	5
2.3.1. Kolesterol Asimilasyonu	5
2.3.2. Safra Tuzlarının Dekonjugasyonu	6
2.3.3. Bakteri Hücre Duvarına Kolesterolün Tutunması	7
2.3.4. Kolesterolün Koprostanole Dönüşümü	7
2.3.5. Kısa Zincirli Yağ Asitlerinin Üretimi.....	8
2.4. LAB'nin Kolesterol Asimilasyonu Özellikleri.....	8
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	10
3.1. Materyal.....	10
3.2. Aletler ve Cihazlar.....	11
3.3. Yöntem	13
3.3.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu	13
3.3.2. Kolesterol Analizi.....	14
3.3.3. Gram Boyama.....	16
3.3.4. İzolatların Tanımlanması	17
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	20
4.1. Çiğ Süt Örneklerinin Mikrobiyolojik Özellikleri	20
4.2. Kolesterol Analizi Sonuçları	22
4.3. Gram Boyama Sonuçları	24
4.4. İzolatların Tanımlama Sonuçları	25
5. SONUÇ.....	31
KAYNAKLAR.....	33

ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1: Kolesterolün kimyasal yapısı.....	4
Şekil 2.2. Enterohepatik döngü	6
Şekil 2.3. Koprostanolün kimyasal yapısı	7
Şekil 3.1. Keçi sütü numunesinin toplanması	10
Şekil 3.2. Laboratuvara getirilen süt numunesi.....	10
Şekil 3.3. Beckman Coulter AU5800 model kolesterol ölçüm cihazı.....	12
Şekil 3.4. İnkübasyona bırakılan petri kapları.....	13
Şekil 3.5. Petri kaplarında gelişen mikroorganizmalar	14
Şekil 3.6. Mikroorganizma gelişimi görülen sıvı besi yerleri	14
Şekil 3.7. Safra tuzunun steril filtreden geçirilmesi	15
Şekil 3.8. Laminer kabin altında kolesterol analizi için ön hazırlıklar.....	15
Şekil 3.9. Santrifüjden çıkartılan Eppendorf® tüpü.....	16
Şekil 3.10. Süpernatant alındıktan sonra kalan peletin görüntüsü	16
Şekil 3.11. Mikroorganizmaların ışık mikroskobunda incelenmesi.....	17
Şekil 3.12. Örneklerin agaroz jel görüntüsü.....	18
Şekil 4.1. Kolesterol asimilasyon sonuçlarının hesaplanmasında kullanılan kalibrasyon grafiği.....	23
Şekil 4.2. Gram boyama sonrasında bazı izolatların ışık mikroskobunda görüntüsü (x100)	25
Şekil 4.3. Tanımlanan mikroorganizmaların tür içindeki kolesterol asimilasyon oranları .	26
Şekil 4.4. Tanımlanan mikroorganizmaların filogeni ağacı ve benzerlik oranları	27

ÇİZELGE DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3.1. Çiğ süt numunelerinin alındığı yerler ve çiğ süt çeşidi	11
Tablo 4.1. Çiğ süt örneklerinde mikroorganizma sayıları (log kob/g).	21
Tablo 4.2. Kolesterol asimilasyonu özelliği belirlenen ve ileri tanımlama için seçilen izolatların elde edildiği kaynak sütler ve izolatların kodları.	22
Tablo 4.3. Bakteri izolatlarının toplam kolesterol asimilasyon düzeyleri (%).	23
Tablo 4.4. İzolatların Gram boyama sonuçları.	24
Tablo 4.5. Tür düzeyinde tanımlanan bakterilerin tanımlama oranları ve kolesterol asimilasyon değerleri	26

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BSH	: Safra tuzu hidrolaz
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
kob	: Koloni oluşturan birim
KVH	: Kardiyovasküler hastalık
KZYA	: Kısa zincirli yağ asitleri
LAB	: Laktik asit bakterileri
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
R²	: Determinasyon katsayısı
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Çiğ Sütlerden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Kolesterol Asimilasyonu Aktivitesi

Ayşe Seçil MUTLUCAN

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Oğuz GÜRSOY

Ağustos, 2021

Yüksek kolesterol seviyelerinin düşürülmesi kalp-damar hastalıkları riskini azaltmakta ve daha kaliteli bir yaşam tarzı oluşumuna katkı sağlamaktadır. İnsanların beslenme konusunda bilinçlenmesi ve kolesterol düşürücü ilaçların yan etkilerinin olması farklı arayışları beraberinde getirmiştir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda laktik asit bakterilerinin kan kolesterol seviyesini farklı mekanizmalarla azaltıcı etki potansiyeline sahip olduğu ortaya koyulmuştur. Bu tez çalışmasında Burdur merkez, ilçe ve köylerinden toplanan 24 farklı çiğ süt örneğinden laktik asit bakterileri izole edilmiştir. İzolatların kolesterol asimilasyon oranları (%) belirlenmiştir. Kolesterol asimilasyon oranları %27,90 ile %82,17 arasında değişim gösteren izolatlardan 9 tanesi seçilerek 16s rRNA dizi analizi sonuçlarına göre tanımlanmıştır. Tanımlama sonuçlarına göre farklı düzeylerde kolesterol asimilasyonu aktivitesine sahip ilgili izolatların *Lactococcus lactis*, *Lactococcus garvieae*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus lactis* ve *Enterococcus mundtii* türleri olduğu tespit edilmiştir. En yüksek kolesterol asimilasyonu değeri ise %82,17 ile *Enterococcus faecium* türünde gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Laktik asit bakterileri, kolesterol, çiğ süt, *Enterococcus faecium*

Hazırlanan bu Yüksek Lisans tezi Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0590-YL-19 proje numarası ile desteklenmiştir.

SUMMARY

M.Sc. Thesis

Cholesterol Assimilation Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Raw Milks

Ayşe Seçil MUTLUCAN

**Burdur Mehmet Akif Ersoy University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Division of Food Engineering**

Supervisor: Prof. Dr. Oğuz GÜRSOY

August, 2021

Lowering high cholesterol levels reduces the risk of cardiovascular diseases and contributes to a better quality in healthy life. The increased awareness of people towards healthy nutrition and the adverse side effects of cholesterol-lowering drugs have accelerated scientific studies on alternative methods to reduce high blood cholesterol levels. Current studies have shown that lactic acid bacteria may have a potential to reduce blood cholesterol levels by different mechanisms. In this study, lactic acid bacteria were isolated from 24 different raw milk samples collected from the center, districts and villages of Burdur city in Turkey. Cholesterol assimilation values (%) of isolates were determined. Nine of the isolates having cholesterol assimilation values ranged from 27.90 to 82.17% were selected and identified according to the results of 16s rRNA sequence analysis. Results indicated that isolates with different levels of cholesterol assimilation activities were determined to be *Lactococcus lactis*, *Lactococcus garvieae*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus lactis* and *Enterococcus mundtii* species. The highest cholesterol assimilation value (82.17%) was observed in *Enterococcus faecium* species.

Keywords: Lactic acid bacteria, cholesterol, raw milk, *Enterococcus faecium*

The present M.Sc. Thesis was supported by Coordinatorship of Scientific Research Projects of Burdur Mehmet Akif Ersoy University under the Project number of 0590-YL-19.

1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından açıklanan verilere göre, kandaki yüksek kolesterol seviyesinin de risk faktörleri arasında yer aldığı kardiyovasküler hastalıklar (KVH), 2019 yılında tahminen 17,9 milyon insanın ölümüne neden olmuş ve bu ölümler tüm küresel ölüm nedenlerinin %32'sini oluşturmuştur (WHO, 2021).

Kandaki fazla kolesterolün damarlarda birikmesiyle oluşan ateroskleroz (damar sertliği) adı verilen rahatsızlık nedeniyle gerçekleşen ölümler, dünyada olduğu gibi ülkemizde de oldukça yaygındır (Özcan, 2007; Zengin, 2012). Ateroskleroz, hastaların yaşam süresini kısaltmanın yanı sıra hayat kalitesini de olumsuz yönde etkilemektedir (Aktimur, 2011). T.C Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'nce 2019 yılında paylaşılan bilgilere göre, bulaşıcı olmayan hastalıklar arasında en çok ölüme KVH'ler neden olmaktadır. Yine Türkiye'de her iki ölümden biri kalp ve damar hastalıkları kaynaklı olmasına rağmen, bu ölümlerin %80'i önlenilecek durumdadır. Bu sebeple kan kolesterol seviyelerinin sağlıklı bir insan için izin verilen sınırlar içerisinde olması oldukça önemlidir.

Yüksek yağlı gıdalarla beslenmek insan vücudunda kolesterol birikmesine neden olarak KVH'ye zemin hazırlamaktadır (Lee vd., 2010). Bu nedenle diyetle alınan toplam yağ ve doymuş yağ asitlerinin azaltılması KVH'ın oluşma riskini düşürmektedir (Baysal, 2006). Sebze, meyve, tam tahıllı, yüksek lifli ve omega 3 içeren gıdalardan oluşan sağlıklı bir diyet ve düzenli egzersiz ile kan kolesterol seviyesini düşürmek mümkündür (Bruckert ve Rosenbaum, 2011; Sarzynski vd., 2018). Uygun şekilde beslenme ve egzersiz ile kan kolesterol seviyesinin azaltılamadığı durumlarda ilaç tedavisine başvurulmaktadır. Ancak alınan ilaçların potansiyel yan etkileri nedeniyle, bireylerin beslenme alışkanlıklarında büyük değişiklikler gerektirmeyecek bir uygulamanın kan kolesterol seviyelerinin düşürülmesi için daha sağlıklı bir yaklaşım olacağı düşünülmektedir (Golay vd., 1990). Son yıllarda tüketicilerin güvenilir ve sağlığa olumlu etkileri olan gıdalara karşı artan ilgisi nedeniyle, kan kolesterol seviyesinin düşürülmesine yardımcı gıda ve/veya gıda takviyelerinin geliştirilmesi konusunda dünya genelinde çalışmalar yapılmaktadır.

Kolesterol seviyesini azaltıcı etkisi de bulunan laktik asit bakterileri (LAB), sağlık üzerine birçok potansiyel yararlı etkisi nedeniyle ilgi odağı olmuştur ve olmaya devam etmektedir (Gilliland, 1990). Yapılan birçok çalışmada LAB'nin kolesterol seviyesinin

düşürülmesinde önemli bir etkiye sahip olduğunun belirlenmesi bu bakterilere olan ilgiyi daha da arttırmıştır (Gürsoy vd., 2011).

Bu çalışmada, çiğ sütlerden laktik asit bakterilerinin izole edilmesi, izolatların kolesterol asimilasyonu aktivitesinin belirlenmesi ve kolesterol asimilasyonu aktivitesine sahip bazı izolatların tanımlanması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Laktik Asit Bakterileri (LAB)

Kullanımı çok eski zamanlara dayanmasına rağmen 19. yüzyılda bilimsel ve teknik gelişmelere öncülük etmeye başlayan LAB; Gram pozitif, katalaz negatif, aerotolerant, spor oluşturmeyen (*Sporolactobacillus inulinus* hariç), karbonhidratların fermentasyonu esnasında başlıca son ürün olarak laktik asit üreten, çoğunluğu hareketsiz, kok veya çubuk şeklindeki mikroorganizmalardır (Stiles vd., 1997; İşleroğlu vd., 2008; Yüksekdağ ve Beyatlı, 2009). LAB asit, alkali ve tuza karşı toleranslı (bazı cinsler %6,5 tuz konsantrasyonuna tolerans gösterirken, *Tetragenococcus* cinsi %18 tuz konsantrasyonunu tolere edebilir) olmasının yanı sıra, 10-45°C sıcaklıkları arasında gelişebilmektedir (Axelsson, 1998). Ayrıca LAB genellikle pH 4,0-4,5 aralığında gelişirken, pH 3,2’de ve pH 9,6’da aktif olan türleri de vardır (Caplice ve Fitzgerald, 1999).

LAB’nin en önemli cinsleri *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* ve *Bifidobacterium*’dur (Klein vd. 1998).

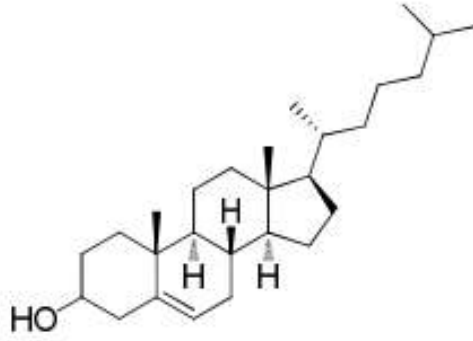
LAB, genel olarak güvenli (GRAS) bakteriler olarak kabul edilmekte ve genellikle süt, et ve sebze gibi besin içeriği yüksek ortamlarda bulunmaktadır (Limsowtin vd., 2003; İşleroğlu vd., 2008). Gıda ve yem fermentasyonunda önemli rol oynayan laktik asit bakterileri aynı zamanda sağlıklı insan ve hayvanların mukozal yüzeylerinde bulunabilmektedir (Axelson, 1998).

LAB, metabolik özelliklerinden dolayı birçok fermentasyon işleminde rol oynayarak gıdaları daha sindirilebilir hale getirmenin yanında fermente gıdaların tadına, aromasına ve dokusuna da katkılar sağlamaktadır (Caplice ve Fitzgerald, 1999). Bunun yanı sıra ürettikleri organik asitler, hidrojen peroksit, diasetil ve bakteriyosinler sayesinde patojen mikroorganizmaların gelişmesini inhibe ederek, besin kalitesini korur ve gıdaların raf ömrünü uzatmaya yardımcı olur (Zhu vd., 2000; Parada vd. 2007). LAB, ticari starter kültürlerin çoğunluğunu oluşturmakta ve sağlık, pazarlama, teknoloji gibi birçok açıdan avantaj sağlamaktadır (Hansen, 2002; Leroy ve Vuyst, 2004).

LAB’nin, bağırsak florası üzerinde olumlu etki göstermesi, bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi, ağız mikroflorasının düzenlenmesi, ürogenital rahatsızlıkların önlenmesi ve kandaki kolesterol seviyesinin düşürülmesi gibi sağlığa yararlı birçok etkisi bulunmaktadır (Lee vd., 2009; Gürsoy ve Kınık, 2006).

2.2. Kolesterol

Kolesterol tüm hayvanların hücre zarı ve kan plazmasında esterleşmiş veya serbest halde bulunan, hayvansal kaynaklı steroller arasındaki en bilinen bileşiktir (Ertaş, 2017). Kolesterolün yapısı Şekil 2.1’de verilmiştir.



Şekil 2.1. Kolesterolün kimyasal yapısı (Gazel, 2016)

Kan plazmasında kolesterol, lipoproteinler tarafından taşınır (Çelebi ve Karaca, 2006). Bu lipoproteinlerden düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterolü birçok dokuya taşırken, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ile kolesterol dokulardan karaciğere taşınır, burada değişmeden veya ters kolesterol taşınması olarak bilinen süreç ile safra asitlerine dönüştürülerek vücuttan atılır (Mayes vd., 2003). Safra asitlerinin önemli bir bileşeni olan kolesterol, beslenme yoluyla dışarıdan alınabildiği gibi vücut tarafından da sentezlenmektedir (Mayes vd., 2003; Kotancılar vd., 1995). Vücutta D vitamini ve çeşitli steroid hormonları üretiminde rol oynayan kolesterol aynı zamanda hücre zarlarının yapımı ve onarımı için de gereklidir (Küçükkaya, 2008). Yapılan araştırmalar sonucunda kandaki HDL seviyesinin, ateroskleroz riski ile ters orantılı olduğu, yani HDL seviyesi arttıkça ateroskleroz olma riskinin azaldığı belirtilmiştir (Toth, 2005). Ancak kanda olması gereken miktardan fazla bulunan LDL, damar duvarında birikerek damarın tıkanmasına ve bunun sonucunda da kalp krizi veya felce neden olabilmektedir (Brown ve Goldstein 1984). Bundan dolayı LDL kötü kolesterol, HDL ise iyi kolesterol olarak bilinmektedir (Toth, 2005). Türk Kardiyoloji Derneği’nin 2002 yılında yayınlamış olduğu Koroner Kalp Hastalığı Korunma ve Tedavi Kılavuzu’na göre toplam kolesterol 200 mg/dL’den düşük, LDL kolesterol 130 mg/dL’den düşük, HDL kolesterol 40 mg/dL’den yüksek ise değerler normal olarak kabul edilmektedir. 60 mg/dL’den daha

yüksek HDL seviyeleri kalp hastalığı riskini azaltmaya yardımcı olmaktadır (Barter vd., 2003).

Kolesterol bir zoo-sterol olup hayvansal kaynaklı gıdalarda bulunmaktadır (Albuquerque vd., 2016). Beslenme yoluyla yüksek oranda alınan doymuş yağ asitleri ile LDL kolesterol, tekli doymamış yağ asitleri alımı ile HDL kolesterol miktarı artmaktadır (Öngün Yılmaz, 2018).

Son yıllarda serum kolesterol seviyesini azaltmaya yönelik yeni yaklaşımlar söz konusudur.

2.3. LAB'nin Kolesterol Düşürücü Etkilerini Açıklayan Olası Mekanizmalar

LAB'nin kolesterol düşürücü etkisi hala belirsizliğini korumakla birlikte farklı mekanizmalar öne sürülmüştür (Lye vd., 2010). Bu mekanizmalar; kolesterol asimilasyonu, safra tuzlarının dekonjugasyonu, bakteri hücre duvarına kolesterolün tutunması, kolesterolün koprostanole dönüşmesi ve kısa zincirli yağ asitlerinin üretimi olarak açıklanabilmektedir (Ooi vd., 2010).

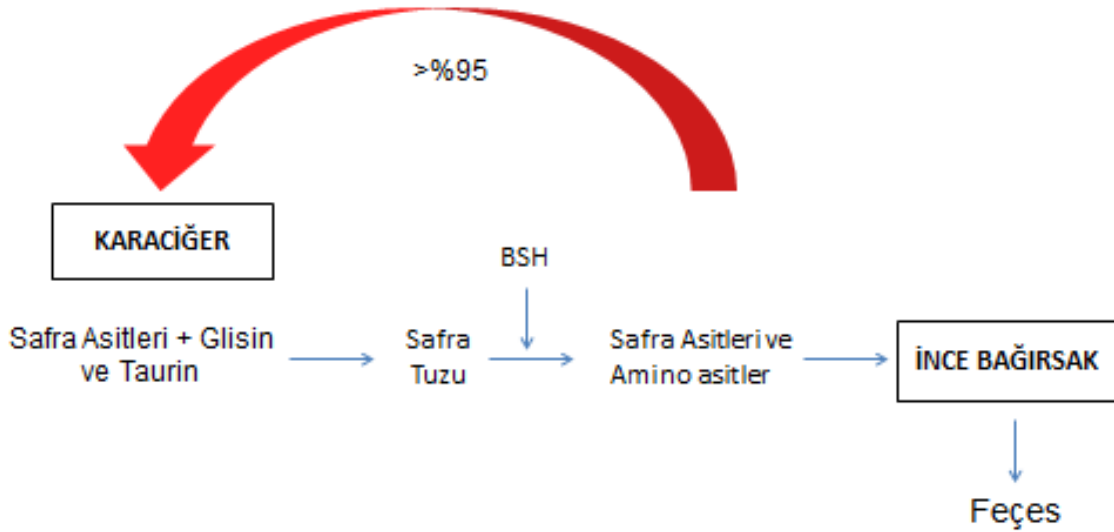
2.3.1. Kolesterol Asimilasyonu

Kolesterol, LAB tarafından hücre zarına dahil edilerek asimile edilmektedir (Ooi vd., 2010). Ortamda safra tuzlarının varlığı LAB'nin kolesterol asimilasyonunu arttırmakta ve bakterilerin kolesterol asimilasyonu sırasında hücre duvarı yapısında değişikliğe neden olarak bakterinin lisize karşı olan direncini yükseltmektedir (Noh vd., 1997). Hücre zarına dahil edilen kolesterol, toplam doymuş ve doymamış yağ asitleri konsantrasyonlarını etkilemekte ve bunun sonucunda hücre lisize karşı daha dayanıklı hale gelmektedir (Liong ve Shah, 2005). Safra tuzlarının varlığı ve konsantrasyonu dışında, LAB'nin kolesterol asimilasyonunu etkileyen başlıca faktörler bakteri suşu ve bakterinin bulunduğu ortamda çoğalma kabiliyeti ve evresidir (Gürsoy vd., 2011).

LAB tarafından kolesterol asimilasyonunu gözlemlemek amacıyla yapılan *in vitro* bir çalışmada, *Lactobacillus acidophilus* suşlarının safra varlığında kolesterolü azalttığı ve kolesterol asimilasyon yeteneklerinin suşlara bağlı olarak farklılık gösterdiği belirtilmiştir (Gilliland vd., 1985). Aynı çalışma domuzlar üzerinde *in vivo* olarak da yapılmış ve safra varlığında gelişme ve kolesterol asimile etme yeteneği sebebiyle seçilen *Lactobacillus acidophilus* RP32 suşu ile beslenmenin ardından domuzların kolesterol seviyelerinde önemli ölçüde düşüş gözlemlendiği ifade edilmiştir (Gilliland vd., 1985).

2.3.2. Safra Tuzlarının Dekonjugasyonu

Yağların sindiriminde önemli bir rol oynayan safra; kolesterol, fosfolipidler, pigment biliverdin ve safra asitlerinden oluşan sarı-yeşil renkli bir çözeltidir (Bengley vd., 2006; Romano vd., 2020). Kolesterolde sentezlenmekte olan safra asitlerinin, karaciğerde glisin ve taurin amino asitleri ile konjugasyonu sonucunda safra tuzları oluşmaktadır (Chen vd., 2011; Çil ve Açıkgöz, 2016). Bazı LAB, safra tuzu hidrolaz (BSH) enzimi salgılayarak, amino asitlerin ve safra asitlerinin açığa çıkmasına neden olur (Begley vd., 2006). Açığa çıkan safra asitlerinin %95'ten fazlası enterohepatik döngü (Şekil 2.2) ile tekrar karaciğere dönmekte kalan kısım ise dışkı (feçes) ile atılmaktadır (Önür ve Beyler, 2001). Karaciğer safra asitlerini geri dönüştürerek tekrar tekrar kullanabilmekte, bu nedenle de karaciğer daha fazla kolesterol kullanarak safra asitleri yapmak zorundadır (Saini vd., 2010). Böylelikle safra asitlerinin oluşumu ve safranın atılımı ile fazla kolesterol vücuttan uzaklaştırılmaktadır (Chen vd., 2011).



Şekil 2.2. Enterohepatik Döngü

Konu ile ilgili yapılan bir çalışmada, sıçanlara ağız yoluyla *Lactobacillus buchneri* ATCC 4005 suşundan izole edilen safra tuzu hidrolaz enzimi verilmiş ve sonuç olarak sıçanların kolesterol seviyelerinde %58'e kadar bir azalma olduğu belirlenmiştir (Sridevi vd., 2009). *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum* suşlarının kolesterol asimilasyonlarını incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada, kolesterolün kültür

ortamından uzaklaştırılmasının bakterilerin kolesterol alımından bağımsız olarak, safra tuzlarının dekonjugasyonu sonucunda oluşan asidik ortamda kolesterolün safra asitleriyle çökmesi nedeniyle gerçekleştiği belirtilmiştir (Klaver ve Van der Meer, 1993).

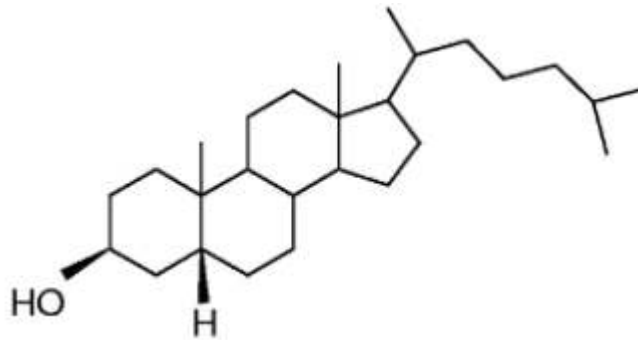
2.3.3. Bakteri Hücre Duvarına Kolesterolün Tutunması

Bakteri hücre duvarına kolesterolün tutunma durumu ve miktarı, bakterilerin hücre zarı yapılarının farklı olmasından dolayı suşlar arasında farklılık göstermektedir (Razin, 1975).

Yapılan bir çalışmada (Noh vd., 1997) *Lactobacillus acidophilus* ATTC 43121 suşu tarafından asimile edilen kolesterolün büyük bir kısmı, metabolitik olarak bozulmadan hücrelerden geri kazanılmıştır. Bunun nedeni kolesterolün bakterilerin hücre duvarına tutunması olarak yorumlanmış ve yapılan farklı bir çalışmada (Kimoto vd., 2002) canlı olmayan bakterilerin hücre duvarına da kolesterolün tutunabildiği ancak canlı bakterilerin hücre duvarına ölü hücrelere göre daha fazla kolesterol tutunduğu gözlemlenmiştir.

2.3.4. Kolesterolün Koprostanole Dönüşümü

Bazı LAB, ürettikleri HMG CoA redüktaz enzimi ile kolesterolü vücut tarafından kolayca emilemeyen koprostanole indirgemektedir (İnanç vd., 2005; Beitz 1995). Koprostanolün yapısı Şekil 2.3'te verilmiştir. Vücutta tam olarak sindirilemeyen koprostanol, feçes ile vücuttan atılmakta böylece kolesterol seviyesi düşmektedir (Ma, 2004).



Şekil 2.3. Koprostanolün kimyasal yapısı (Gerard vd., 2007)

Yapılan bir çalışmada (Lye vd., 2010), *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314, *Lactobacillus acidophilus* FTCC 0291, *Lactobacillus bulgaricus* FTCC

0411, *Lactobacillus bulgaricus* FTDC 1311 ve *Lactobacillus casei* ATCC 393 suşlarının kolesterol redüktaz aktivitesi ölçülmüş ve değerler suşlar arasında farklılık göstermiştir. Sonuç olarak çalışmada kullanılan suşların, kolesterol redüktaz aktivitesi yardımıyla kolesterolü koprostanole dönüştürerek azaltabileceği belirtilmiştir. *Eubacterium coprostanoligenes* ATCC 51222 suşunun, serum kolesterol konsantrasyonu üzerindeki etkisini incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada (Li vd., 1998), bu mikroorganizma 12 adet fareye 1 hafta boyunca ağız yoluyla verilmiş ve deney grubu farelerin kontrol grubuna göre serum kolesterol seviyelerinin daha düşük olduğu, dışkılarındaki koprostanol-kolesterol oranının ise daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

2.3.5. Kısa Zincirli Yağ Asitlerinin Üretimi

Gıdaların sindirilemeyen kısmı olan lifler, kalın bağırsakta LAB tarafından absorbe edilirken kısa zincirli yağ asitleri (KZYA) olan propiyonik, asetik, bütirik ve valerik asitler açığa çıkmaktadır (Saini vd., 2010; Salminen vd., 1998). Bunlardan özellikle propiyonik asit, karaciğer tarafından kolesterol üretimini azaltmaya yardımcı olur (Saini vd., 2010).

Pereira vd. (2003) *Lactobacillus fermentum* KC5b suşunun kolesterol düşürücü etkisinin, KZYA üretimine ve safra tuzu dekonjugasyonuna bağlı olabileceğini tespit etmişlerdir. Hara vd. (1999) yaptıkları çalışmada 3 gruba ayrılan sıçanlara lifsiz, KZYA ve şeker pancarı içeren diyet uygulamışlardır. 14 gün boyunca şeker pancarı lifi ve KZYA diyeti ile beslenen sıçanlardaki plazma kolesterol konsantrasyonları, lifsiz diyetle beslenen sıçanlara göre daha düşük olduğunu gözlemlemişlerdir (Hara vd., 1999).

2.4. LAB'nin Kolesterol Asimilasyonu Özellikleri

Farklı kaynaklardan izole edilen LAB'nin kolesterol asimilasyonu ile ilgili son yıllarda yapılan bazı çalışmaların bulguları aşağıda özetlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada yılanbaşı balıklarının (*Channa argus*) bağırsaklarından izole edilen 178 LAB içerisinde 10 tanesinin (W1, W16, W24, C4, C9, C11, L1, L3, L12, L19) %0,3 safra tuzu varlığında %18,7 ila %48,4 arasında kolesterol asimilasyon aktivitesi gösterdiği ve en yüksek kolesterol asimilasyonu aktivitesinin (%48,4) *Lactococcus lactis* türünde olduğu belirlenmiştir (Kong vd., 2020).

Kim vd. (2021) fermente lahanalardan (kimchi) izole ettikleri LAB'nin kolesterol asimilasyonu özelliklerini farklı safra tuzu konsantrasyonlarında [% 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 ve 0,5 (ağırlık/hacim)] incelemişlerdir. Çalışma sonucunda %0,1 safra tuzu varlığında *Pediococcus acidilacti* LRCC5307 suşunun kolesterol asimilasyon aktivitesi %30,5 olarak

belirlenmiş ve %0,2 safra tuzu varlığında kolesterol asimilasyon aktivitesinin %74,5 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada *Pediococcus acidilacti* LRCC5307 suşu kullanılarak kolesterolü azaltılmış tereyağı üretimi denenmiş ve fermantasyondan sonra tereyağının kolesterol içeriğinde %11'lik bir azalma sağlanabildiği gözlemlenmiştir (Kim vd., 2021).

Widodo vd. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, *Lactobacillus casei* AG ve *Lactobacillus casei* AP suşlarının %0,4 safra tuzu varlığında kolesterol asimilasyon aktiviteleri araştırılmıştır. *Lactobacillus casei* AG ve AP suşlarının kolesterol asimilasyon aktivitesi 37°C'de 24 saatlik inkübasyon sonucunda sırasıyla %57 ve %35 olarak bulunmuştur (Widodo vd., 2021).

Yapılan bir çalışmada (Wu vd., 2021) Çin'in Anhui eyaletinde bulunan Wuwei şehrinde yerel bir salamura yaprak hardalından izole edilen 17 LAB'nin potansiyel probiyotik özellikleri incelenmiş ve izolatlardan *Lactiplantibacillus plantarum*'un %0,3 safra tuzu içeren MRS ortamında kolesterol asimilasyon değeri %49,72 olarak belirlenmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada (El-Beksh vd., 2021), probiyotik özellikleri incelenmek üzere farklı kaynaklardan 96 LAB izole edilmiş ve söz konusu izolatlardan 11 tanesinin %0,3 safra tuzu varlığında kolesterol asimilasyonları araştırılmıştır. Çalışma sonucunda izolatların kolesterol asimilasyon değerleri %9,79 ile %93,4 arasında bulunmuştur. Probiyotik olarak kullanılabileceği düşünülen ve %50,9 kolesterol asimilasyon aktivitesine sahip izolat *Pediococcus pentosaceus* olarak tanımlanmıştır.

Kuerman vd. (2021) *Lactobacillus paracasei* S0940 ve *Streptococcus thermophilus* ldbm1 suşlarının kolesterol düşürme yeteneklerini yüksek kolesterolü diyetle beslenen farelerde *in vivo* olarak değerlendirmiştir. Çalışmada ilgili suşların serum kolesterol, karaciğer kolesterol ve trigliserit düzeylerini önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir. Deney grubundaki farelerin dışkı ile atılan kolesterol miktarında kontrol grubuna göre artış görüldüğü tespit edilmiş ve araştırmacılar tarafından ilgili LAB suşlarının fonksiyonel gıda üretiminde kullanılabileceği belirtilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada Burdur il merkezi ve Bucak ilçesindeki yerel pazarlardan ve çiğ süt üreticilerinden temin edilen 17 inek, 6 keçi ve 1 manda sütü olmak üzere toplam 24 farklı çiğ süt numunesi laktik asit bakterilerini izole etmek amacıyla kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan çiğ süt numunelerinin adı/kodu, alındığı yer ve çiğ süt çeşidi Tablo 2.1’de verilmiştir. Çiğ süt örnekleri sağıldıktan (Şekil 3.1) sonra steril kavanozlara aktararak (Şekil 3.2), buz aküleri ile birlikte en kısa zamanda Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü laboratuvara getirilerek, analiz yapılncaya kadar $4\pm1^{\circ}\text{C}$ ’de muhafaza edilmiş ve aynı gün içerisinde analizleri yapılmıştır.



Şekil 3.1. Keçi sütü numunesinin toplanması



Şekil 3.2. Laboratuvara getirilen süt numunesi

Tablo 3.1. Çiğ süt numunelerinin alındığı yerler ve çiğ süt çeşidi

Numune Adı/Kodu	Çiğ Süt Numunesinin Alındığı yer	Çiğ Süt Çeşidi
S1	Bucak, Burdur	İnek
S2	Bucak, Burdur	İnek
S3	Bucak, Burdur	İnek
S4	Burdur	İnek
S5	Çamlık, Bucak, Burdur	Keçi
S6	Bucak, Burdur	İnek
S7	Bucak, Burdur	Keçi
S8	İncirdere, Bucak, Burdur	Keçi
S9	İncirdere, Bucak, Burdur	Keçi
S10	Bucak, Burdur	Keçi
S11	Bucak, Burdur	Keçi
S12	İncirdere, Bucak, Burdur	İnek
S13	Bucak, Burdur	İnek
S14	Alkaya, Bucak, Burdur	İnek
S15	Bucak, Burdur	İnek
S16	Bucak, Burdur	İnek
S17	Bucak, Burdur	İnek
S18	Bucak, Burdur	İnek
S19	Bucak, Burdur	İnek
S20	Bucak, Burdur	İnek
S21	Bucak, Burdur	İnek
S22	Burdur	İnek
S23	Burdur	İnek
S24	Burdur	Manda

3.2. Aletler ve Cihazlar

Laboratuvar malzemelerinin sterilizasyonu otoklav (Autoclave WAC-80, Daihan Scientific Co., Ltd., Kore) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Numunelerin homojenizasyonu için stomacher (Bagmixer 400P, Interscience, Fransa) kullanılmıştır. Besi yerlerinin sabit

sıcaklıkta kalabilmeleri amacıyla su banyosu (WB-11, Daihan Scientific Co., Ltd., Kore) kullanılmıştır. Petri kaplarına ekimi yapılan mikroorganizmalar, çoğalmaları için inkübatörde (WiseCube, Daihan Scientific Co., Ltd., Kore) bekletilmiştir. Mikroorganizmaların Gram boyama özellikleri ışık mikroskobu (Olympus CX41, Olympus Corporation, Japonya) ile incelenmiştir. İzolatlardan süpernatant elde edebilmek amacıyla santrifüj (Sigma 1-14, Sartorius, Almanya) kullanılmıştır. Toplam kolesterol miktarı, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde bulunan Beckman Coulter AU5800 (Şekil 3.3) model cihaz ile belirlenmiştir. İzolatların DNA izolasyonu esnasında termal döngü cihazından (Veriti 96 Well Thermal Cycler, Thermofisher Scientific, ABD) yararlanılmıştır. Amplifikasyonun varlığını görüntülemek amacıyla elektroforez (Owl™ EasyCast™ B2 Mini Gel Electrophoresis System, Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır. Agaroz jel, UV transillüminatör (Infinity ST5, Vilber Lourmat, Fransa) cihazında görüntülenmiştir. Numune hazırlıkları için gerektiğinde vorteks (VM-10, Daihan Scientific Co., Ltd., Kore) ve tartım işlemleri hassas terazi (HR-250AZ, AND, Japonya) ile yapılmıştır.



Şekil 3.3. Beckman Coulter AU5800 model kolesterol ölçüm cihazı

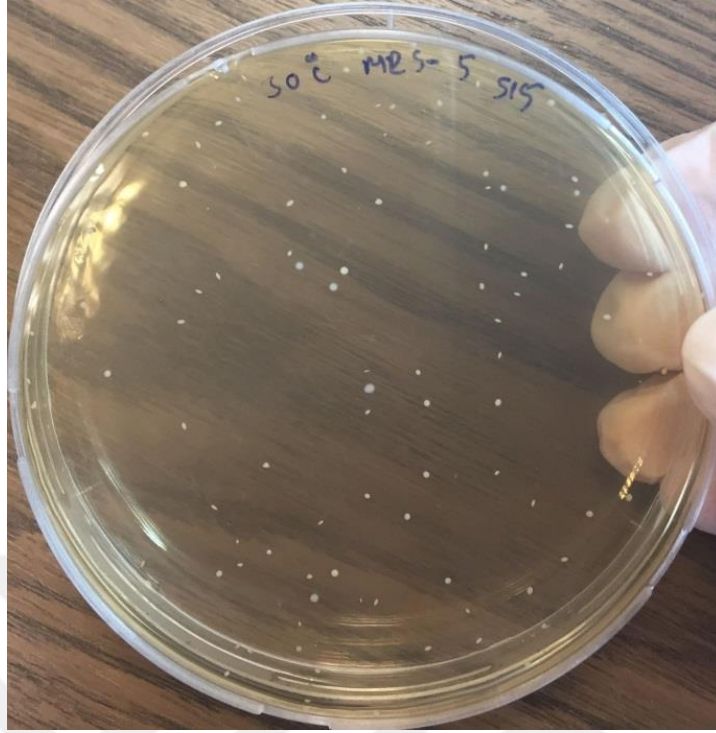
3.3. Yöntem

3.3.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

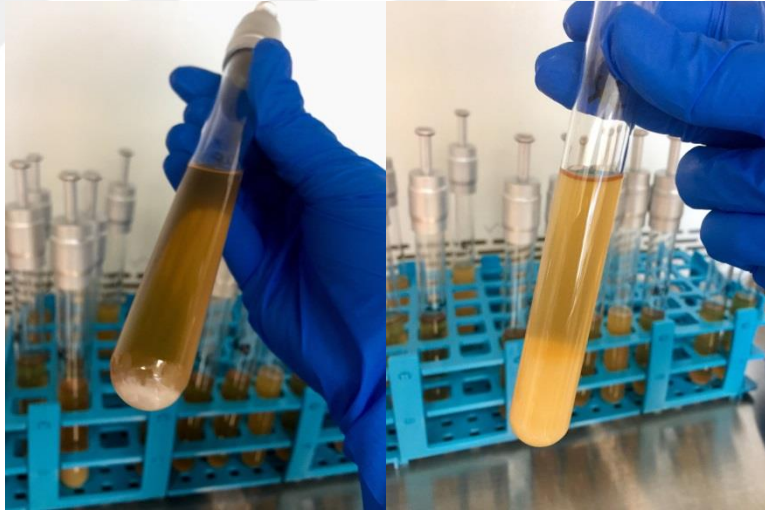
LAB'nin izolasyonu sırasında dökme plak yöntemi kullanılmıştır (Güven ve Demirel Zorba, 2018). 10 mL çiğ süt örneği, 90 mL peptonlu fizyolojik su (Peptone water buffered; acc. to ISO 6579, Merck, Almanya) çözeltisi ile birlikte Stomacher cihazında homojen hale getirilerek seyreltilmiştir (Bostancı, 2019). Oluşan çözeltiden 10^{-7} seyreltiye kadar dilüsyonlar hazırlanmıştır. Laktobasiller için MRS Agar (Lactobacillus Agar acc. to DE MAN, ROGOSA and SHARPE, Merck, Almanya), laktokoklar için %0,5 glukoz ilave edilen M17 Agar (M17 Agar acc. to Terzaghi, Merck, Almanya), toplam mezofilik bakteriler için PCA (Plate Count Agar, Merck, Almanya) kullanılmıştır (Hazır Dalca, 2015; Durak vd., 2008). Steril petrilere, hazırlanan dilüsyonlardan 1'er mL konularak üzerlerine 45°C sıcaklıktaki besi yerlerinden yaklaşık 15-20 mL dökülmüştür. Dairesel hareketlerle karışımın homojenizasyonu sağlanarak, 15-20 dakika besi yerlerinin katılaşması beklenmiştir. Sonrasında petriler ters çevrilerek, inkübatöre konulmuştur (Şekil 3.4). Mezofilik laktik asit bakterileri 30°C'de, termofilik laktik asit bakterileri ise 43°C'de 48 saat inkübe edilmiştir (Hazır Dalca, 2015). İnkübasyon sonunda petrilere gelişen kolonilerin sayımı yapıldıktan sonra (Şekil 3.5) MRS ve M17 agar üzerinde farklı olduğu düşünülen koloniler seçilerek, termofilik ve mezofilik koşullarda MRS ve M17 sıvı besi yerinde geliştirilmiştir (Şekil 3.6) (Hazır Dalca, 2015). Çalışma sonucunda elde edilen izolatlar, son konsantrasyonu %30 gliserol olacak şekilde hazırlanarak Eppendorf tüpleri içerisinde -18°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.4. İnkübasyona bırakılan petri kapları



Şekil 3.5. Petri kaplarında gelişen mikroorganizmalar

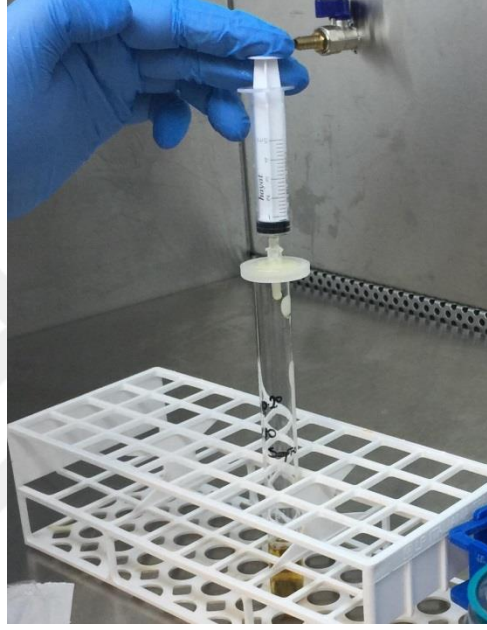


Şekil 3.6. Mikroorganizma gelişimi görülen sıvı besi yerleri

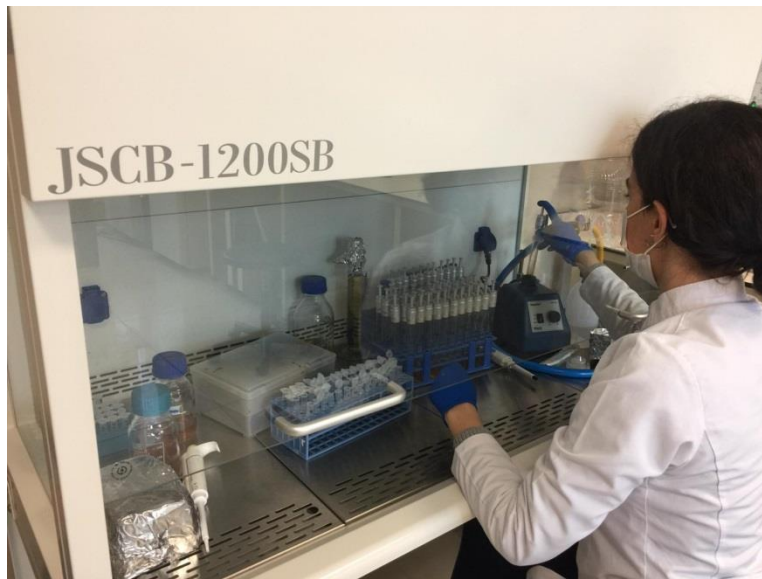
3.3.2. Kolesterol Analizi

LAB'nin kolesterol asimilasyonu özellikleri Alp (2018) tarafından önerilen yöntem kullanılarak belirlenmiştir. MRS sıvı besi yeri son konsantrasyonu % 0,3 safra tuzu (Oxbile dried pure, Merck, Almanya) ve % 2 kolesterol (Cholesterol-PEG 600, Sigma Aldrich, Hindistan) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Kolesterol ve safra çözeltisi, kullanılmadan

önce 0,45 μm 'lik steril filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir (Şekil 3.7). Dondurulmuş halde bulunan izolatlar çözündürülerek, aktiveştirilmiştir. Aktifleşen izolatlar, kolesterol ve safra içeren MRS sıvı besi yeri örneklerine %1 oranında ilave edilerek (Şekil 3.8), 37°C'de 18 saat inkübasyonda bırakılıp, 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir (Şekil 3.8, Şekil 3.9). Elde edilen süpernatantlar, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde bulunan Beckman Coulter AU5800 model cihazda analiz edilmiş ve toplam kolesterol miktarı belirlenmiştir.



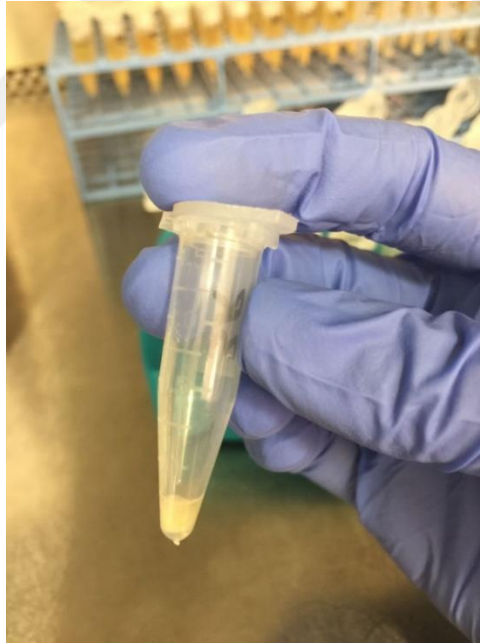
Şekil 3.7. Safra tuzunun steril filtreden geçirilmesi



Şekil 3.8. Laminer kabin altında kolesterol analizi için ön hazırlıklar



Şekil 3.9. Santrifüjden çıkartılan Eppendorf® tüpü

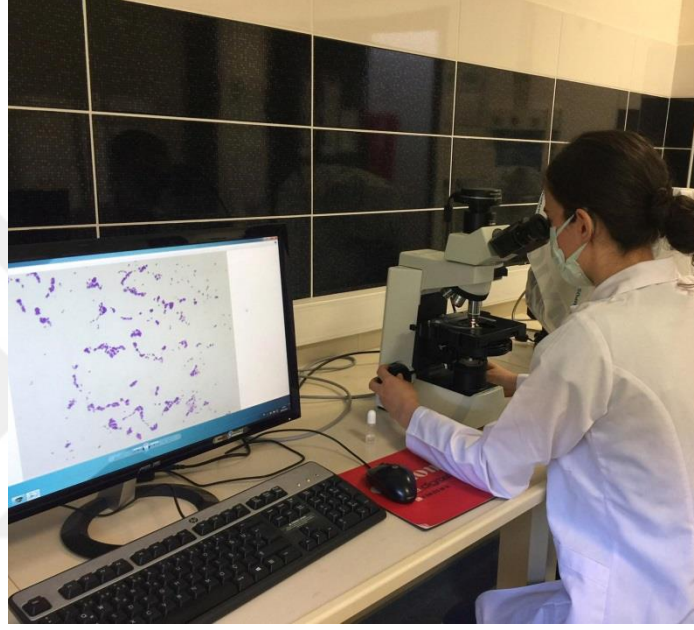


Şekil 3.10. Süpernatant alındıktan sonra kalan peletin görüntüsü

3.3.3. Gram Boyama

Mikroorganizmaların Gram boyama özelliklerini belirlemek amacıyla yapılan Gram boyama, Güven ve Demirel Zorba (2018)'in belirttiği yöntem kullanılarak yapılmıştır. Gram boyama için, Gram boyama seti (Ürün Kodu 150007, ADR Group,

Ümraniye, İstanbul) kullanılmıştır. Temiz bir lamın ortasına damlatılan saf su ile steril öze yardımıyla alınan saflaştırılmış kültür lam üzerinde karıştırılarak yayılmıştır. Lam tamamen kuruduktan sonra 3 kez alevden geçirilerek preparat hazırlanmıştır. Preparat sırasıyla kristal viyole (1 dakika), lugol (1 dakika), alkol (10 saniye), sulu fuksin (30 saniye) ile kaplanarak bekletilmiştir. Her bir işlemten sonra preparat su ile yıkanıp son olarak kurumaya bırakılmıştır. Kurumanın ardından mikroorganizmaların görüntüleri ışık mikroskobunda incelenmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Mikroorganizmaların ışık mikroskobunda incelenmesi

3.3.4. İzolatların Tanımlanması

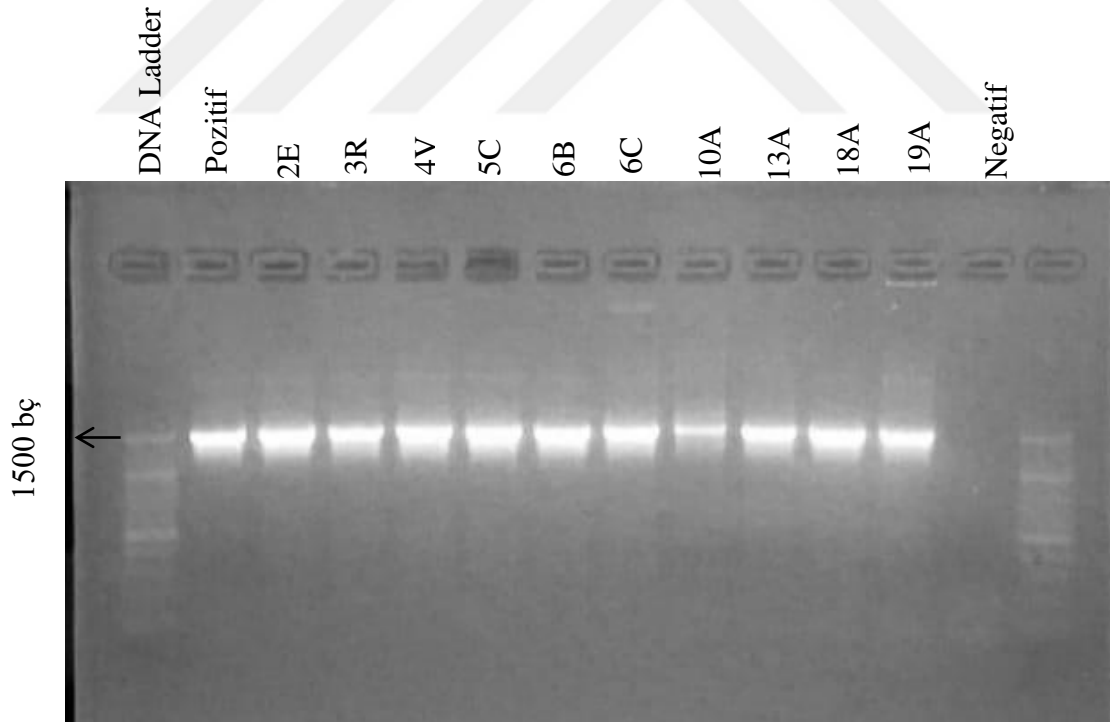
İzolatların tanımlanmasında Hazır Dalca (2015) ve Yavuz (2017) tarafından kullanılan yöntem değiştirilerek uygulanmıştır. -18°C derecede depolanmakta olan izolatlar aktiveleştirilerek MRS besisi yerine çizim yöntemiyle ekilmiş ve 30°C derecede 48 saat inkübe edilmiştir (Güven ve Demirel Zorba, 2018). İnkübasyon sonucunda tek düşen koloniler seçilerek MRS sıvı besisi yerine inoküle edilmiş ve 30 derecede 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından DNA saflaştırma kiti (GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit, Thermo Scientific, ABD) kullanılarak örneklerin genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Seçilen suşların tür tanımlaması ve filogenetik ilişkisinin incelenmesi için 16S rRNA gen bölgesi Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi ile çoğaltılmıştır. PZR

alışmalarında Taq DNA Polymerase kiti (EP0402 Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır. 16S rRNA bölgesinin çoğaltılmasında niversal 8F (5'-GGATCCAGACTTTGATYMTGGCTCAG) ve 1492R (5'-GTTTACCTTGTTACGACTT-3') primerlerinden yararlanılmıştır.

Hazırlanan tüplere termal döngü cihazında; 95°C'de 5 dakika denatürasyon, 35 döngü boyunca 95°C'de 1 dakika, 56°C'de 1 dakika (yapışma), 72°C'de 1 dakika (uzama) ve 72°C'de 10 dakika (son uzama) koşullarında program uygulanmıştır.

PZR sonrası örneklerde amplifikasyonun varlığı agaroz jel elektroforezi ile incelenmiştir. %1,2 agaroz jel 1X TAE tamponu (Sigma-Aldrich A4718) ile hazırlanmıştır. Jel boyası olarak toksik olmayan boyalar sınıfında yer alan gel-red (Safe view Classic™ G108, Applied Biological Materials Inc. (abm), Kanada) boyası kullanılmıştır. Agaroz jel elektroforez işlemi volt sabit olacak şekilde 85 V akımda 1 saat olarak 1X TAE tamponu içerisinde gerçekleştirilmiştir. Elektroforez sonrası, UV transillüminatör cihazı üzerinde UV ışık yardımı ile jel görüntülenmiştir. Örneklerin agaroz jel görüntüsü şekil 3.12'de verilmiştir.



şekil 3.12. Örneklerin agaroz jel görüntüsü

Elektroforez incelemesinde net amplifikasyon gözlemlenen rnekler, BM Labosis Laboratuvar Sistemleri firmasına sekans analizine gönderilerek çift yönlü DNA dizi analizi

istenmiştir. Sekans analizi sonuçları Finch TV ve ApE programları kullanılarak düzenlenmiş ve konsensüs dizi haline getirilmiştir. FASTA formatına getirilen konsensüs diziler, hizalama araması (BLAST, Basic Local Alignment Search Tool) kullanılarak GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) üzerinden veritabanındaki diziler ile karşılaştırılıp, türlerin tanımlaması yapılmıştır. Mikroorganizma türlerinin tanımlanması için NCBI üzerinden en yüksek skor yapan eşleşmeler baz alınmıştır.

Suşlar arasında yer alan filogenetik ilişkinin incelenmesi için MEGA X programından faydalanılmıştır. 16S rRNA bölgeleri FASTA formatında programa yüklenmiş ve Neighbor –Joining modeline göre filogenetik ağaç oluşturulmuştur.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Çiğ Süt Örneklerinin Mikrobiyolojik Özellikleri

Çiğ süt örneklerinin (n=24) mezofilik laktobasil, mezofilik laktokok, termofilik laktobasil, termofilik laktokok ve toplam aerobik mezofilik bakteri sayıları Tablo 4.1’de verilmiştir. Mikrobiyal sayım sonuçları değerlendirildiğinde örneklerin mikrobiyal yüklerinde önemli farklılıklar olduğu görülmektedir. Analiz edilen çiğ süt örneklerindeki mezofilik laktobasil, mezofilik laktokok, termofilik laktobasil, termofilik laktokok ve toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı ortalamaları 5,48, 6,28, 4,32, 4,95 ve 6,44 log kob/mL olarak hesaplanmıştır. Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalar İçin Özel Hijyen Kuralları Yönetmeliği’nde çiğ inek ve diğer hayvan türlerinden (bu çalışma için keçi ve manda) elde edilen sütlerin 30°C’deki koloni sayısının sırasıyla <100.000 kob/mL (5 log kob/mL) ve <1.500.000 kob/mL (6,18 log kob/mL) (ayda en az 2 numune ile 2 aylık bir periyodun yuvarlanmış geometrik ortalaması) olması gerektiği bildirilmektedir (TGK, 2011). Bu çalışmada çiğ inek sütleri için elde edilen toplam mezofilik aerobik bakteri sayıları 5,00 ile 7,63 arasında, keçi ve manda sütlerinde tespit edilen toplam mezofilik aerobik bakteri sayıları ise 5,67 ile 7,52 arasında değişim göstermiştir. Elde edilen bulgular ilgili yönetmelikte belirtilen sınır değerlerle kıyaslandığında 1 adet keçi sütü hariç (S10) diğer inek, keçi ve manda sütlerinin toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı açısından ilgili yönetmeliğe uygun olmadığı belirlenmiştir. Ancak konu ile ilgili kesin bir değerlendirme yapabilmek için yönetmelikte belirtildiği şekliyle ayda en az “2 numune ile 2 aylık” verilerin (her bir süt numunesi için n=4) değerlendirilmesi gerektiği unutulmamalıdır.

Diğer taraftan Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalar İçin Özel Hijyen Kuralları Yönetmeliği’nde, “inek dışında diğer türlerden elde edilen çiğ süt herhangi bir ısıtma işlemi içermeyen süt ürünlerinin üretimi için” kullanılacaksa bu sütlerdeki 30°C’deki koloni sayısının sırasıyla ≤ 500.000 kob/mL (5,70 log kob/mL) olması gerektiği ifade edilmektedir. Çalışmamızda analiz edilen keçi sütleri ve manda sütü bu açıdan değerlendirildiğinde de yalnızca bir keçi sütü örneğinin (S10) ilgili gerekliliği sağladığı görülmüştür.

Tablo 4.1. Çiğ Süt Örneklerinde Mikroorganizma Sayıları (log kob/g)*

Numune Adı	Mezofilik Laktobasiller	Mezofilik Laktokoklar	Termofilik Laktobasiller	Termofilik Laktokoklar	Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri
S1	5,59	6,08	5,34	5,48	6,28
S2	4,77	5,75	-	5,14	6,11
S3	6,01	6,46	5,36	6,02	6,72
S4	5,14	4,38	4,51	5,11	5,21
S5	4,27	6,30	5,20	6,39	6,63
S6	6,39	6,91	5,66	6,74	6,97
S7	4,00	6,17	-	4,36	6,42
S8	6,94	7,38	5,97	7,83	7,52
S9	6,72	6,30	4,11	5,17	7,11
S10	6,47	4,53	3,14	5,50	5,67
S11	4,90	6,97	3,77	5,69	7,42
S12	3,84	5,90	-	3,87	6,34
S13	5,95	6,30	4,07	6,82	6,49
S14	5,39	5,47	2,47	4,69	5,69
S15	7,04	6,95	6,25	6,47	6,95
S16	3,30	5,43	-	3,14	6,11
S17	6,36	7,38	6,29	6,34	7,51
S18	7,11	7,46	6,30	6,14	7,63
S19	3,00	4,77	-	-	5,00
S20	5,63	6,77	5,07	6,38	6,84
S21	6,39	7,00	5,11	5,60	7,17
S22	5,30	7,04	4,43	7,32	6,44
S23	5,95	6,69	5,04	6,74	6,60
S24	5,17	6,49	3,30	4,43	6,60
Ortalama	5,48	6,28	4,32	4,95	6,44

*: Koyu renkli satırlar inek dışındaki hayvanlardan elde edilen sütleri göstermektedir. S24 numunesi manda sütü, diğer koyu renkli satırlardaki sütler (S5, S7-11) keçi sütüdür.

Araştırmamızda 30°C ve 43°C’de MRS agarda gelişen sırasıyla 51 ve 26, 30°C ve 43°C’de M17 agarda gelişen sırasıyla 56 ve 49 olmak üzere toplam 182 izolat elde edilmiştir. Çalışmamızda söz konusu izolatlardan mezofilik koşullarda (30°C) MRS agarda gelişen bakterilerin (mezofilik laktobasiller) kolesterol asimilasyonu özellikleri araştırılmıştır. Farklı çiğ süt örneklerinden elde edilen mezofilik koşullarda (30°C) MRS agarda gelişebilen toplam 51 izolat kolesterol asimilasyonu çalışmaları için aktifleştirilmiş, söz konusu izolatlardan aktifleşmesinde sorun yaşanmayan 35 izolatın kolesterol asimilasyon aktiviteleri 2 tekerrürlü olarak çalışılmıştır. Söz konusu izolatlardan toplam 13 izolat ile ileri tanımlama çalışmalarına devam edilmesi kararlaştırılmıştır. Farklı

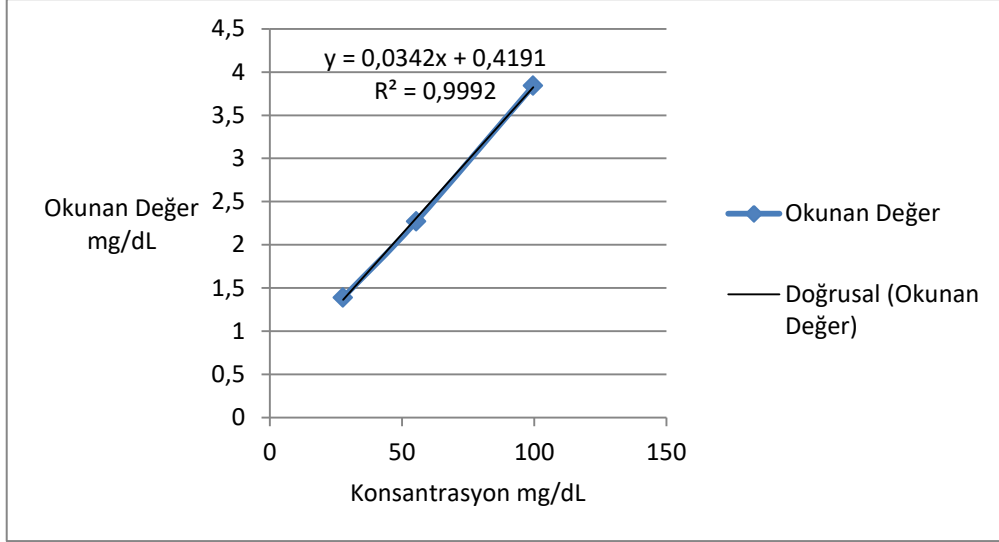
düzeylerde kolesterol asimilasyonu aktivitesine sahip izolatlardan ileri tanımlama için seçilenler Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2. Kolesterol asimilasyonu özelliği belirlenen ve ileri tanımlama için seçilen izolatların elde edildiği kaynak sütler ve izolatların kodları

Süt Örneği	Çiğ Süt Türü	İzolat Kodu
S2	İnek Sütü	2E
S3	İnek Sütü	3R
S4	İnek Sütü	4V
S5	Keçi Sütü	5C
S6	İnek Sütü	6B
S6	İnek Sütü	6C
S7	Keçi Sütü	7B
S10	Keçi Sütü	10A
S12	İnek Sütü	12F
S13	İnek Sütü	13A
S18	İnek Sütü	18A
S19	İnek Sütü	19A
S23	İnek Sütü	23A

4.2. Kolesterol Analizi Sonuçları

Araştırmamız kapsamında mezofilik koşullarda MRS agarda gelişebilen 13 adet bakteri izolatının % 0,3 safra tuzu ve % 2 kolesterol varlığında kolesterol asimilasyon kabiliyetleri belirlenmiştir. Kolesterol asimilasyon sonuçlarının hesaplanmasında kullanılan kalibrasyon grafiği ($R^2=0,999$) Şekil 4.1’de ve izolatların toplam kolesterol asimilasyon değerleri (%) Tablo 4.3’te verilmiştir.



Şekil 4.1. Kolesterol asimilasyon sonuçlarının hesaplanmasında kullanılan kalibrasyon grafiği

Tablo 4.3. Bakteri izolatlarının toplam kolesterol asimilasyon düzeyleri (%)*

İzolat Kodu	Bakteri İzolatları Tarafından Asimile Edilen Toplam Kolesterol (%)
12F	87,49
6C	82,17
3R	81,62
6B	81,06
5C	75,18
10A	65,16
2E	62,33
13A	61,50
23A	61,16
18A	60,15
4V	56,32
7B	52,06
19A	27,90
Ortalama	65,70

*: Koyu renkli satırlardaki izolatlar aktiveleştirilemedikleri veya kontaminasyon şüphesi nedeniyle ileri tanımlama çalışmalarında kullanılmamıştır.

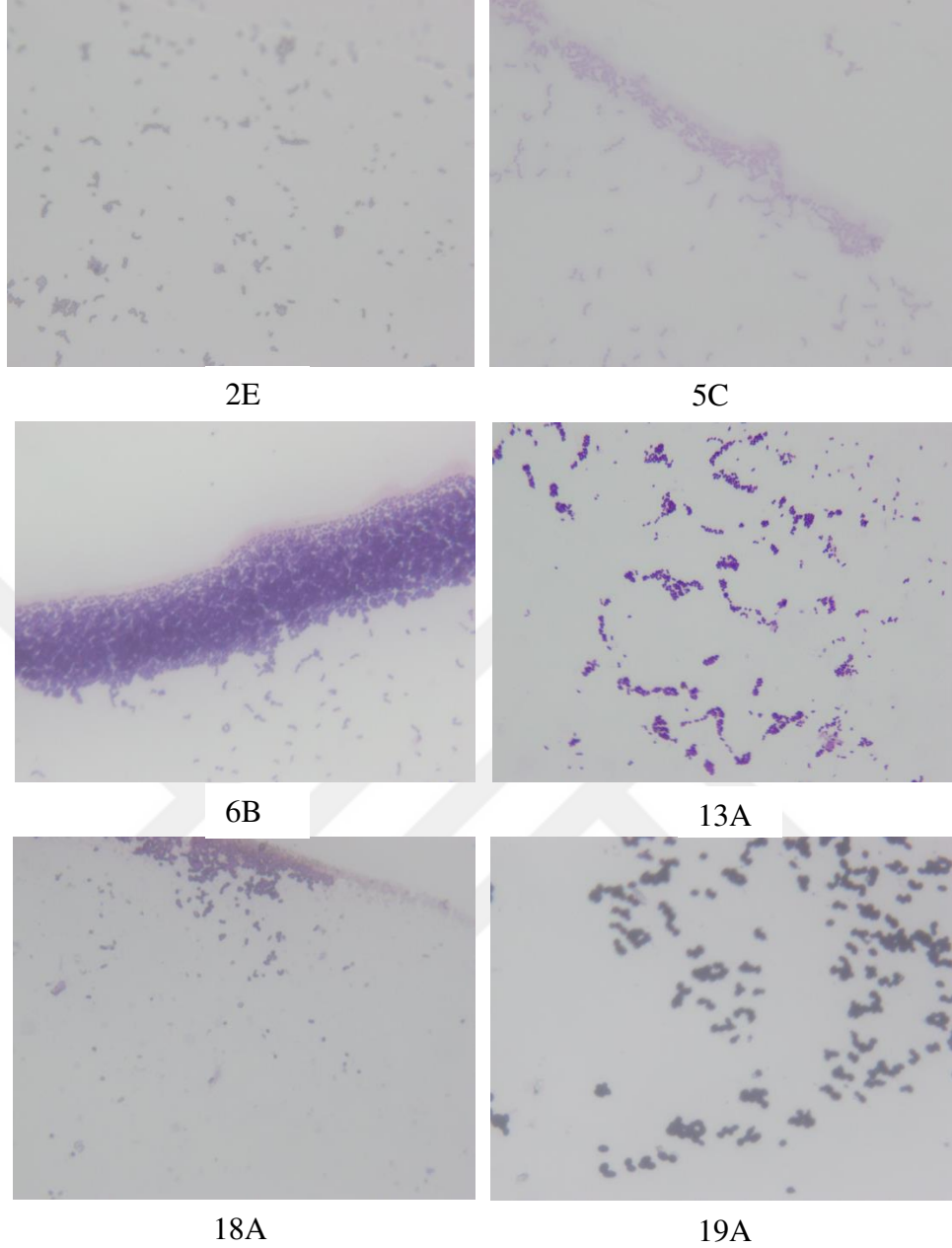
Tablo 4.3'ten de görüldüğü gibi 13 bakteri izolatının kolesterol asimilasyon değerleri %27,90 ile %87,49 arasında değişim göstermiş ve izolatların ortalama asimilasyon değerinin %65,70 olduğu tespit edilmiştir.

4.3. Gram Boyama Sonuçları

İzolatların Gram boyama sonuçlarını belirlemek amacıyla ön hazırlık aşamasında yapılan ekim sonucunda 7B ve 12F izolatları gelişim göstermemiş ve bu nedenle Gram boyama ve ileri tanımlama çalışmalarında kullanılmamışlardır. Gram boyama sonrasında ışık mikroskopunda incelenen görüntülere göre, 10 izolatın mavi-mor renkte, çubuk veya kok şeklinde olduğu gözlenmiştir. Bir izolatta (23A) ise mavi-mor ve pembe renklerinin bir arada olduğu görülmüş ve bu durum muhtemel bir kontaminasyon olarak değerlendirilmiş ve çalışma kapsamından çıkarılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 10 izolat Gram pozitif özellik göstermiştir (Tablo 4.4). İncelenen bazı izolatların mikroskop görüntüsü Şekil 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.4. İzolatların Gram boyama sonuçları

Örnek Kodu	Gram Boyama Sonucu
2E	Gram (+)
3R	Gram (+)
4V	Gram (+)
5C	Gram (+)
6B	Gram (+)
6C	Gram (+)
10A	Gram (+)
13A	Gram (+)
18A	Gram (+)
19A	Gram (+)
23A	Karışık



Şekil 4.2. Gram boyama sonrasında bazı izolatların ışık mikroskopunda görüntüsü (x100)

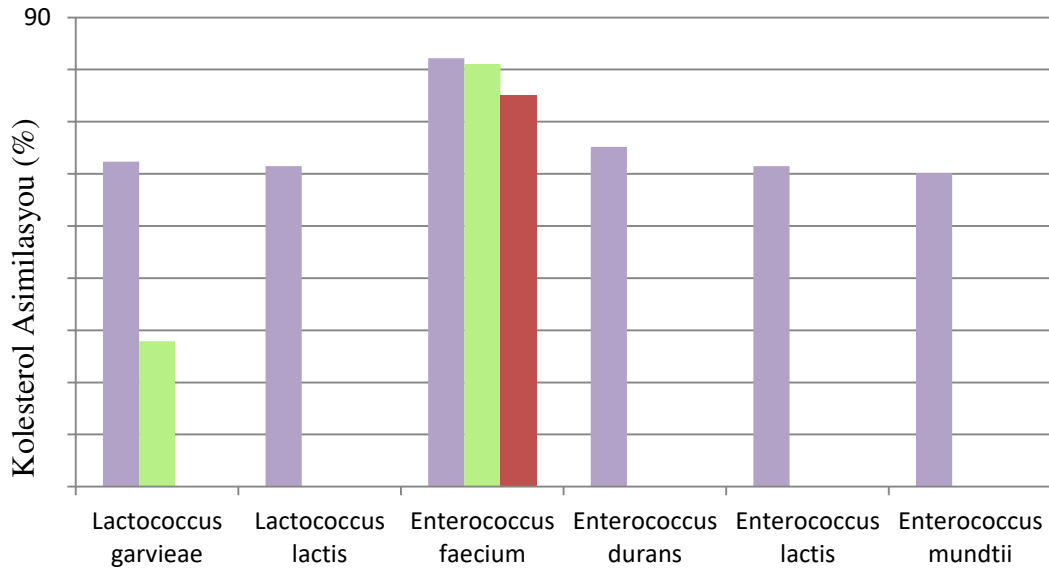
4.4. İzolatların Tanımlama Sonuçları

Çalışmamızda çiğ süttten izole edilen bakteri izolatlarından kolesterol asimilasyonu %27,90 ile %82,17 arasında değişen 9 adet izolatın tür düzeyinde tanımlamaları yapılmıştır. DNA dizi analizi yapılan 10 adet örnekten 3R kodlu izolatın tanımlaması yapılamamıştır. Tanımlaması yapılan laktik asit bakteri türlerinin *Enterococcus faecium* (3 izolat), *Lactococcus garvieae* (2 izolat), *Lactococcus lactis* (1 izolat), *Enterococcus durans* (1 izolat), *Enterococcus lactis* (1 izolat) ve *Enterococcus mundtii* (1 izolat) olduğu tespit

edilmiştir. Tanımlanan izolatların kodu, tanımlanan mikroorganizma, tanıma oranı ve ilgili türün toplam asimilasyon değeri Tablo 4.5'te ve Şekil 5.1'de verilmiştir.

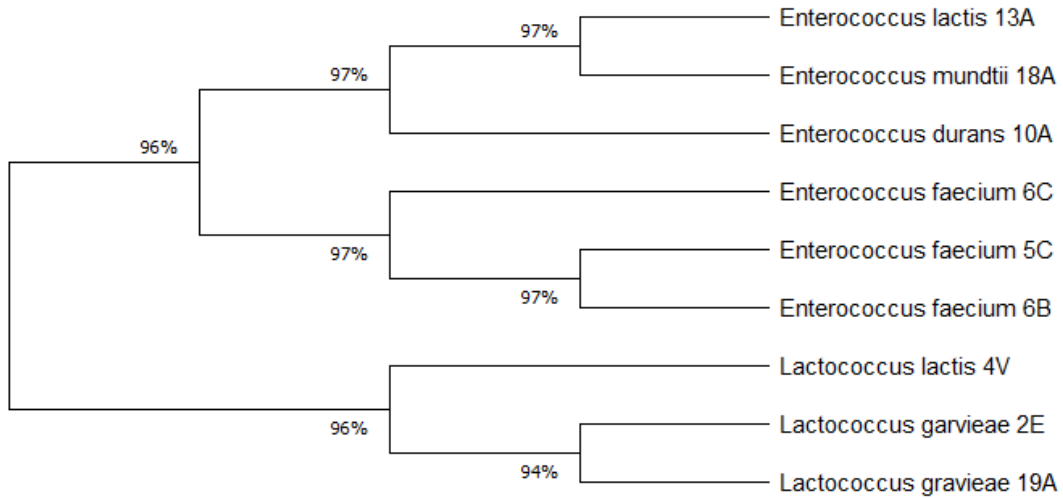
Tablo 4.5. Tür düzeyinde tanımlanan bakterilerin tanımlama oranları ve kolesterol asimilasyon değerleri

İzolat Kodu	Tanımlanan Mikroorganizma	Tanımlama Oranı (%)	Toplam Kolesterol Asimilasyonu (%)
6C	<i>Enterococcus faecium</i>	100	82,17
6B	<i>Enterococcus faecium</i>	99	81,06
5C	<i>Enterococcus faecium</i>	99	75,18
10A	<i>Enterococcus durans</i>	100	65,16
2E	<i>Lactococcus garvieae</i>	100	62,33
13A	<i>Enterococcus lactis</i>	99	61,50
18A	<i>Enterococcus mundtii</i>	100	60,15
4V	<i>Lactococcus lactis</i>	100	56,32
19A	<i>Lactococcus garvieae</i>	100	27,90



Şekil 4.3. Tanımlanan mikroorganizmaların tür içindeki kolesterol asimilasyon oranları

Türler arasındaki akrabalık ilişkisi hakkında fikir vermesi amacıyla filogenetik analiz yapılmaktadır (Yılmaz Sancar, 2017). Tanımlanan mikroorganizmalar arasındaki filogenetik ilişki filogeni ağacı çizilerek gösterilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.4. Tanımlanan mikroorganizmaların filogeni ağacı ve benzerlik oranları

Ziarno vd. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada MRS sıvı besi yeri ortamında seçilmiş bazı termofilik laktik asit bakterilerinin kolesterol asimilasyonu aktivitesi araştırılmıştır. Çalışmada yoğurt bakterileri *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'un asimile ettiği kolesterolün en fazla %27 olduğu, probiyotik kültür kombinasyonlarının (*Lactobacillus acidophilus* suşları ya da *Bifidobacterium* spp.) kolesterolü %18 ile 38 arasında değişen düzeylere asimile ettiği, tek kültür olarak çalışılan *Lactobacillus acidophilus*'un ise %49-55 düzeyinde kolesterol asimilasyonu aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir.

Iranmanesh vd. (2014) konu ile ilgili olarak yaptıkları bir araştırmada farklı süt ürünlerinden (koyun sütü, yoğurt ve ekşi yayık altı) izole edilen laktik asit bakterilerinin canlı ya da ölü formlarının kolesterol asimilasyon aktiviteleri 24 saatlik inkübasyonun 2, 4, 9 ve 24. saatlerinde *in vitro* koşullarda araştırmışlardır. Çalışma kapsamındaki 10 farklı canlı bakteri izolatının 24 saat sonundaki kolesterol asimilasyon değerlerinin ~%15-75 arasında değiştiği, inkübasyonun 2, 4 ve 24. saatlerinde en yüksek asimilasyon aktivitesi gösteren bakterinin *Lactobacillus brevis* olduğu (~%75) tespit edilmiştir. Aynı çalışmada ölü bakteri hücrelerinin de besi yerindeki hücre konsantrasyonlarına (7, 8 ve 9 kob/mL) bağlı olarak kolesterol asimilasyon aktivitesi gösterdiği besi yerindeki ölü hücre sayısı artışıyla kolesterol asimilasyonunun (%) arttığı rapor edilmiştir.

Alp (2018) tarafından yapılan çalışmada farklı illerden temin edilen gıda ve bitkilerden izole edilen potansiyel probiyotik olarak belirlenen 15 laktik asit bakterisinin kolesterol asimilasyonunun da içerisinde bulunduğu çeşitli özellikleri belirlenmiştir. Araştırmada, izole edilip tanımlanan laktik asit bakterilerinin toplam kolesterol

asimilasyon değerlerinin %16,71 ile %60,71 arasında değişim gösterdiği ve en yüksek kolesterol asimilasyon değerinin ekzopolisakkarit üreticisi olmayan *Leuconostoc lactis* DA268'da görüldüğü bildirilmiştir.

Akman (2009) tarafından yapılan bir çalışmada fermente et ve süt ürünlerinden izole edilen ve ülkemizdeki farklı bilimsel kuruluşların kültür koleksiyonlarından temin edilen toplam 35 bakteri türünden sindirim koşullarına en fazla direnç gösteren 3 bakterinin kolesterol asimilasyon aktiviteleri belirlenmiştir. Çalışma sonucunda *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecalis* ve *Lactobacillus rhamnosus* bakterilerinin *in vitro* kolesterol asimilasyonu değerlerinin sırasıyla %97,9, %78,10 ve %82,30 olduğu tespit edilmiştir.

Burhan vd. (2017) taze peynir benzeri bir ürün olan dangke ve sığır etinden izole ettikleri toplam 8 *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus acidophilus* suşu içerisinde *L. fermentum* B111K ve *L. plantarum* IIA-1A5 suşlarının sırasıyla %4,10 ve %8,10 oranlarında kolesterol asimilasyonu aktivitesine sahip olduğunu belirlemişlerdir.

Shehata vd. (2019)'nin yaptıkları çalışmada *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tarafından asimile edilen maksimum kolesterol oranları çoğalan hücreler için %43,70, dinlenme/durağan fazındaki hücreler için %12,93 ve ölü hücreler için ise %6,35 olarak bulunmuştur.

Konu ile ilgili olarak yapılan başka bir çalışmada (Kimoto vd., 2002) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* türüne ait 3 suş (527, G50 ve H48) ile *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* türüne ait 4 suş (N7, ATCC 13675, DRC1-F ve 8W) olmak üzere 7 farklı laktokokun besi yeri ortamında çoğalmaları esnasındaki besi yerindeki kolesterolü uzaklaştırabilme kabiliyetleri incelenmiştir. Sonuç olarak çalışılan laktokokların kolesterol asimilasyon düzeylerinin %31,0 (*L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* ATCC 13675) ile %97 (*L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* N7) arasında olduğu ifade edilmiştir.

Tafi peynirinden izole edilen 9 farklı *Enterococcus faecium* izolatu ile yapılan bir çalışmada, test edilen suşların çoğunun %0,3 oranında safra tuzuna dirençli olduğu ve izolatların kolesterol asimilasyon değerlerinin %12 ile %56 değerleri arasında değiştiği gözlemlenmiştir (Taranto vd., 1996).

Yapılan bir başka çalışmada (Albano vd., 2018), geleneksel İtalyan peynirlerinden izole edilen 58 laktik asit bakterisinin *in vitro* ortamda sindirim sisteminde hayatta potansiyeli ve safra asitleri içeren ortamda kolesterolü asimile etme yetenekleri incelenmiştir. Çalışma sonucunda et suyu ortamında en iyi performans gösteren suşların

Lactobacillus casei VC199, *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* SE160 ve VC213, *Lactobacillus plantarum* VS166 ve VS513, *Enterococcus faecium* VC223 ve *Enterococcus lactis* BT161 olduğu ve suşların kolesterol asimilasyon değerlerinin %42 ile %55 arasında değişkenlik gösterdiği görülmüştür.

Nuhva vd. (2019), 8 farklı tür çiçekten (*Gardenia jasminoides*, *Hibiscus syriacus*, *Ixora lucida*, *Solanum torvum*, *Wrightia religiosa*, *Leucaena leucocephala*, *Jatropha podagrica* ve *Tabernaemontana divaricata*) izole edilen *Enterococcus durans*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus lactis* ve *Lactobacillus plantarum* türlerinden oluşan 16 adet laktik asit bakterisinin kolesterol asimilasyon aktivitesinin %9,57 ile %51,69 arasında değiştiğini tespit etmiştir. Çalışmada en yüksek kolesterol asimilasyon aktivitesi %51,69 oranıyla *Enterococcus lactis*'de belirlenmiştir.

Moğolistan'da geleneksel olarak üretilen fermente edilmiş kremadan izole edilen *Enterococcus* suşlarının probiyotik özellikleri incelenmiş ve yüksek kolesterol asimilasyonu kabiliyeti gösteren *Enterococcus durans* (KLDS 6.0930 ve KLDs 6.0933) ve *Enterococcus faecalis* (KLDS 6.0934 ve KLDs 6.0935) suşları ileri değerlendirilmeye alınmıştır. *Enterococcus durans* KLDs 6.0930 suşunun diğer suşlara oranla ortamdaki kolesterol gideriminin daha fazla olduğu bulunmuştur. KLDs 6.0930, 6.0933, 6.0934 ve 6.0935 suşlarının, süpernatantlardan sırasıyla %56.61, %46.99, %41.29 ve %52.01 kolesterol kaybına neden olduğu belirtilmiştir (Guo vd., 2016).

Sirichotinun vd. (2018) tarafından 1-3 günlük sağlıklı bebeklerin dışkılarından izole edilen laktik asit bakterilerinin kolesterol düşürücü etkileri incelenmiş ve 100 izolattan yüksek kolesterol asimilasyonu aktivitesi gösteren 7 adeti seçilmiştir. Seçilen izolatlardan *Enterococcus faecium* CGMCC 12136T, *Enterococcus durans* CECT 411T, *Lactococcus garvieae* ATCC 12136T, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433T suşlarından oluşan 6 adet bakterinin %20'nin üzerinde kolesterol asimilasyon aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir.

Literatürde *Enterococcus mundtii* türünün kolesterol asimile etme yeteneğinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak yapılan farklı çalışmalarda bu türün probiyotik olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür. *Lactobacillus plantarum* 15HN ve *Enterococcus mundtii* 50H suşlarının probiyotik değerlendirilmesi yapılan bir çalışmada, insan Caco-2 hücrelerine yapışmaları, düşük pH/yüksek safra tuzlarına dirençleri, patojenlere karşı inhibe edici özellikleri ve antibiyotiğe duyarlılıkları test edilmiştir. Sonuçların ortalama değerlerin üzerinde olduğu ve bu iki suşun gıda endüstrisinde kullanılabilecek aday probiyotikler olarak tanıtılabileceği bildirilmiştir (Hangshenas vd., 2016).

Yapılan bir başka çalışmada (Sakandar vd., 2018) 19 bakteri ve 3 maya izolatu ile mikroorganizmaların glüten parçalayıcı özellikleri araştırılmış ve *Enterococcus mundtii* en yüksek glüten parçalama yeteneği göstermiştir. Sonuç olarak, *Enterococcus mundtii*, glüten parçalayan diğ er suşlara kıyasla düşük pH direnci, safra tuzu özellikleri ve hidrofobikliği tolere etme yeteneği gösterdiği ve probiyotik olarak kullanılma potansiyeli olduğu belirtilmiştir.

Çalışmamızda *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus lactis*, *Enterococcus durans* ve *Lactococcus garvieae* türü bakterilerin kolesterol asimilasyonu değ erlerinin literatürdeki bazı çalışmalardan düşük (Kimoto vd. 2002) ve bazı çalışmalardan ise yüksek (Guo vd., 2016; Sirichotinun vd. 2018; Shehate vd., 2019) olduğu görölmektedir.



5. SONUÇ

Bu çalışmada Burdur il merkezi, Bucak ilçesi ve köylerinden toplanan 24 adet çiğ süt örneğinden izole edilen laktik asit bakterilerinin kolesterol asimilasyonu özellikleri incelenmiştir. İzole edilen laktik asit bakterilerinden 9 adedi 16s rRNA dizi analizi sonuçlarına göre tanımlanmıştır. Safra tuzu varlığında (%0,3) laktik asit bakterilerinin kolesterol asimilasyon değerleri %27,90 ile %82,17 arasında farklılık göstermiştir. *Lactococcus lactis*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus lactis*, *Enterococcus mundtii* türlerinin kolesterol asimilasyon değerleri sırasıyla %56,32, %65,16, %61,50 ve %60,15 olarak bulunmuştur. *Lactococcus garvieae* türü izolatların (n=2) kolesterol asimilasyon değeri %27,90 ve %62,33, *Enterococcus faecium* türü izolatların (n=3) kolesterol asimilasyon değerleri ise %75,18, %81,06 ve %82,17 olarak belirlenmiştir.

Laktik asit bakterilerinin kolesterol asimilasyon değerlerinin suşa bağlı değişimler gösterdiği bu çalışmada da doğrulanmıştır. Çalışmamızda incelenen laktik asit bakterilerinin potansiyel kolesterol düşürücü etkilerinin olması bu bakterilerin endüstriyel uygulamalar için umut vaat ettiğini göstermektedir. Tanımlanan bakteriler içerisinde özellikle en yüksek kolesterol asimilasyon oranına sahip *Enterococcus faecium* (%82,17) başta olmak üzere, *Enterococcus durans* (%65,16), *Enterococcus lactis* (%61,50) ve *Lactococcus lactis* (%56,32)'in diğer probiyotik özelliklerinin değerlendirilmesi önerilmektedir.

Literatürde *Lactococcus garvieae* türünün laktokokkozis adlı enfeksiyona neden olan balık patojeni olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (Vendrell vd., 2006; Dolgun, 2015; Önal ve Yavuz, 2019). Bu sebeple söz konusu bakterinin kolesterol asimilasyonu amacıyla kullanımının uygun olmayabileceği ancak bu alanda çeşitli çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Çalışmamızda %60,15 oranında kolesterolü asimile ettiği belirlenen *Enterococcus mundtii* türünün kolesterol asimilasyon özelliğinin araştırıldığı başka bir çalışmaya rastlanılmamasına rağmen literatürde bu türün potansiyel bir probiyotik bakteri olabileceğine dair araştırmalar bulunmaktadır. Ancak Higashide vd. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, *Enterococcus mundtii*'nin gözde görme bozukluğu oluşturan endoftalmi hastalığına sebep olduğu ve bulaşıcı insan patojeni olarak tanımlandığı bildirilmiştir. Ancak konu ile ilgili suş düzeyinde daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç bulunduğu değerlendirilmektedir.

Çalışmamız kapsamında tanımlanan ve farklı oranlarda kolesterol asimilasyon özelliği olduğu belirlenen *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus lactis* türlerinin kolesterol asimile etme yetenekleri ile gelecek vaat ettiği düşünülmektedir.

Bundan sonraki yapılacak olan çalışmalarda;

- kolesterol asimilasyonu aktivitesi belirlenen türlerin probiyotik bakterilerin sağlaması gereken diğer özellikleri gösterip göstermediğinin belirlenmesi,
- *in vitro* ortamda belirlenen kolesterol düşürücü etkilerin *in vivo* koşullarda da test edilmesi,
- potansiyel probiyotik türlerin probiyotik gıdaların üretiminde kullanımının araştırılması önerilmektedir.



KAYNAKLAR

- Akman, E., 2009. Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.
- Aktimur, S.H., 2011. Pre, Pro ve Simbiyotiklerin Kolesterolde Zengin Gıda İle Beslenmiş Ratlarda Serum Kolesterol Düzeylerine Etkileri, Uzmanlık Tezi. Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi İç Hastalıkları Kliniği, Ankara, Türkiye.
- Albano, C., Morandi, S., Silvetti, T., Casiraghi, M.C., Manini, F., Brasca, M., 2018. Lactic acid bacteria with cholesterol-lowering properties for dairy applications: *In vitro* and *in situ* activity. *Journal of Dairy Science*, 101(12), 10807-10818.
- Albuquerque, T.G., Oliveira, M.B.P., Sanches-Silva, A., Costa, H.S., 2016. Cholesterol determination in foods: Comparison between high performance and ultra-high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 193, 18-25.
- Alp, D., 2018. Doğal Kaynaklardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması ve *in vitro* Bağırsak Modelinde Patojenlerin Tutunmasını Engelleme Özelliklerinin Belirlenmesi, Doktora Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, Türkiye.
- Axelsson, L., 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, Second Edition, Salminen, S., von Wright, A. (Editors), Marcel Dekker Inc., New York, USA, 1-72.
- Baysal, A., 2006. Beslenme, lipoproteinler ve koroner kalp hastalığı. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 34(1), 5-9.
- Barter, P.J., Brewer Jr, H.B., Chapman, M.J., Hennekens, C.H., Rader, D.J., Tall, A.R., 2003. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(2), 160-167.
- Begley, M., Hill, C., Gahan, C.G., 2006. Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1729-1738.
- Beitz, D.C., 1995. Administration of cholesterol reductase to humans. United States Patent. Patent Number: 5,436,004, USA
- Bostancı, B., 2019. Süt ve Süt Ürünlerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Moleküler İdentifikasyonu, Yüksek Lisans Tezi. Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar, Türkiye.
- Brown, M., Goldstein, J., 1984. How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. *Scientific American*, 251(5), 58-69.

- Bruckert, E., Rosenbaum, D., 2011. Lowering LDL-cholesterol through diet: potential role in the statin era. *Current Opinion in Lipidology*, 22(1), 43-48.
- Burhan, H., Priyambada, S.A., Taufik, E., Arief, I.I., 2017. Potential of lactic acid bacteria isolated from dangke and Indonesian beef as hypocholesterolaemic agent. *Media Peternakan*, 40(2), 136-142.
- Caplice, E., Fitzgerald, G.F., 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1-2), 131-149.
- Chen, Z.Y., Ma, K.Y., Liang, Y., Peng, C., Zuo, Y., 2011. Role and classification of cholesterol-lowering functional foods. *Journal of Functional Foods*, 3(2), 61-69.
- Çelebi, Ş., Karaca, H., 2006. Yumurtanın besin değeri, kolesterol içeriği ve yumurtayı n-3 yağ asitleri bakımından zenginleştirmeye yönelik çalışmalar. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 37(2), 257-265.
- Çil, M.M., Açıkgöz, Z., 2016. Etlik piliçlerin beslenmesinde taurin amino asidinin kullanım olanakları. *Hayvansal Üretim*, 57(1), 22-27.
- Demirci, M., Gölbaş, M., Başoğlu, F., 1996. Gıdalardan kolesterol azaltılabilir mi? *Gıda*, 21(3), 149-152.
- Dinçer, E., Kıvanç, M., Karaca, H., 2009. Biyokoruyucu olarak laktik asit bakterileri ve bakteriyosinler. *Gıda*, 35(1), 1-8.
- Dolgun, O., 2015. Gökkuşuğu Alabalıklarından *Lactococcus garvieae* İdentifikasyonu ve Antibiyotiklere Duyarlılıklarının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye.
- Durak, Y., Keleş, F., Uysal, A., Aladağ, M.O., 2008. Konya yöresi taze ev yapımı yoğurtların mikrobiyolojik özelliklerinin araştırılması. *Selçuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, 22(44), 113-117.
- El-Beksh, A.E., Abou-Aly, H.E., Zaghloul, R.E., El-Meihy, R.M., 2021. Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria as probiotic, 5th International Conference on Biotechnology Applications in Agriculture (ICBAA), Egypt, 311-322.
- Ertaş, B., 2017. Taç Eter Bağlı Kolesterol Bileşiklerinin Sentezi, Yüksek Lisans Tezi. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, Türkiye.
- Gazel, N., 2016. Ditiylenopirrol Tip İletken Polimerleri Kullanarak Özgün Kolesterol Biyosensörlerin Yapımı, Yüksek Lisans Tezi. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, Türkiye.
- Gérard, P., Lepercq, P., Leclerc, M., Gavini, F., Raibaud, P., Juste, C., 2007. *Bacteroides* sp. strain D8, the first cholesterol-reducing bacterium isolated from human feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(18), 5742-5749.

- Gilliland, S.E., 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 7(1-2), 175-188.
- Gilliland, S.E., Nelson, C.R., Maxwell C., 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(2), 377-381.
- Golay, A., Ferrara, J.M., Felber, J.P., Schneider, H., 1990. Cholesterol lowering effect of skim milk from immunized cows in hypercholesterolemic patients. *American Journal of Clinical Nutrition*, 52(6):1014-9.
- Guo, L., Li, T., Tang, Y., Yang, L., Huo, G., 2016. Probiotic properties of *Enterococcus* strains isolated from traditional naturally fermented cream in China. *Microbial Biotechnology*, 9(6), 737-745.
- Gürsoy, O., Kınık, Ö., 2006. Probiyotik bakterilerin klinik uygulamalarında yeni gelişmeler-II. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 43(1), 189-196.
- Gürsoy, O., Özel, S., Özbaş, H., Çon, H.A., 2011. Kolesterol seviyesinin *in vitro* ve *in vivo* koşullarda düşürülmesinde probiyotik mikroorganizmaların etkisi. *Akademik Gıda*, 9(3), 37-45.
- Güven, S., Demirel Zorba, N.N., 2018. *Genel Mikrobiyoloji ve Laboratuvar Kılavuzu*, Dokuzuncu Baskı. Nobel Akademik Yayıncılık, Ankara, 238s.
- Haghshenas, B., Haghshenas, M., Nami, Y., Khosroushahi, A.Y., Abdullah, N., Barzegari, A., Rosli, R., Hejazi, M.S., 2016. Probiotic assessment of *Lactobacillus plantarum* 15HN and *Enterococcus mundtii* 50H isolated from traditional dairies microbiota. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 6(1), 37-47.
- Hansen, E.B., 2002. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1-2), 119-131.
- Hara, H., Haga, S., Aoyama, Y., Kiriya, S., 1999. Short-chain fatty acids suppress cholesterol synthesis in rat liver and intestine. *The Journal of Nutrition*, 129(5), 942-948.
- Hazır Dalca, S., 2015. Denizli ilinden toplanan çiğ süt ve peynirlerden otolitik laktik asit bakterilerinin izolasyonu, tanımlanması ve otolitik özelliklerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi. Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, Türkiye.
- Higashide, T., Takahashi, M., Kobayashi, A., Ohkubo, S., Sakurai, M., Shirao, Y., Tamura, T., Sugiyama, K., 2005. Endophthalmitis caused by *Enterococcus mundtii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3), 1475-1476.
- Iranmanesh, M., Ezzatpanah, H., Mojgani, N., 2014. Antibacterial activity and cholesterol assimilation of lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian dairy products. *LWT-Food Science and Technology*, 58(2), 355-359.

- İnanç, N., Şahin, H., Çiçek, B., 2005. Probiyotik ve prebiyotiklerin sağlık üzerine etkileri. *Erciyes Tıp Dergisi*, 27(3), 122-127.
- İşleroğlu, H., Yıldırım, Z., Yıldırım, M., 2008. Yöresel peynirden antimikrobiyal aktiviteye sahip laktik asit bakterisinin izolasyonu ve tanısı. *GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 25(1), 1-6.
- Kadiroğlu, P., Ekici, H., 2018. Yeşil ceviz kabuklarının biyoaktif özelliklerinin FT-IR spektroskopisi yöntemiyle tahmin edilmesi. *Akademik Gıda*, 16(1), 20-26.
- Kim, Y., Yoon, S., Shin, H., Jo, M., Lee, S., Kim, S.H., 2021. Isolation of the cholesterol-assimilating strain *Pediococcus acidilactici* LRCC5307 and production of low-cholesterol butter. *Food Science of Animal Resources*, 41(2), 300.
- Kimoto, H., Ohmomo, S., Okamoto, T., 2002. Cholesterol removal from media by Lactococci. *Journal of Dairy Science*, 85(12), 3182-3188.
- Klaver, F.A., Van der Meer, R., 1993. The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4), 1120-1124.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G., 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 41(2), 103-125.
- Kong, Y., Li, M., Li, R., Shan, X., Wang, G., 2020. Evaluation of cholesterol lowering property and antibacterial activity of two potential lactic acid bacteria isolated from the intestine of snakehead fish (*Channa argus*). *Aquaculture Reports*, 17, 100342.
- Kotancılar, G., Çelik, İ., Ertugay, Z., 1995. Ekmeğin besin değeri ve beslenmedeki yeri. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 26(3), 431-441.
- Kuerman, M., Bao, Y., Guo, M., Jiang, S., 2021. Safety assessment of two strains and anti-obese effects on mice fed a high-cholesterol diet. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 572, 131-137.
- Küçükkaya, B., 2008. Hiperlipidemik Hastalarda Ezetemib Monoterapisinin Lipid Profili İle Enflamatuvar Belirteçlerin Üzerindeki Etkileri, Uzmanlık Tezi. İstanbul Fatih Sultan Mehmet Eğitim ve Araştırma Hastanesi İç Hastalıkları Kliniği, İstanbul, Türkiye.
- Lee, D.K., Jang, S., Baek, E.H., Kim, M.J., Lee, K.S., Shin, H.S., Chung, M.J., Kim, J.E., Lee, K.O., Ha, N.J., 2009. Lactic acid bacteria affect serum cholesterol levels, harmful fecal enzyme activity, and fecal water content. *Lipids in Health Disease*, 8(1), 21-28.
- Lee, J., Kim, Y., Yun, H.S., Kim, J.G., Oh, S., Kim, S.H., 2010. Genetic and proteomic analysis of factors affecting serum cholesterol reduction by *Lactobacillus acidophilus* A4. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(14), 4829-4835.

- Leroy, F., De Vuyst, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78.
- Li, L., Batt, S.M., Wannemuehler, M., Dispirito, A., Beitz, D.C., 1998. Effect of feeding of a cholesterol-reducing bacterium, *Eubacterium coprostanoligenes*, to germ-free mice. *Comparative Medicine*, 48(3), 253-255.
- Limsowtin, G.K.Y., Broome, M.C., Powell, I.B., 2003. Lactic acid bacteria, taxonomy. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 3, 1470-1478.
- Liong, M.T., Shah, N.P., 2005. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of Lactobacilli strains. *Journal of Dairy Science*, 88(1), 55-66.
- Lye, H.S., Rusul G., Liong, M.T., 2010. Removal of cholesterol by Lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol. *Journal of Dairy Science*, 93, 1383-1392.
- Ma, H., 2004. Cholesterol and human health. *Nature and Science*, 2(4), 17-21.
- Mayes, P.A., Botham, K.M., 2003. Cholesterol Synthesis, Transport and Excretion. In: *Harper's Illustrated Biochemistry*, Twenty-Six Edition, Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. (Editors). McGraw-Hill Companies Inc., USA, 219-230.
- Noh, D.O., Kim, S.H., Gilliland, S.E., 1997. Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *Journal of Dairy Science*, 80(12), 3107-3113.
- Nuhwa, R., Tanasupawat, S., Taweechotipatr, M., Sitdhipol, J., Savarajara, A., 2019. Bile salt hydrolase activity and cholesterol assimilation of lactic acid bacteria isolated from flowers. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 9(06), 106-110.
- Ooi, L.G., Liong, M.T., 2010. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of *in vivo* and *in vitro* findings. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(6), 2499-2522.
- Önalan, Ş., Yavuz, H.İ., 2019. Nanopartikül içerikli sıvı besiyerlerinde *Lactococcus garvieae* izolatlarının gelişim farklılıklarının spektrofotometrik olarak belirlenmesi. *Menba Kastamonu Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 5(1), 6-15.
- Öngün Yılmaz, H., 2018. Hiperlipidemi ve beslenme. *Türkiye Sağlık Bilimleri ve Araştırmaları Dergisi*, 1(2), 72-82.
- Önür, N.D., Beyler, A.R., 2001. Safra asitleri metabolizması. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 54(1), 65-76.
- Özcan, A., 2007. Biyomoleküller İçin Molekül Baskılanmış Polimerik Yapay Reseptör Geliştirilmesi ve Biyokromatografi Uygulamaları, Doktora Tezi. Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye.

- Parada, J.L., Caron, C.R., Medeiros, A.B.P., Soccol, C.R., 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(3), 512-542.
- Pereira, D.I.A., McCartney, A.L., 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.
- Razin, S., 1975. Cholesterol incorporation into bacterial membranes. *Journal of Dairy Science*, 124(1), 570-572.
- Romano, N., Kumar, V., Yang, G., Kajbaf, K., Rubio, M.B., Overturf, K., Hardy, R., 2020. Bile acid metabolism in fish: Disturbances caused by fishmeal alternatives and some mitigating effects from dietary bile inclusions. *Reviews in Aquaculture*, 12(3), 1792-1817.
- Saini, R., Saini, S., Sharma, S., 2010. Potential of probiotics in controlling cardiovascular diseases. *Journal of Cardiovascular Disease Research*, 1(4), 213-214.
- Sakandar, H.A., Usman, K., Imran, M., 2018. Isolation and characterization of gluten-degrading *Enterococcus mundtii* and *Wickerhamomyces anomalus*, potential probiotic strains from indigenously fermented sourdough (Khamir). *LWT*, 91, 271-277.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.C., Cummings, J.H., Franck, A., Gibson, G.R., Isolauri, E., Moreau, M.C., Roberfroid, M., Rowland, I., 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*, 80 (S1), 147-171.
- Sarzynski, M.A., Ruiz-Ramie, J.J., Barber, J.L., Slentz, C.A., Apolzan, J.W., McGarrah, R.W., Harris, M.N., Church, T.S., Borja, M.S., He, Y., Oda, M.N., Martin, C.K., Kraus, W.E., Rohatgi, A., 2018. Effects of increasing exercise intensity and dose on multiple measures of HDL (high-density lipoprotein) function. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 38(4), 943-952.
- Shehata, M.G., El-Sahn, M.A., El Sohaimy, S.A., Youssef, M.M., 2019. *In vitro* assessment of hypocholesterolemic activity of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 1-10.
- Sirichotinun, N., Pachekrepapol, U., Nantavisai, K., Taweechotipatr, M., Nilwarangkoon, S., 2018. Probiotic characterization and *in vitro* cholesterol lowering effects of lactic acid bacteria isolated from Thai healthy infants. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 8-25.
- Sridevi, N., Vishwe, P., Prabhune, A., 2009. Hypocholesteremic effect of bile salt hydrolase from *Lactobacillus buncheri* ATCC 4005. *Food Research International*, 42(4), 516-520.

- Stiles, M.E., Holzapfel, W.H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1-29.
- T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, 2019. *Türkiye’de kalp ve damar hastalıkları*, https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kronik-hastaliklar-engellidb/hastaliklar/kalpvedamar/bilgi_notu/Turkiyede_Kalp_ve_damar_hastaliklari_Bilgi_Notu_21.06.2019.docx (13.07.2021).
- Taranto, M.P., Gonzalez de Llano, D., Rodriguez, A., Pesce de Ruiz Holgado, A., Font de Valdez, G., 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.
- TGK, 2011. *Hayvansal Gıdalar İçin Özel Hijyen Kuralları Yönetmeliği*, Türk Gıda Kodeksi, <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111227-10.htm> (01.08.2021).
- TKD, 2002. *Koroner kalp hastalığı: korunma ve tedavi kılavuzu*, Türk Kardiyoloji Derneği, <https://tkd.org.tr/kilavuz/k11/4e423.htm?wbnum=1604> (01.08.2021).
- Toth, P.P., 2005. The “good cholesterol” high-density lipoprotein. *Circulation*, 111(5), 89-91.
- Vendrell, D., Balcázar, J.L., Ruiz-Zarzuela, I., De Blas, I., Gironés, O., Múzquiz, J.L., 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 29(4), 177-198.
- WHO, 2021. *Cardiovascular disease*, World Health Organization, [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) (01.08.2021).
- Widodo, W., Fanani, T.H., Fahreza, M.I., Sukarno, A.S., 2021. Cholesterol assimilation of two probiotic strains of *Lactobacillus casei* used as dairy starter cultures. *Applied Food Biotechnology*, 8(2), 103-112.
- Wu, C., Lin, X., Tong, L., Dai, C., Lv, H., Zhou, X., Zhang, J., 2021. In vitro evaluation of lactic acid bacteria with probiotic activity isolated from local pickled leaf mustard from Wuwei in Anhui as substitutes for chemical synthetic additives. *Open Chemistry*, 19(1), 755-771.
- Yavuz, O., 2017. Burdur Gölü’nden İzole Edilen Mikroorganizmaların Ağır Metal ve Antibiyotik Dirençliliğinin Kültürel ve Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi. Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Burdur, Türkiye.
- Yılmaz Sancar, P., 2017. Türkiye’de Yetişen *Anthriscus pers.*(Apiaceae) Türlerinin Genetik Yapısının ve Filogenetik Akrabalık İlişkilerinin Kloroplast Genomunun Kodlanmayan "trn" Bölgelerine Göre Araştırılması, Doktora Tezi. Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ, Türkiye.

- Yüksekdağ, Z.N., Beyatlı, Y., 2009. Bazı laktik asit bakterilerinin fizyolojik, biyokimyasal, plazmit DNA ve protein profil özelliklerinin incelenmesi. *Gıda*, 34(2), 91-98.
- Zengin, H., 2012. Ateroskleroz patogenezi. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 29(3s), 101-106.
- Zhu, W.M., Liu, W., Wu, D.Q., 2000. Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* KT7. *Journal of Applied Microbiology*, 88(5), 877-886.
- Ziarno, M., Şekul, E., Lafraya, A.A., 2007. Cholesterol assimilation by commercial yoghurt starter cultures. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 6(1), 83-94.

