



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM
DALI**

**POTANSİYEL PROBİYOTİK *ENTEROCOCCUS* CİNSİ
BAKTERİLERİN KOLESTEROL GİDERİM MEKANİZMALARI
VE *bsh* GEN ANALİZLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Orhan ÇETİN

DANIŞMAN

Prof. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ

AKSARAY, 2021



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM
DALI**

**POTANSİYEL PROBİYOTİK *ENTEROCOCCUS* CİNSİ
BAKTERİLERİN KOLESTEROL GİDERİM MEKANİZMALARI
VE *bsh* GEN ANALİZLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Orhan ÇETİN

DANIŞMAN

Prof. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ

AKSARAY, 2021

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, akademik kurallara ve bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu, çalışmamda kullandığım verilerin orijinallliğini ve her türlü intihalden uzak olduğunu beyan ederim.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

İmza

Orhan ÇETİN

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi ve gerek deney aşamasında gerekse tez yazımı aşamasında bilgi, tecrübe ve anlayışlarıyla akademik alanda bana daima yol gösteren ve destek olan, kendimi geliştirmemde büyük katkıları olan danışmanım Prof. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ'a ve önemli deneyimleri ile her zaman yardımcı olan Dr. Gülgez Gökçe YILDIZ'a teşekkür ederim. Çalışmalarımı yapmama olanak sağlayan Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne (ASÜBTAM) ve yöneticilerine teşekkür ederim.

Çalışmamın gerçekleştirilmesinde yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Orhan ORUÇ, Abdulkadir DİKİCİ, Abdulkerim KOCAOĞLU, Ergun ERGÜL, Zeynel GERÇEKER'e ve desteklerini benden esirgemeyen anneme, babama ve kardeşime teşekkür ederim.

Bu çalışma, Aksaray Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından 2018/020 kodlu araştırma projesi ile desteklenmiştir.

Orhan ÇETİN
AKSARAY, 2021

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1 Probiyotikler	3
2.1.1 Probiyotik seçim kriterleri	3
2.1.2 Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığı üzerine etkileri.....	4
2.1.3 Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar	4
2.2 Prebiyotikler	5
2.3 Simbiyotik.....	6
2.4 Enterokoklar	6
2.4.1 <i>Enterococcus</i> cinsi bakterilerin genel özellikleri	7
2.4.2 <i>Enterococcus</i> cinsi bakterilerin probiyotik özellikleri	7
2.5 Kolesterol.....	8
2.5.1 Kolesterol metabolizması.....	8
2.5.2 Kandaki kolesterol seviyesinin önemi	9
2.5.3 Kolesterol dengesinde safra asitlerinin rolü	10
2.5.4 Safra asitleri ve safra tuzları.....	10
2.5.5 Enterohepatik dolaşım.....	11
2.5.6 Probiyotiklerin kolesterol konsantrasyonunu düşürmesini sağlayan olası mekanizmalar	11
2.5.6.1 Kolesterolün asimilasyonu	12
2.5.6.2 Safra tuzlarının dekonjugasyonu	12
2.6 Ekzopolisakkarit (EPS) ve Probiyotik Önemi	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM	16
3.1 Materyal.....	16
3.1.1 Çalışmalarda kullanılan besiyerleri.....	16
3.1.2 Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları.....	18
3.1.3 Çalışmada kullanılan bakteri kültürleri.....	18
3.1.4 Primerler.....	19
3.2 Yöntem	20
3.2.1 Bakteri kültürlerinin muhafazası.....	20
3.2.2 Bakteri kültürlerinin hazırlanması	20
3.2.3 Glikolik asit (GCA) ve taurokolik asit (TCA) safra tuzlarının dekonjugasyonu	20
3.2.4 Kolesterol ile dekonjuge safranin presipitasyonu.....	21
3.2.5 Prebiyotiğin (inülin), safra tuzlarının dekonjugasyonu ve kolesterol presipitasyonu üzerindeki etkisinin belirlenmesi.....	23
3.2.6 Ekzopolisakkarit (EPS) üretiminin, safra tuzlarının dekonjugasyonu ve kolesterol presipitasyonu üzerindeki etkisinin belirlenmesi	24
3.2.7 Genomik DNA izolasyonu	25
3.2.8 <i>bsh</i> genin polimeraz zincir reaksiyonu (pzt) ile çoğaltılması ve sekans analizi	25

3.2.9 İstatiksel değerlendirme	26
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	27
4.1 Glikolik asit (GCA) ve Taurokolik asit (TCA) Safra Tuzlarının Dekonjugasyonu	27
4.2 Kolesterol ile Dekonjuge Safranin Presipitasyonu	29
4.3 Ekzopolisakkarit (EPS) Üretiminin, Safra Tuzlarının Dekonjugasyonu ve Kolesterol Presipitasyonu Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.....	39
4.4 Prebiyotik (İnulin), Safra Tuzlarının Dekonjugasyonu ve Kolesterol Presipitasyonu Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.....	41
4.5 bsh Geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Çoğaltılması ve Sekans Analizi.....	47
5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR	48
KAYNAKLAR.....	56
ÖZGEÇMİŞ	65



YÜKSEK LİSANS TEZİ

POTANSİYEL PROBİYOTİK *ENTEROCOCCUS* CİNSİ BAKTERİLERİN KOLESTEROL GİDERİM MEKANİZMALARI VE *bsh* GEN ANALİZLERİ

Orhan ÇETİN

Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ

ÖZET

Kardiyovasküler hastalıklar birçok ülkede başlıca ölüm sebepleri arasında yer almaktadır. Koroner kalp hastalıkları ile ilişkili ana faktörlerden biri yüksek serum kolesterol seviyesi olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada geleneksel Türk yapımı beyaz peynirlerden izole edilen 4 *Enterococcus faecium* ve 6 *Enterococcus faecalis* suşunun kolesterol düşürücü etkisini belirlemek için Taurokolik asit (TCA) ve Glikokolik asit (GCA) safra tuzlarının dekonjugasyonu aktivitesi, kolesterol ile dekonjuge safranin presipitasyonu, dekonjugasyon ve presipitasyon aktivitesi sırasındaki ekzopolisakkarit (EPS) üretimleri araştırılmıştır. Prebiyotikli besi ortamı hazırlanarak prebiyotik *Enterococcus* sp. suşlarının dekonjugasyon, presipitasyon ve EPS üretimi üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Dekonjugasyondan sorumlu olan *bsh* geni polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile belirlenmiş ve sekans analizi ile doğrulanmıştır. Prebiyotik içermeyen besi ortamında *Enterococcus* sp. suşlarından hiçbirisi TCA'yı dekonjuge edemezken GCA'yı dekonjuge edebilmişlerdir. *E. faecium* RT94'ün en yüksek GCA dekonjugasyon aktivitesine sahip olduğu (1,93 mM) ve *E. faecalis* RT122'nin en düşük GCA dekonjugasyonuna sahip olduğu (0,37 mM) belirlenmiştir. Farklı safra konsantrasyonları içeren besi ortamlarında kolesterol giderim yüzdeleri belirlenmiş ve en yüksek kolesterol giderim yüzdesi safrasız besi ortamında *E. faecium* RT94 suşunda (% 50) belirlenmiştir. *Enterococcus* sp. suşlarının EPS üretiminin dekonjugasyon ve presipitasyon aktiviteleri ile doğru orantılı olarak artış gösterdiği belirlenmiştir. Prebiyotik içeren besi ortamında *Enterococcus* sp. suşlarının TCA dekonjugasyonunun arttırdığı ve GCA dekonjugasyonunun azaldığı belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda kullanılan *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının kolesterol düşürücü etkilerinin olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Probiyotik, Prebiyotik, Safra Tuzu, Dekonjugasyon, Presipitasyon, *Enterococcus* sp.

Ocak 2021; 65 sayfa

M.Sc. THESIS

CHOLESTEROL REMOVAL MECHANISMS OF POTENTIAL PROBIOTIC *ENTEROCOCCUS* TYPE BACTERIA AND *bsh* GENE ANALYSIS

Orhan ÇETİN

Aksaray University

Institute of Science

Department of Biotechnology and Molecular Biology

Supervisor: Prof. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are among the main causes of death in many countries. One of the main factors related with coronary heart disease is considered as high serum cholesterol level. This study investigates the deconjugation activity of Taurocholic acid (TCA) and Glucocolic acid (GCA) bile salts, precipitation of cholesterol with deconjugated bile and production of exopolisaccharide (EPS) during deconjugation and precipitation activities to determine the cholesterol inhibiting effects of 4 *Enterococcus faecium* and 6 *Enterococcus faecalis* strains which were isolated from traditional Turkish white cheeses. A prebiotic feeding medium was prepared, and its effects on deconjugation, precipitation, and EPS production by *Enterococcus* sp. strains were determined. *bsh* gene which is responsible for deconjugation was identified through polymerase chain reaction (PCR) and confirmed with sequence analysis. While none of *Enterococcus* sp strains were able to deconjugate TCA in a prebiotic-free medium, they were able to deconjugate GCA. It was determined that *E. faecium* RT94 had the highest GCA deconjugation activity (1.93 mM) and *E. faecium* RT122 had the lowest (0,37 mM). Cholesterol removal percentages were studied in media containing different bile concentrations and the highest cholesterol removal percentage was determined for *E. faecium* RT94 strain (50%) in bile-free nutrient media. EPS production of *Enterococcus* sp. strains were seen to increase in direct proportion with their deconjugation and precipitation activities. It was determined that TCA deconjugation of *Enterococcus* sp strains increased and their GCA deconjugation decreased in prebiotic containing media. As a result of this study, *E. faecalis* and *E. faecium* strains were found to have cholesterol lowering effects.

Keywords: Probiotic, Prebiotic, Bile Salt, Deconjugation, Precipitation, *Enterococcus* sp.

January, 2021; 65 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Kolik Asit Standardı.....	21
Şekil 3.2. Kolesterol miktarını belirlemek için oluşturulan kolesterol standardı.....	23
Şekil 3.3. EPS miktarını belirlemek için oluşturulan EPS Standardı.....	25
Şekil 4.1. GCA içeren MRS ortamında <i>E. faecalis</i> RT96 koloni morfolojisi.....	29
Şekil 4.2. Kolesterol içeren ortamda <i>Enterococcus</i> sp. suşlarının kolesterol giderim yüzdeleri.	36
Şekil 4.3. % 0,2 Safra içeren ortamda <i>Enterococcus</i> sp. suşlarının kolesterol giderim yüzdeleri.	36
Şekil 4.4. % 0,4 Safra içeren ortamda <i>Enterococcus</i> sp. suşlarının kolesterol giderim yüzdeleri.	37
Şekil 4.5. .% 0,6 Safra içeren ortamda <i>Enterococcus</i> sp. suşlarının kolesterol giderim yüzdeleri.	37
Şekil 4.6. % 0,4 Safra içeren MRS ortamında <i>E. faecalis</i> RT98 suşunun koloni morfolojisi.....	38
Şekil 4.7. % 0,6 Safra içeren MRS ortamında <i>E. faecalis</i> RT98 suşunun koloni morfolojisi.....	38
Şekil 4.8. <i>E. faecium</i> RT94 suşunun kolesterol presipitasyon görüntüsü	39
Şekil 4.9. <i>E. faecalis</i> RT 94 suşunun EPS çalışmasının görüntüsü.....	41
Şekil 4.10. <i>E. faecalis</i> RT102, <i>E. faecium</i> RT94 ve <i>L. acidophilus</i> NCFM suşlarının <i>bsh</i> gen görüntüsü.....	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmlar	5
Çizelge 3.1. Man Rogosa Sharpe (MRS) besiyerinin içeriği.	16
Çizelge 3.2. TCA ve GCA dekonjugasyonunda kullanılan MRS besiyerinin içeriği.	17
Çizelge 3.3. Nutrient Broth besiyerinin içeriği	18
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan bakteri kültürleri.....	19
Çizelge 3.5. <i>bsh</i> geninin belirlenmesinde kullanılan primerler.....	19
Çizelge 4.1. <i>Enterococcus</i> sp. suşlarının safra tuzları dekonjugasyonu, canlılıkları ve EPS üretimleri.	28
Çizelge 4.2. <i>Enterococcus</i> sp. suşlarının safrasız, % 0,2, % 0,4 ve % 0,6 safra içeren ortamdaki canlılıkları (Log kob/mL).....	31
Çizelge 4.3. <i>Enterococcus</i> sp. suşlarının safrasız, % 0,2, % 0,4 ve % 0,6 safra tuzları (oxgall) ve 100 µg/mL kolesterol içeren MRS besi ortamlarındaki kolesterol presipitasyonları	32
Çizelge 4.4. <i>Enterococcus</i> sp. suşlarının kolesterol ve farklı safra konsantrasyonlarında EPS üretimleri (mg/L).....	40
Çizelge 4.5. <i>Enterococcus</i> sp. suşlarının prebiyotikli (inülin) ortamda safra tuzları dekonjugasyonu ve EPS üretimleri.	44
Çizelge 4.6. <i>Enterococcus</i> sp. suşlarının prebiyotik (inülin) içeren kolesterol ve safrasız, % 0,2, % 0,4 ve % 0,6 safra tuzları karışımı (oxgall) içeren MRS ortamlarındaki presipitasyon ve EPS üretimleri.	44
Çizelge 4.7. <i>Enterococcus</i> sp. suşlarının prebiyotikli (inülin) ortamda kolesterol ve safrasız, % 0,2, % 0,4 ve % 0,6 safra tuzları karışımı (oxgall) içeren MRS ortamlarındaki canlılık sonuçları (Log kob/mL).	47

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATCC	Amerikan Tür Kültür Koleksiyonu
atm	Atmosferik Basınç
bp	Baz Çifti
BSH	Safra Tuzu Hidrolaz
CPS	Kapsüler Polisakkarit
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksinükleosit Trifosfat
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
EPS	Ekzopolisakkarit
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
g	Gram
GCA	Glikolik Asit
GRAS	Genel Olarak Güvenli Bilinen
H₂SO₄	Sülfürik Asit
HCl	Hidroklorik Asit
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
Heps	Hetropolisakkarit
Kbp	Kilobaz Çifti
Kob	Koloni Oluşturan Birim
KOH	Potasyum Hidroksit
L	Litre
LAB	Laktik Asit Bakterisi
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
Log	Logaritma
M	Molarite
Mg	Miligram
Mgcl₂	Magnezyum Klorür
ml	Mililitre
Mm	Milimolar
MRS	Man Rogosa Sharpe
Nacl	Sodyum Klorür
Naoh	Sodyum Hidroksit
NB	Nutrient Broth
ng	Nanogram
Nm	Nanometre
OD	Optik Dansite
pH	Asitlik Bazlık Birimi
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rpm	Dakikada Devir Sayısı
sp.	Species (Türleri)
SPSS	İstatistik Programı
TCA	Taurokolik Asit
Tm	Erime Sıcaklığı
%	Yüzde
°C	Derece Santigrat

μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar



1. GİRİŞ

Hiperkolesterolemi, birçok ülkede başlıca ölüm nedeni olan kalp damar hastalıkları için önemli bir risk faktörüdür. Obezite dünya genelinde her 3 kişiden birinde görülmeye başlanmıştır (Agha ve Agha, 2017). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), 2030 yılına kadar, dünya genelinde yaklaşık 23,6 milyon insanı etkileyen kalp-damar hastalıklarının önde gelen ölüm nedenleri olarak kalacağını öngörmüştür (WHO, 2010). Koroner kalp hastalıkları ile ilişkili ana faktörlerden biri yüksek serum kolesterol seviyesi olarak kabul edilir (Brown ve Goldstein, 1984; Kumar vd., 2010). Bu nedenle kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi için serum kolesterol seviyesinin düşürülmesi önemli görülmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda serum kolesterol seviyesinin % 1 oranında düşürülmesinin koroner kalp hastalığını % 2-3 oranında azaltılabileceğini göstermiştir (Begley vd., 2006; Kumar vd., 2012). Obeziteyi önlemek için kullanılan yaygın yöntemler; sentetik ilaçlar, cerrahi müdahaleler, spor aktiviteleri ve beslenme alışkanlıklarının düzenlenmesinden oluşmaktadır. Ancak, obezitenin tedavisi için kullanılan ilaçların çoğu yan etkilerinden ve kilo kaybının sürdürülebilir olmamasından dolayı tercih edilmemektedir. Cerrahi müdahaleler ise bazı bireyler için aşırı kilonun azaltılmasında etkili olabilirken, prosedür oldukça invaziv olup, öngörülemeyen komplikasyon riski taşıyabilir. Spor ve diyet tedavisi yöntemleri obezitenin tedavisinde etkili olmakla birlikte yeni bir yaşam tarzını benimsemek için çaba harcamasını gerektirdiğinden sürdürülebilir değildir. Bu yöntemlere alternatif olarak hiperkolesterolemiyi önlemek ve hiperkolesterolemik hastalarda serum kolesterol seviyesini düşürmek için probiyotik tedaviler gibi doğal yöntemlere olan ilgi her geçen gün artmaktadır (Mazlom vd., 2019). Bu tez çalışmasında;

- Kolesterol giderim mekanizmalarından biri olan safra tuzu dekonjugasyon aktivitesi, safra tuzu hidrolaz (BSH) enzimini yüksek düzeyde üreten suşların konjuge safra tuzunu dekonjuge forma (safra asiti, taurin/glisin amino asitleri) çevirmesi ile bu form bağırsaklardan emilemeyerek dışkı ile atılmaktadır. Buna bağlı olarak; enterohepatik döngüyle karaciğere dönen safra asiti miktarı azalmaktadır. Dolayısıyla karaciğerde safra asiti üretimi tetiklenmekte ve safra asitini yeniden oluşturmak için kolesterol kullanılarak böylece- indirekt olarak vücuttaki kolesterol miktarı bu döngü ile azalmaktadır. BSH aktivitesi doğrulan

suşlarda Glikolik asit (GCA) ve Taurokolik asit (TCA) primer safra tuzlarının dekonjugasyonunu araştırmak ve enterokokların safra tuzunu dekonjuge ederek ne oranda kolesterol giderebilecekleri belirlemek,

- İntestinal sistemde BSH enzim aktivitesi sonucu safra tuzlarının dekonjugasyona uğraması ile açığa çıkan serbest safra asitleri, bağırsaktaki asidik ortamda kolesterol ile etkileşerek kolesterolün presipitasyonuna sebep olmaktadır. Bu özellikler ile serum kolesterol seviyesinin düşmesinde BSH enziminin önemli rol oynadığı düşünülmektedir. BSH aktivitesi doğrulanan suşlarda bir diğer kolesterol giderim mekanizması olan kolesterol ile dekonjuge safra tuzların düşük pH da birlikte presipitasyonu yöntemi ile enterokok suşlarının kolesterol giderim oranlarını belirlemek ve elde edilen sonuçların dekonjugasyon aktivitesi ile karşılaştırılması,
- Polisakkaritler kolesterol gideriminde diyetle alınan lifli gıdalara benzer bir etki gösterirler bu sebeple bakteriler tarafından üretilen ekzopolisakkaritler (EPS) lifli gıdalarda olduğu gibi kolesterolü bağlayarak feçesle atılan kolesterol miktarının artmasına sebep olabilir. Böylece bağırsaklardan emilerek kana karışan kolesterol miktarında azalma meydana gelebilir. Kolesterolün bakterinin hücre duvarına bağlanması ile meydana gelen bu mekanizmanın araştırılması ve bu amaçla, dekonjugasyon ve presipitasyon yöntemleri ile yüksek kolesterol giderimi gösteren enterokok suşlarının seçilerek, bu suşların kolesterol giderimi yaparken EPS üretiminin araştırılması ve böylece EPS üretimleri ile kolesterol giderimi arasındaki ilişki belirlenmesi,
- Prebiyotikler başlıca oligosakkaridler olup probiyotiklerin gelişimini veya aktivitesini teşvik ederek, insan ve hayvan sağlığını olumlu yönde etkileyen gıda bileşenleridir. Dekonjugasyon ve presipitasyon yöntemleri ile yüksek kolesterol giderimi sergileyen enterokok suşları belirlenerek, suşların bu aktiviteleri prebiyotik olarak kullanılan inulinli ortamda araştırılması, prebiyotiklerin safra asitlerinin dekonjugasyonu ile kolesterolün birlikte presipitasyonu üzerindeki etkisinin belirlenmesi,
- BSH aktivitesi, dekonjugasyon aktivitesi ve yüksek kolesterol giderimi gösteren suşlarda *bsh1* geni belirlenmesi, belirlenen *bsh1* genlerinde sekans analizleri yapılarak, elde edilen sekans sonuçlarının biyoinformatik programlar aracılığıyla değerlendirmesi ve suşların *bsh1* genlerindeki farklılıklarının belirlenmesi,

- BSH aktivitesine sahip suşlarda kolesterol giderimi hem safra tuzu dekonjugasyonu aktivitesi hem de diğer bir mekanizma olan kolesterol ile dekonjuge safra tuzların birlikte presipitasyonu yöntemi ile belirlenmesi ve hangi mekanizmanın daha etkili olduğunun belirlenmesi,
- Enterokok suşları tarafından üretilen EPS ve prebiyotik olarak kullanılan inulinin safra tuzu dekonjugasyonu ve kolesterol presipitasyonu aktivitelerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Probiyotikler

Probiyotik terimi Yunanca kökenli olup ‘Yaşam için’ anlamına gelmektedir. Probiyotiklerin tarihi, 20. yüzyılın başında, ilk kez Bulgar köylülerin uzun ve sağlıklı yaşamlarının fermente süt ürünleri tüketiminden kaynaklandığını iddia eden ve Nobel Ödülü kazanan Rus bilim insanı Elie Metchnikoff tarafından sunulan bir hipotezle başlamıştır (Khani vd., 2012). DSÖ probiyotikleri ‘yeterli miktarda verildiğinde konukçu üzerinde bir sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalardır’ şeklinde tanımlamıştır (Hill vd., 2014).

2.1.1 Probiyotik seçim kriterleri

DSÖ, Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) önerilerine göre, bir mikroorganizmanın probiyotik olarak önerilebilmesi için hem işlevsellik hem de güvenlik açısından bazı kriterlere sahip olması gerekmektedir. Bu kriterler;

- Patojen olmamalıdır. Probiyotik olarak önerilecek mikroorganizmanın kendisi ya da metabolitleri konukçu üzerinde olumsuz etki yapmamalıdır.
- Midenin değişen asidik ortamına (pH:2-5) dirençli olmalı ve canlılığını sürdürmelidir.
- Safrayı tolere edebilmelidir.
- Bağırsağa ulaştığında bağırsak epitel hücrelerine tutunabilmeli ve kolonize olabilmelidir.
- Bağırsakta yaşayan patojenlerin epitel yüzeye bağlanmalarını engellemeli ve ürettikleri antimikrobiyal maddeler ile patojenler üzerinde antagonistik etki gösterebilmelidir.

- Genetik olarak stabil olmalı ve antibiyotik direnç genleri bulundurmamalıdır.
- Konukçunun bağışıklık sistemini uyarmalıdır (Markowiak ve Slizewska, 2017; Binda vd., 2020).

Bu kriterlere ek olarak son yıllarda FAO/DSÖ tarafından probiyotik seçim kriterleri BSH aktivitesinin varlığı da eklenmiştir (FAO/WHO, 2011).

2.1.2 Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığı üzerine etkileri

Probiyotik olarak önerilen mikroorganizmaların kendilerinin ya da ürettikleri metabolitlerin insan sağlığı üzerine olumlu etkileri bulunmaktadır. Bu etkilerden bazıları şunlardır;

- Mide üzerindeki etkileri (Goderska vd., 2018)
- Laktoz intoleransı üzerindeki etkileri (Sullivan ve Nord, 2002)
- Antimikrobiyal etkisi (Sanchez vd., 2016)
- Bağışıklık sistemine etkisi (Isolauri vd., 2001)
- Vitamin metabolizmasını iyileştirme etkisi (LeBlanc vd., 2017)
- Antikanserojenik etkisi (Marinelli vd., 2017)
- Ürogenital enfeksiyonları engelleme etkisi (Reid, 2001)
- Böbrek rahatsızlıkları üzerine etkisi (Onal Darılmaz vd., 2017)
- Kolesterol düşürücü etkisi (Ma vd., 2019a)

2.1.3 Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar

Probiyotik olarak çoğunlukla mide-bağırsak sisteminin normal mikrobiyotasını oluşturan laktik asit bakterileri (LAB) kullanılmaktadır. Bu bakteriler genellikle gastrointestinal sisteminden ve süt ürünlerinden izole edilmiştir. Probiyotik olarak en çok araştırılan bakteriler özellikle *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerine ait türlerdir. Bunlara ilaveten *Enterococcus* cinsi mikroorganizmalar da son zamanlarda ticari olarak kullanılmaya başlanmıştır (Sivamaruthi, 2018; Worsztynowicz vd., 2019).

Çizelge 1.1. Probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmlar (Khanegahah vd., 2020).

<i>Lactobacillus</i> türleri	<i>Lactobacillus cellobiosus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus johnsonii</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus salivarius</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i>
<i>Bifidobacterium</i> türleri	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium thermophilum</i>
<i>Bacillus</i> türleri	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus lentus</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus coagulans</i>
<i>Pediococcus</i> türleri	<i>Pediococcus cerevisiae</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Streptococcus</i> türleri	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> , <i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Enterococcus</i> türleri	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus durans</i>
<i>Propionibacterium</i> türleri	<i>Propionibacterium shermanii</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i>

2.2 Prebiyotikler

Prebiyotikler, ‘gastrointestinal sistemdeki mikrofloranın büyümesini, kompozisyonunu ve aktivitesini seçici bir şekilde uyaran, böylece konakçıların sağlığını olumlu yönde etkileyen sindirilemeyen fermente gıda substratlarıdır’ şeklinde tanımlanmıştır (Roberfroid, 2007). Meyve, sebze, tahıllar ve diğer yenilebilir bitkiler potansiyel prebiyotikler oluşturan karbonhidrat kaynaklarıdır. Domates,

enginar, muz, kuşkonmaz, çilek, sarımsak, soğan, hindiba, yeşil sebzeler, baklagiller ve yulaf, keten tohumu, arpa ve buğdayın potansiyel prebiyotik kaynağı olduğu bildirilmiştir (Salazar vd., 2014). Prebiyotikler, gastrointestinal sistemdeki biyoyararlanımın arttırılmasında, obez insanlarda kilo kaybı sağlayarak kardiyovasküler hastalıkları önlemede ve hiperkolesterolemiyi önlemede etkilidir (Parnell ve Reimer, 2010).

2.3 Simbiyotik

Simbiyotik terimi, hem probiyotik hem de prebiyotikler içeren ürünler için kullanılmaktadır. Bu tip kombinasyonların başlıca amacı, gastrointestinal sistemdeki probiyotik mikroorganizmaların hayatta kalmasının sağlanmasıdır (Schrezenmeir ve Verse, 2001). Diğer olası kombinasyonlar göz önüne alındığında, insanlarda bağırsak mikrobiyotasının modülasyonu için sinbiyotiklerin uygulanmasının umut verici olduğu bildirilmiştir (Scavuzzi vd., 2014).

Simbiyotik formül oluştururken dikkate alınması gereken ilk husus, ayrı olarak kullanıldığında konakçının sağlığı üzerinde olumlu bir etki yaratan uygun bir probiyotik ve prebiyotik seçimi olmalıdır (Scavuzzi vd., 2014). Simbiyotik ürünler insanlar üzerinde farklı yollarla sağlık yararları sağlamaktadırlar. Tespit edilen faydalar artan *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cins sayısı ile bağırsak mikrobiyotasının dengesinin korunması, siroz hastalarında karaciğer fonksiyonlarının iyileştirilmesi, geliştirilmiş immünomodülatif yetenekler ve ameliyat sonrası hastalarda bakteriyel translokasyonun önlenmesi ve hastane enfeksiyonlarının insidansının azalması bulunmaktadır (Zhang vd., 2010).

2.4 Enterokoklar

Enterokoklar insanların doğal mikroflorasında bulunan, gıda fermantasyonu ve gıda bozulmalarına neden olan önemli mikroorganizmalardır. Enterokoklar, pişmiş et ürünlerinin bozulmasından sorumlu olabilirler, ancak aynı zamanda çoğu Akdeniz Bölgesi'nde üretilen peynirlerin veya fermente sosislerin olgunlaşmasına ve aroma gelişimine katkıda bulunabilmektedirler. Bazı enterokok suşları insan veya hayvan sağlığını iyileştirmek için probiyotik olarak başarıyla kullanılmaktadır (Franz vd., 2011).

2.4.1 *Enterococcus* cinsi bakterilerin genel özellikleri

Enterococcus cinsi bakteriler Laktik Asit Bakterileri (LAB) olarak bilinen mikroorganizma grubuna aittir. Enterokoklar kok şeklinde, Gram-pozitif, spor oluşturmayan, katalaz-negatif, oksidaz-negatif, fakültatif aerob olan bakterilerdir. *Enterococcus* cinsi bakterilerin optimum üreme sıcaklıkları 35-37°C dir. *Enterococcus* cinsi bakteriler 10-45°C’de arasında üreme gösteren, % 6,5 NaCl içeren ortamda ve pH 9,6’da üreme yeteneğine sahip olan, Lancefield D-grubu antijeni olarak bilinen hücre duvarına bağlı gliserol teikoik asit antijeni üretirler (Moreno vd., 2006; Ogier vd., 2008). Enterokoklar insanlar ve hayvanların doğuştan mikroflorasının önemli bir kısmını oluşturlar (Klein vd., 2003). İnsan ve hayvanların bağırsak sistemindeki bulunma oranları yüksek olduğundan dolayı enterokoklar birçok gıdada özellikle de hayvansal kaynaklı gıdalarda, kötü çevre şartlarına dayanıklı olduklarından dolayı farklı bitki türlerinden, su ve topraktan izole edilmiştir. Çoğunlukla *E. faecium*, *E. faecalis* türleri, daha az oranda *E. durans*, nadiren de *E. hirae* ve *E. casseliflavus* türleri süt ve peynir ürünlerinde bulunmaktadır (Klein vd., 2003; Ogier vd., 2008).

2.4.2 *Enterococcus* cinsi bakterilerin probiyotik özellikleri

Enterokoklar memelilerin gastrointestinal mikroflorasında bulunur ve bu yüzden de ilk tanımlanan bakteriler arasında yer almışlardır. Aynı zamanda, insanlarda en fazla bulunan Gram-pozitif kok olarak bilinmektedirler (Ogier vd., 2008). Enterokoların nozokomiyal enfeksiyonlar ile insanlarda bakteriyemi, endokardit ve üriner enfeksiyonlara neden olabildiği bildirilmiştir. *E. faecalis*’lerin patojen olma nedenleri antibiyotik dirençlilikleri, sitolizin ve hemolizin gibi virulans faktörleri bulundurmalarından kaynaklanmaktadır. Enterokokların probiyotik olarak kullanımlarında güvenilirlikleri ve zararlı aktiviteleri tartışma konusudur. Ancak her bir türün probiyotik kullanım için virulans genleri (hemolizin, jelatinaz, Esp protein vb.) için taranması, önemli probiyotik özelliklerin (asite tolerans, safra direnci, antimikrobiyal madde üretimi vb.) belirlenmesi gerekmektedir. Yapılan çalışmalarda enterokokların gıda ve diğer kaynaklardan izole edilen suşlarından ziyade klinik izolatlarının virulans genleri taşıdığı bildirilmiştir (Franz vd., 2001; Perumal ve Venkatesan, 2017). *Enterococcus* cinsi, laktik asit bakterileri içerisinde “Genellikle

Güvenli Kabul Edilen (GRAS, Generally Regarded As Safe)” statüsünde yer aldığı için tavuk ve inek gibi canlıların yemlerinde probiyotik gıda katkısı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca Enterokoklardan elde edilen bakteriyosinlerin gıda koruyucusu olarak kullanıldığında herhangi bir olumsuz etkisinin olduğu bildirilmemiştir (Fernandez vd., 2007; Franz vd., 2001). Bu güne kadar enterokokların probiyotik olarak kullanımına ilişkin birçok çalışma yapılmıştır. Khalkhali ve Mojgani (2018) anne sütünden izole ettikleri *E. faecium* 2C ile beslenen deney hayvanlarının sağlığı üzerinde herhangi bir toksik etkisinin olmadığını ve fonksiyonel gıda üretiminde güvenli probiyotik suş olarak kullanılabileceğini belirlemişlerdir. Witzler vd. (2017) *E. faecium* CRL 183 suşu ile hazırlanan probiotik lozenge besinin antikarsinojenik özelliğe sahip olduğunu göstermişlerdir. *E. faecium* WEFA23 suşunun kolesterol düşürücü etkisi olduğu ve metabolik sendromun iyileşmesinde probiyotik olarak kullanılabileceği önerilmiştir (Zhang vd., 2017). Lodemann vd. (2015) probiyotik *E. faecium* NCIMB 10415 suşunun enterotoksijenik *Escherichia coli*’nin bağırsak epitel hücrelerine verdiği hasarı iyileştirdiğini tespit etmişlerdir.

2.5 Kolesterol

Kolesterol, dört kaynaşmış alisiklik halkadan oluşan bir karbon iskeletine sahip terpenoid lipittir. Memeli hücre zarlarının önemli bir bileşenidir ve steroid hormonları, D vitamini ve primer safra asitlerinin öncüsüdür (García vd., 2012).

2.5.1 Kolesterol metabolizması

Lipitlerin ayrı ve özelleşmiş bir tipi olan kolesterol, yaşam için mutlaka gerekli olan bir maddedir (Corzo ve Gilliland, 1999). Kolesterol insanlardaki en yaygın steroldür ve vücutta belirli sayıda, bir grup işleve sahiptir. Kolesterol bütün hücre zarlarının bir bileşeni olup safra tuzları, steroid hormonlar ve D vitamininin öncül maddesidir. Vücudun belli başlı dokularına sürekli kolesterol sağlanması önemlidir. Bu gereksinimi karşılamak üzere bir seri kompleks taşıma, biyosentetik ve düzenleyici mekanizmalar gelişmiştir. Karaciğer, vücudun kolesterol dengesinin düzenlenmesinde merkezi bir role sahiptir (Champe ve Harvey, 1997). Kolesterol, genellikle beslenme yoluyla dışarıdan alınmasına rağmen, aslında vücut, ihtiyaç duyulan tüm kolesterolü üretebilme kabiliyetindedir. Kolesterol karaciğerdeki kolesterol havuzuna bazı kaynaklardan gelir. Bunlar; diyetle alınan kolesterol, ekstrahepatik dokularda

sentezlenen kolesterol ve karaciğerde *de novo* sentez sonucu oluşan kolesteroldür. Kolesterol esasen karaciğer ve bağırsaklarda yağ, protein ve karbonhidrat parçalarından sentezlenir (Champe ve Harvey, 1997; Lee, 1997; Ma, 2004,).

Vücuttaki kolesterolün yarısından çok az bir kısmı *de novo* biyosentez yoluyla elde edilir. Günlük kolesterol sentezinin yaklaşık olarak % 10'u karaciğerde, % 15'i ise bağırsaklarda gerçekleşir. Kolesterol sentezi, hem sitozol hem de endoplazmik retikulumda bulunan enzimlerle birlikte sitozolde meydana gelir (Champe ve Harvey, 1997). Farklı insan popülasyonlarının diyetlerindeki kolesterolün miktarı çok değişkendir, hatta aynı kişide bile kolesterol alım miktarı günden güne anlamlı olarak değişebilir. Bu yüzden, vücuttaki kolesterol sentez hızını, kolesterol atılım hızına karşı dengelemek için düzenleyici mekanizmalar mevcut olmalıdır. Bu düzenlemede bir dengesizlik, dolaşımdaki kolesterol düzeyinin artmasına, bu da koroner arter hastalığı olasılığına yol açarken, kolesterolün safraya aşırı salgılanması ise kolesterolün safra kesesinde ve safra kanalında çökmesine neden olabilmektedir (Champe ve Harvey, 1997).

Yağlar, proteinler ve karbonhidratlardan farklı olarak kolesterol, enerji elde edilmesinde kullanılamaz. Diğer bir deyişle, kolesterolün halka yapısı insanlarda su ve karbondioksit'e metabolize edilemez. Az miktardaki kolesterol hormonların ve D vitaminin yapımında kullanılır. Ancak, kolesterolden üretilen en önemli ürünler safra asitleridir. Kolesterol vücuttan; safra asitlerine dönüştürülerek feçesle birlikte ya da safra içine salgılanarak atılır. Bağırsaktaki kolesterolün bir kısmı atılmadan önce bağırsaktaki bakteriler tarafından kolesterolün indirgenmiş türevleri olan koprostanol ve kolestanole dönüştürülür (Champe ve Harvey, 1997).

2.5.2 Kandaki kolesterol seviyesinin önemi

Kolesterol kanda lipoprotein adı verilen paketlerin içinde taşındığı için lipoprotein türleri kalp hastalığı riskini etkileyebilir. Kandaki kolesterolün çoğunu düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL) taşır. LDL'de taşınan kolesterol ve yağ, damarları tıkayan tehlikeli birikintilerin ana kaynağıdır. Kan dolaşımında ne kadar yüksek oranda LDL bulunuyorsa kalp hastalığına yakalanma riski de o kadar yüksektir. Yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL) kandaki kolesterolün bir miktarını taşır ancak bu kolesterol karaciğere taşınır ve vücuttan dolayısı ile damarlardan

uzaklaştırılır. Eğer HDL düzeyi düşük ise kalp hastalığına yakalanma riski yüksek olacaktır (Rudkowska, 2012).

2.5.3 Kolesterol dengesinde safra asitlerinin rolü

Vücuttaki kolesterol yıkımının büyük kısmı karaciğerdeki safra asidi senteziyle olur. İnsanlarda her gün yaklaşık olarak 500 mg kolesterol safra asitlerine dönüştürülür ve safra içinde uzaklaştırılır. Kolesterolün, vücuttan atılması için izlenen en önemli yol safra içerisine salgılanmasıdır. Serbest kolesterol, sulu çözeltilerde neredeyse hiç çözünmez, fakat safrada, safra asitleri ve lesitin gibi lipitler vasıtasıyla çözünebilir hale gelir (Brashears vd., 1998).

2.5.4 Safra asitleri ve safra tuzları

Safra; organik (safra tuzları, kolesterol, fosfolipitler, bilirubin) ve inorganik (su, elektrolitler) bileşiklerin sulu bir karışımından oluşur. Fosfatidilkolin (lesitin) ve safra tuzları nicelik olarak safranın en önemli bileşenleridir. Safra, ya doğrudan safra kanalı yoluyla karaciğerden onikiparmak bağırsağına geçer ya da sindirim için hemen gereksinim yoksa safra kesesinde depolanabilir. En çok bulunan safra asitleri kolik asit ve kenodeoksikolik asittir (Champe ve Harvey, 1997).

Safra asitleri, amfipatiktirler. Bu yüzden, moleküller hem polar hem de nonpolar bir yüze sahiptir ve bağırsakta yağları çözücü ajanlar olarak işlev görebilirler. Böylece diyetle alınan trigliserol ve diğer kompleks lipitlerin, pankreasın sindirim enzimleri tarafından yıkılması için yardımcı olurlar (Champe ve Harvey, 1997).

Safra asitleri karaciğerde çok basamaklı bir metabolik yol tarafından sentez edilirler. Sentezlenen bileşikler “primer” safra asitleri olarak adlandırılan kolik asit ve kenodeoksikolik asittir. Safra asitleri karaciğerden ayrılmadan önce bir molekül glisin ya da taurin amino asitleri ile konjuge edilir. Konjugasyon, safra asidinin karboksil grubu ile eklenen bileşiğin amino grubu arasında oluşan amid bağı tarafından sağlanır ve oluşan bu yeni bileşikler safra tuzları (glükolik asit, glükokenodeoksikolik asit, taurokolik asit ve taurokenodeoksikolik asit) olarak adlandırılırlar. Safra tuzları artmış amfipatik özelliklerinden dolayı safra asitlerinden daha etkili deterjanlardır. Bu yüzden, sadece konjuge formları (yani safra tuzları) safrada bulunur (Champe ve Harvey, 1997).

Enterococcus, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides* ve *Lactobacillus* gibi bağırsak bakterileri safra tuzlarından glisin ve taurini ayırabilirler ve bu olaya “dekonjugasyon” adı verilir. Ayrıca, primer safra asitlerinin bir kısmını bir hidroksil grubunun ayrılmasıyla sekonder safra asitlerine dönüştürebilir ve böylece kolik asitten deoksikolik asit, kenodeoksikolik asitten de litokolik asit oluşur (Champe ve Harvey, 1997).

2.5.5 Enterohepatik dolaşım

Bağırsağa salgılanan safra tuzları etkin bir şekilde yeniden absorbe edilirler ve yeniden kullanılırlar. Primer, sekonder safra tuzları ve safra asitlerinin karışımı aktif transport ile öncelikle ileumda absorbe edilir. Bağırsak mukoza hücrelerinden portal kana aktif olarak taşınırlar ve karaciğer parenkim hücreleri tarafından etkin bir şekilde alınırlar. Karaciğer hem primer hem de sekonder safra asitlerini glisin veya taurin ile konjuge ederek safra tuzlarına dönüştürür ve böylece safraya salgılanmak için hazır hale gelirler. Safra tuzlarının safraya devamlı salgılanma işlemi, duodenuma geçişleri (bazıları burada safra asitlerine dönüşür), karaciğere safra asitleri ve tuzlarının bir karışımı olarak daha sonraki geri dönüşümün hepsine birden “enterohepatik dolaşım” denir (Champe ve Harvey, 1997).

2.5.6 Probiyotiklerin kolesterol konsantrasyonunu düşürmesini sağlayan olası mekanizmalar

Kan kolesterol seviyelerini düşürmek için uygulanan en son yöntemler arasında, diet 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 sahiptirler (Jones vd., 2004). Son yıllarda, kandaki yüksek kolesterol seviyelerinin düşürülmesi için diet uygulamalarında yeni yaklaşımlar söz konusudur. Bu uygulamalar arasında, probiyotik bakterilerin kullanımının da önemli bir yere sahip olduğu bildirilmiştir (Singhai vd., 2019).

Laktik asit bakterilerinin kolesterol düşürücü fonksiyonunun mekanizmasını açıklayabilmek için çeşitli araştırmalar yapılmış ve dört temel mekanizma öne sürülmüştür:

1. Kolesterolün asimilasyonu (Gilliland vd, 1985)

2. Safra tuzlarının dekonjugasyonu (Pigeon vd., 2002).
3. Safra tuzlarının kolesterol ile presipitasyonu (Öner vd., 2014).
4. Kolesterolün bakterinin hücre duvarına bağlanması (Nakajima vd., 1992).

2.5.6.1 Kolesterolün asimilasyonu

Laktobasiller ve bifidobakteriler ile yapılan çalışmalar, bu bakterilerin belirli suşlarının, safra tuzları varlığında, kolesterolü asimile edebilme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir. Gilliland vd. (1985) yaptıkları bir *in vitro* çalışmada, belirli *Lactobacillus acidophilus* suşlarının anaerobik koşullar altında ve safra varlığında, besiyerindeki kolesterol miktarını azaltabildiğini belirlemişlerdir. Çalışmada kullanılan koşullar, bağırsaklarda mevcut koşullar ile aynı olduğu için araştırmacılar bu olayın, diyetle alınan kolesterolün en azından bir kısmının kana karışmasını engelleyebileceği sonucuna ulaşmışlardır. Ancak, safra varlığında gelişme ve besiyerindeki kolesterolü uzaklaştırabilme kabiliyeti suşlara bağlı olarak farklılıklar gösterebileceği bildirilmiştir (Huang vd., 2013). Lye vd. (2010), probiyotiklerin kolesterol asimilasyonu için farklı mekanizmaların olabileceğini bildirmişlerdir.

2.5.6.2 Safra tuzlarının dekonjugasyonu

Bağırsak mikroorganizmaları tarafından safra tuzlarının dekonjugasyona uğraması, serum kolesterol seviyelerinin düşürülmesi bakımından çok önemlidir (Corzo vd., 1999). Kolesterol, karaciğerde sentezlenen primer safra asitlerinin öncül maddesidir. Safra asitleri, karaciğerde üretildikten sonra, glisin veya taurin amino asitleri ile birleştirilerek, safra kesesinde konjuge safra tuzları şeklinde depo edilir ve sindirim kanalına salgılanmak üzere burada bekletilirler. Konjuge safra tuzları ince bağırsağa, besinlerle alınan yağların, kolesterolün, hidrofobik vitaminlerin ve yağda çözünen diğer bileşiklerin emiliminde yardımcı olmak üzere salgılanırlar. Konjuge safra tuzlarının % 97'si ince bağırsakta 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 (Corzo vd., 1999). Dekonjugasyon reaksiyonu, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides* ve *Lactobacillus* cinslerinin de dahil olduğu birtakım bağırsak bakterileri tarafından üretilen BSH enziminin faaliyeti ile, glisin veya taurin ile konjuge olmuş safra asitlerinden oluşan safra tuzlarının, amino asit kökü ve serbest safra asidine hidroliz

olmasıdır (Nguyen vd., 2007). Tsai vd. (2013) yaptıkları bir çalışmada *Pediococcus acidilactici*, *Bifidobacterium adolescentis* ve *Lactobacillus rhamnosus* ile *L. acidophilus* probiyotik mikroorganizmalarının BSH aktivitelerini ve kolesterol dekonjugasyon yeteneklerini *in vitro* olarak belirlemişlerdir. Probiyotiklerin BSH enzimi için birden fazla homolog genini bulundurdıkları bilinmektedir. Çoklu BSH geni probiyotiklere ekstra avantajlar sağlayabilir. Örneğin, BSH çok farklı safra bileşimlerine ya da safraya farklı maruziyet sürelerine cevap verebildiği için değişen çevre koşullarında bakterinin maksimum canlı kalmasını sağlayabilir. *L. acidophilus* NCFM suşunda farklı substratlara spesifik olan ve *bshA* ile *bshB* genleri tarafından kodlanan iki adet BSH enzimi belirlenmiştir (Mc Auliffe vd., 2005). *Lactobacillus plantarum* da ise BSH enzimi üretiminden sorumlu dört adet gen (*bsh1*, *bsh2*, *bsh3*, *bsh4*) tespit edilmiştir. Ancak bu genlerden yalnızca *bsh1*'in *L. plantarum* da BSH enzimi sentezinden sorumlu olduğu *bsh2*, *bsh3* ve *bsh4*'ün ise farklı fizyolojik aktiviteler için korunduğu bildirilmiştir (Lambert vd., 2008). Başka bir çalışmada ise yüksek BSH aktivitesi gösteren *L. acidophilus*, *L. plantarum* ve *Lactobacillus gasseri* türlerinden elde edilen yedi adet *bsh* geni karşılaştırıldığında, BSH enzimini kodlayan LA-*bshA*, LA-*bshB*, LG-*bsh* ve LP-*bsh1* genlerinin % 45 den fazla benzerlik gösterdiği ancak LP-*bsh2*, LP-*bsh3* ve LP-*bsh4* genlerinin homolojisinin % 26,3' den az olduğu ve BSH enzimini kodlamadığı belirlenmiştir (Jiang vd., 2010). Wijaya vd. (2004) *E. faecium*' da *bsh* genin kromozomal kodlu olduğunu tespit etmişlerdir. Chand vd. (2016), *E. faecalis*' den izole ettikleri *bsh* genini plazmite klonlayarak *Escherichia coli*' de eksprese etmişler ve enzimi saflaştırdıklarında enzimin biyokimyasal olarak diğer BSH enzimlerinden daha aktif olduğunu gözlemlemişlerdir. Probiyotik mikroorganizmada *bsh* geni için yapılan mikrobiyal genom analizleri bu genlerin organizasyon ve düzenlenmesinin türler ve cinslerde farklı olabileceğini göstermiştir (Ridlon vd., 2006).

Safra asitlerinin dekonjugasyonunun;

1. Kolesterolün bağırsak kanalından daha az emilmesine yol açmak,
2. Enterohepatik döngüyle karaciğere dönen safra asidi miktarını azaltarak, karaciğerdeki safra asidi üretimini artırmak,

3. Bağırsaklarda meydana gelen asidik ortamda kolesterolün serbest safra asitleriyle çökmesini sağlamak suretiyle serum kolesterol seviyelerinin azalmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir (Corzo ve Gilliland, 1999).

Dekonjuge olmuş (serbest) safra asitlerinin çözünürlüğü daha azdır ve bunlar bağırsak kanalından konjuge safra tuzlarına kıyasla daha az emilirler. Bu sebeple, ince bağırsakta, safra tuzlarının dekonjugasyonu, bağırsak kanalından daha fazla safra asidinin atılmasına yol açar. Özellikle serbest safra asitleri, konjuge safra tuzlarına göre bağırsaklardan çok daha fazla atılırlar. Serbest safra asitleri, bakteri hücrelerine ve besinlerle alınan liflere bağlanmak suretiyle de fekal yolla vücuttan daha çok atılırlar (Ahn vd., 2003).

Safra tuzlarının kolesterol ile presipitasyonu:

Hidrolize olan safra tuzları asidik koşullar altında ($\text{pH} < 5,5$) kolesterol ile birlikte presipite olarak feçesle vücuttan atılabilirler. Bağırsağın fizyolojik pH'ı çok az nötr ya da alkali iken, bağırsak bakterileri tarafından besinsel liflerin fermentasyonu ile üretilen kısa zincirli yağ asitlerinden dolayı düşen pH safra tuzları ile kolesterolün birlikte presipitasyonu için uygun ortam oluşturur. On bir adet laktobasil suşunun kolesterol ve safra tuzları (glikoksalat ve taurokolat) presipitasyonu test edildiğinde, *L. acidophilus*'ların *L. casei* ile karşılaştırıldığında glioksalat ile presipitasyonun çok yüksek olduğu belirlenmiştir (Liong ve Shah, 2005).

Kolesterolün bakterinin hücre duvarına bağlanması veya hücre zarının yapısına katılması:

Nakajima vd. (1992) yaptıkları bir çalışmada, ekzopolisakkarit (EPS) üreten ve üretmeyen iki *L. lactis* subsp. *cremoris* suşunun kolesterolü bağlama yetenekleri test edilmiş ve sonuçta ekzopolisakkarit üreten suşun, üretmeyen diğer suşa kıyasla daha fazla kolesterolü bağlayabildiği gösterilmiştir. Bu araştırmacılar, 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, ve böylece bağırsaklardan emilerek kana karışan kolesterol miktarında azalma meydana gelebileceğini öne sürmüşlerdir (Nakajima vd., 1992).

2.6 Ekzopolisakkarit (EPS) ve Probiyotik Önemi

EPS; şeker veya şeker türevlerinin dallı, tekrar eden birimlerinden oluşan uzun zincirli polisakkaritlerdir. Bu şeker birimleri temel olarak farklı oranlardaki glikoz, galaktoz ve ramnoz'dur. EPS yapısal olarak homopolisakkaritler ve hetropolisakkaritler (HePS) olarak iki gruba ayrılırlar. Yapısında sadece bir tür monosakkarit içeren polimerler, homopolisakkarit ve iki veya daha fazla monosakkarit türü içeren polimerler ise HePS olarak adlandırılmıştır. LAB' leri, hücre yüzeyine kuvvetlice bağlanan kapsüler polisakkaritler (CPS, capsular polysaccharides) ve hücre dışı ortamına salgılanan EPS olarak iki grup altında toplanan EPS' ler üretmektedirler. *Enterococcus* bakterileri de diğer birçok bakteri gibi EPS üretme yeteneğine sahiptirler. Bu bakterilerin HePS üretim yetenekleri de tespit edilmiştir. LAB' leri tarafından üretilen EPS, bu bakterilerin GRAS tanımlamasına göre güvenilir olduklarından dolayı ve gıda da doku geliştirici, reolojik özelliklerinden dolayı fermente ürünlerin yapımında büyük ilgi görmüştür. Aynı zamanda, LAB' lerin ürettiği bazı EPS' ler, bağışıklık sistemi uyarıcısı, anti-ülser ve kolesterol düşürücü aktiviteler gibi sağlığa yararlı özellikler de göstermiştir (Van vd., 2002).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmalarda kullanılan besiyerleri

Enterococcus sp. suşlarının ve *Lactobacillus acidophilus* NCFM suşunun aktifleştirilmesi ve geliştirilmesinde Man Rogosa ve Sharpe (MRS) sıvı ve katı besiyeri kullanılmıştır. Çalışmada enterokokların Glikolik asit (GCA) ve Taurokolik asit (TCA) dekonjugasyon aktivitelerini belirlemek için kullanılan MRS sıvı besiyerinin içeriği Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Man Rogosa Sharpe (MRS) besiyerinin içeriği.

Maddeler	g/L
Pepton	10,0
Et Ekstaktı	8,0
Maya Ekstrakt	4,0
Glukoz	20,0
Tween 80	1,0
K ₂ HPO ₄	2,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,05
Amonyum Sitrat	2,0
Sodyum asetat. 4 H ₂ O	5,0
Agar*	15

*: Katı besiyeri hazırlamak için kullanıldı

MRS sıvı besiyeri hazırlamak için yukarıda bileşimi verilen toz halindeki MRS Broth (Merck) besiyerinden 1 L için 52,2 g tartılıp bir miktar distile su içerisinde çözdürülüp son hacim 1 L’ye tamamlanmıştır. MRS katı besiyeri hazırlamak için sıvı besiyerine % 1,5 oranında agar-agar (Sigma) ilave edilerek hazırlanmıştır. Besi ortamının pH’sı 1 M NaOH ve/veya 1 M HCl kullanılarak 6,8±0,2’ye ayarlanmıştır. Besiyeri hazırlandıktan sonra otoklavda 121°C’da 1,5 atm basınçta 15 dk steril edilmiştir.

GCA ve TCA dekonjugasyonunda kullanılan MRS besiyerinin içeriği çizelde 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. TCA ve GCA dekonjugasyonunda kullanılan MRS besiyerinin içeriği.

Maddeler	g/L
Pepton	10,0
Et Ekstaktı	8,0
Maya Ekstrakt	4,0
Glukoz	20,0
Tween 80	1,0
K ₂ HPO ₄	2,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,05
Amonyum Sitrat	2,0
Sodyum asetat. 4 H ₂ O	5,0
Sodyumtaurokolat ^a	50
Sodyumglikokolat ^b	50

^a : TCA dekonjugasyonu için kullanıldı.

^b : GCA dekonjugasyonu için kullanıldı.

GCA ve TCA dekonjugasyonu için kullanılacaklar haricindeki maddeler tartılıp bir miktar distile suda eritilip 1000 mL'ye tamamlanmıştır. 0,1 M HCl ve/veya 0,1 M NaOH ile pH 6,8±0,2'ye ayarlanmıştır. Hazırlanan besiortamları 121 °C'de 1,5 atm basınçta 15 dk otoklavda steril edilmiştir.

GCA ve TCA dekonjugasyonu için kullanılacak olan sodyumtaurokolat (Merck) ve Sodyumglikokolat (Merck) ayrıca tartılıp distile su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. 0,45 µm'lik filtre kullanılarak sterilize edilmiştir. Otoklavda steril edilen sıvı besiyerinin içerisine steril şartlarda eklenmiştir.

Deneylerde negatif kontrol olarak kullanılan *Escherichia coli* ATCC 35218 suşunun aktifleştirilmesi ve geliştirilmesi için kullanılan Nutrient Broth (NB) besiyeri Çizelge 3.3 de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Nutrient Broth besiyerinin içeriği.

Maddeler	g/L
Et'den elde edilen Pepton	5,0
Et ekstrakt	3,0
Agar*	15

*Katı besiyeri hazırlamada kullanıldı.

3.1.2 Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları

Çalışmada kullanılan *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarının geliştirilmesi ve aktifleştirilmesinde MRS besiyeri, *Escherichia coli* ATCC 35218 suşunun geliştirilmesinde ve aktifleştirilmesinde Nutrient Broth besiyeri kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan bakteriler 37 ± 1 °C'de 24 saatlik aerobik inkübasyon ile geliştirilmiştir. Deneylerde iki kez aktifleştirilmiş kültürler kullanılmış ve deneyler sırasında Gram boyama tekniğiyle mikroskopik olarak kontaminasyon riskine karşı kontroller yapılmıştır.

3.1.3 Çalışmada kullanılan bakteri kültürleri

Deneylerde Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan ve Prof. Dr. Yavuz BEYATLI'dan temin edilen Türkiye'nin farklı bölgelerinde üretilen beyaz peynirlerden izole edilerek tanımlanmış 4 *Enterococcus faecium* ve 6 *Enterococcus faecalis* suşu kullanılmıştır. *Lactobacillus acidophilus* NCFM ve *Escherichia coli* ATCC 35218 referans kültürleri ise BSH çalışmalarında sırayla pozitif ve negatif kontrol grubu olarak test edilmiştir. Deneylerde kullanılan *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarının probiyotik özellikleri (antimikrobiyal aktivite, antibiyotik dirençlilikleri, laktik asit, hidrojen peroksit üretimleri, agregasyon, koagregasyon, yapay mide ve bağırsak sıvısında canlılık ve hidrofobisite) daha önce yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (Hajikhani, 2011; Onal Darılmaz vd., 2016a,b). Enterokokların güvenilir ve sağlıklı olmalarının en önemli göstergesi hemoliz aktivitesine ve virulans genlerine sahip olmamalarıdır. Çalışmada kullanılan suşlarda, vakomisin direnç genlerine ait *vanA*, *vanB* ve *vanC* genlerinin, virulans faktör olarak belirlenen sitolizin (*clyA*, *clyB*), Jeletinaz (*gelE*), enterokokkal yüzey proteini (*esp*), agregasyon faktörü (*asa1*), hücre agregasyonu ve konjugasyonu (*agg*), *E. faecalis* yüzey antijeni (*efaAfs*), *E. faecium* yüzey antijeni (*efaAfm*), seks

feromon determinantları (*cob*, *ccf*) ve hiyaluronidaz (*hyl*) virulans gen bölgeleri tespit edilmemiştir. Probiyotik olarak kullanımları sağlık açısından güvenli bulunmuştur (Oruç, 2019).

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan bakteri kültürleri.

No	Suşlar	İzolasyon Kaynağı Peynirler
1.	<i>Enterococcus faecium</i> RT 101	Urfa Peyniri (Tam Yağlı)
2.	<i>Enterococcus faecium</i> RT 81	Balıkesir (Yarım Yağlı)
3.	<i>Enterococcus faecium</i> RT 82	Balıkesir (Yarım Yağlı)
4.	<i>Enterococcus faecium</i> RT 94	Balıkesir (Yarım Yağlı)
5.	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 96	Urfa Peyniri (Tam Yağlı)
6.	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 98	Urfa Peyniri (Tam Yağlı)
7.	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 102	Urfa Peyniri (Tam Yağlı)
8.	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 84	Balıkesir (Yarım Yağlı)
9.	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 97	Urfa Peyniri (Tam Yağlı)
10.	<i>Enterococcus faecalis</i> RT 121	Balıkesir (Tam Yağlı)
11.	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ^a	NCFM
12.	<i>Escherichia coli</i> ^b	ATCC 35218

^a Referans suşu BSH deneylerinde pozitif kontrol olarak kullanıldı.

^b Referans suşu BSH deneylerinde negatif kontrol olarak kullanıldı.

3.1.4 Primerler

Enterococcus faecium ve *Enterococcus faecalis* bakterilerinde safra tuzu dekonjugasyonunda rol oynayan *bsh* geninin varlığının belirlenmesi amacıyla *bsh* genine ait olan spesifik primerler Çizelge 3.5’de verilmiştir.

Çizelge 3.5. *bsh* geninin belirlenmesinde kullanılan primerler.

Gen Bölgesi	Primer Dizisi 5’-3’	Tm (°C)
fecbsh	F- ATGTGTACAGGCATCAAG	52
fecbsh	R- GTAGCTCGTTAGAAACAGC	
faebsh	F- GAGTAATATGAACGTGGA	52
faebsh	R- AAATAATCAATCACAACACAC	

3.2 Yöntem

3.2.1 Bakteri kültürlerinin muhafazası

Deneylerde kullanılan suşlar uygun besiyerlerinde iki kez aktifleştirilmiştir. Cryo tüpler içerisine 0,4 mL gliserol eklenmiş ve otoklavda 121°C’de 1,5 atm basınçta 15 dk steril edilmiştir. Aktif kültürlerden 0,6 mL alınarak içerisinde steril gliserol bulunan tüplere aktararak, hazırlanan stoklar -40°C’de muhafaza edilmiş ve bütün stoklar 6 ayda bir yenilenmiştir.

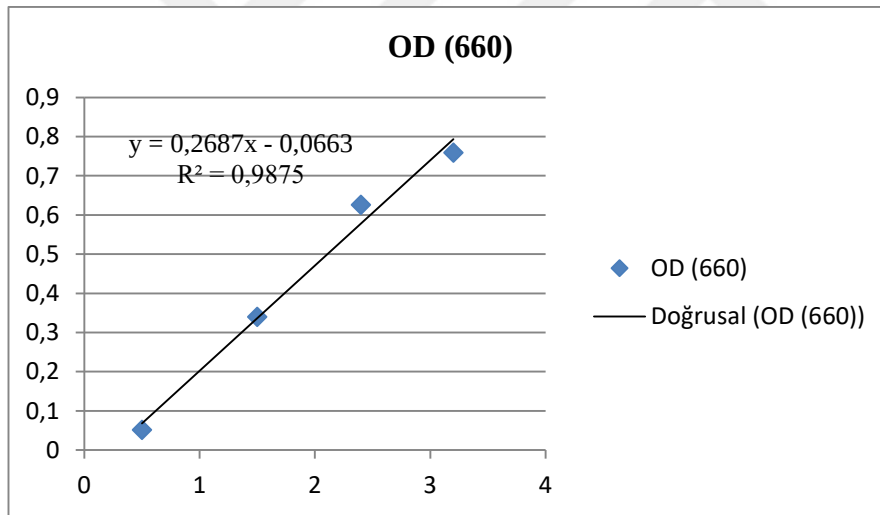
3.2.2 Bakteri kültürlerinin hazırlanması

Enterococcus sp. ve *L. acidophilus* NCFM suşlarının geliştirilmesinde MRS Broth ve MRS Agar besi ortamları kullanılmıştır. Her deney öncesi *Enterococcus* sp. ve *L. acidophilus* NCFM suşlarının 37°C’de 18-24 saat geliştirilen kültürleri en az iki kez aktifleştirilmiştir. Test bakterilerinden *E. coli* ATCC 35218’in aktivasyonunda NB besiyerinde 37°C’de 18 saat geliştirilen kültürler kullanılmıştır. Çalışma öncesi kültürlerin hücre yoğunlukları (Optikal Density, OD) spektrofotometrik olarak 600 nm’de ölçülmüş ve canlı hücre sayıları kob/mL olarak belirlenmiştir. Çalışmalarda $\sim 10^7$ kob/mL canlı hücreye sahip kültürler kullanılmıştır.

3.2.3 Glikolik asit (GCA) ve taurokolik asit (TCA) safra tuzlarının dekonjugasyonu

Bu çalışmada kolesterol giderim mekanizmalarından biri olan safra tuzlarının dekonjugasyon aktivitesi araştırılmıştır. TCA ve GCA safra tuzlarının dekonjugasyon aktivitesi Irvin vd. (1944) ve Yıldız vd. (2011) tarafından modifiye edilen metoda göre belirlenmiştir. %5 sodyum taurokolat ve % 5 sodyum glikokolat 0,45 µm’lik filtreden geçirilerek steril edilmiş ve 5 mL’lik MRS broth besiyerine eklenmiştir. Aktif *Enterococcus* sp. suşlarından hazırlanan besi ortamına % 2 oranında inokülasyon yapılarak 18-24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültür ortamının pH’sı 1M NaOH kullanılarak 7,0’a ayalarak ve 10000 rpm’de 4°C’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant temiz bir test tüpüne alınarak, pH’sı 10M HCl ile 1,0’a ayarlanmıştır. pH’sı ayarlanan süpernatantdan 1 mL temiz bir test tüpüne alınarak, üzerine 2 mL etil asetat eklenerek 1 dk boyunca vorteks ile karıştırılmıştır. Ayrılan etil asetat fazı, temiz bir test tüpüne alınarak etil asetat 60°C’de bir su banyosu

içerisinde buharlaştırılmıştır. Deney tüpünde kalan tortu 1 mL NaOH (0,01 M) ile çözülmüş üzerine 40,4 µL furfuraldehid ve 1 mL H₂SO₄ (16 M) ilave edilerek 1 dk süresince vorteks ile karıştırılarak, 65°C'lik su banyosunda 10 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra tüpler oda sıcaklığına gelene kadar soğutularak üzerine 2 mL glasiyel asetik asit eklenerek 1 dk boyunca vorteks ile karıştırılmıştır. Örneklerin absorbansı spektrofotometrede 600 nm'de okunmuştur. Dekonjugasyon sırasında açığa çıkan kolik asit miktarı Şekil 3.1'de verilen kolik asit standardı kullanılarak belirlenmiştir. İnokülasyon yapılmamış besiyeri kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Safra tuzlarının suşlar üzerinde toksik etkisi olup olmadığını belirlemek amacıyla, safra tuzlu MRS besiyerlerinde ve MRS (kontrol) gelişen kültürlerin canlılık oranları eş zamanlı olarak 48 saat inkübasyondan sonra kob/mL olarak belirlenmiştir. Deneylerde *L. acidophilus* NCFM pozitif kontrol, *E. coli* ATCC 35218 ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Kolik Asit Standardı.

3.2.4 Kolesterol ile dekonjuge safranin presipitasyonu

Bu çalışmada bir diğer kolesterol giderim mekanizması olan kolesterol ile dekonjuge safra tuzların düşük pH'da birlikte presipitasyonu yöntemi ile enterokok suşlarının kolesterol giderimleri Gilliland vd. (1985) ve Yıldız vd. (2011)'nin modifiye ettiği metoda göre belirlenmiştir. % 0,2, % 0,4 ve % 0,6 safra tuzları (oxgall) ve 100 µg/mL kolesterol (0,45 µm'lik filtrelerden geçirilerek steril edilen) 5 mL'lik MRS ortamına ilave edilmiştir. Aktif *Enterococcus* sp. suşlarının yoğunlukları OD:1'e ayarlanarak,

hazırlanan besiyerlerine % 2 oranında inoküle edilerek 37°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, kültürler 10000 rpm'de 4°C'de 20 dk boyunca santrifüjlenerek, süpertanattan 0,5 mL temiz bir test tüpüne alınmış üzerine 3 mL % 95 etanol ilave edilerek 1 dk boyunca vorteks ile karıştırılmış üzerine 2 mL %50 KOH çözeltisi ilave edilerek tekrar 1 dk süre ile vorteks ile karıştırılmış. Karışım daha sonra 10 dk boyunca bir su banyosunda 65°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, test tüpleri oda sıcaklığına (22°C) gelinceye kadar soğutulmuştur. Soğuyan tüplerin üzerine 5 mL hekzan ve 3 mL saf su ilave eklenerek hekzan fazının ayrılmasını sağlamak için 1 dk boyunca vorteks ile karıştırılmıştır. Ayrılan hekzan fazından 2,5 mL temiz bir test tüpüne alınarak hekzan bir su banyosunda 60°C'de buharlaştırılmıştır. Kalan tortuya 4 mL o-ftalaldehit reaktifi (o-ftalaldehit reaktifi:1 mL glasiyel asetik asit içinde çözünen 0,5 mg o-ftalaldehit içerir) ilave edilerek 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra örneklerle 2 mL sülfirik asit eklenerek 1 dk süresince vorteks ile karıştırılarak oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında örneklerin optikal yoğunluğu spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Kolesterol giderimi miktarlarını belirlemek için 10–150 µg/mL arasında değişen oranlarda kolesterol kullanılarak standart bir eğri çıkarılmış ve Şekil 3.2'de verilen bu standarda göre örneklerin kolesterol miktarları µg/mL olarak belirlenmiştir.

Suşların % kolestrol giderimi aşağıda belirtilen şekilde hesaplanmıştır;

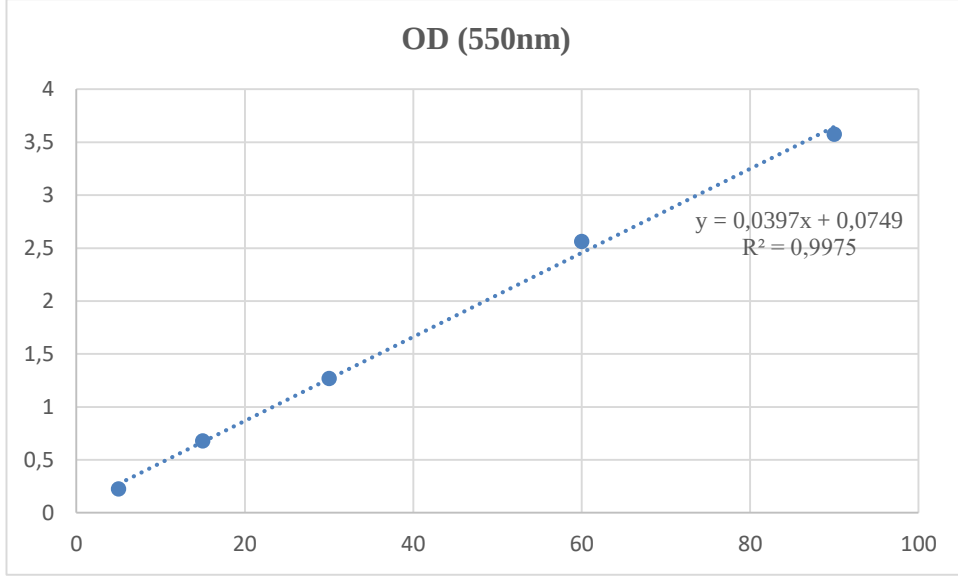
$$A = 100 - [(B / C) \times 100]$$

A: Kolesterolün giderimi (%).

B: İnokülasyon yapılan besi ortamındaki kolesterol miktarı (µg).

C: İnokülasyon yapılmayan (kontrol) besi ortamındaki kolesterol miktarı (µg).

Enterococcus sp. suşlarının safrasız, % 0,2, % 0,4 ve % 0,6 safra tuzları (oxgall) ve 100 mg/L kolesterol içeren MRS besi ortamında canlılıklarını belirlemek amacıyla bu ortamlarda geliştirilen suşlardan seri dilüsyonlar yapılarak yayma ekim yapılmış ve petriler 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda canlılık sayımları yapılmıştır. Kolesterol giderimi miktarlarını belirlemek için 5–150 µg/mL arasında değişen oranlarda kolesterol kullanılarak standart bir eğri çıkarılmıştır. Bu standarda göre örneklerin kolesterol miktarları µg/mL olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.2. Kolesterol miktarını belirlemek için oluşturulan kolesterol standardı.

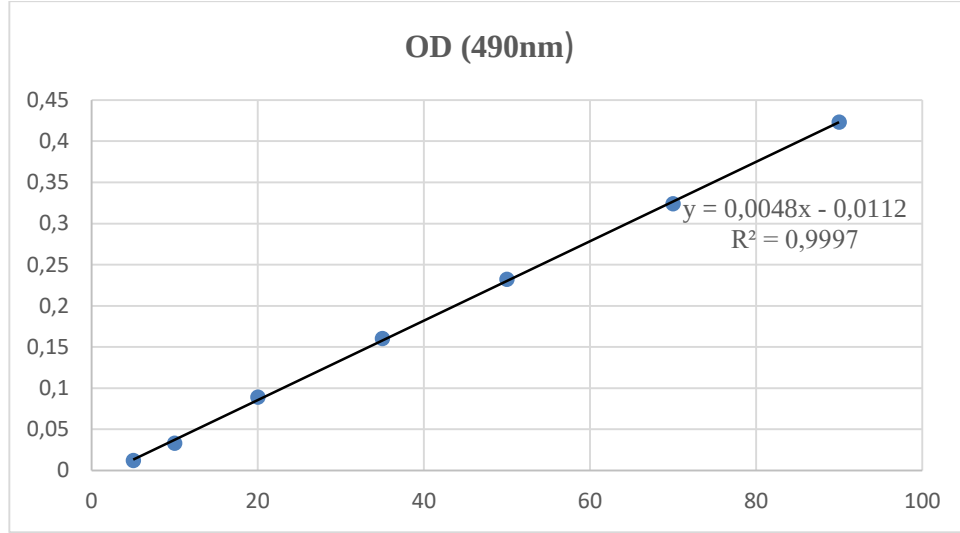
3.2.5 Prebiyotiğin (inülin), safra tuzlarının dekonjugasyonu ve kolesterol presipitasyonu üzerindeki etkisinin belirlenmesi

Yüksek safra tuzu dekonjugasyon ve yüksek kolesterol giderim yüzdesine sahip *Enterococcus* sp. suşları (*E. faecium* RT94 ve *E. faecalis* RT102) prebiyotik olarak kullanılan inülinin, safra tuzları dekonjugasyonu ve kolesterol ile dekonjuge safranin birlikte presipitasyonu üzerindeki etkisini belirlemek için % 5 oranında inülin ilave edilerek safra tuzları dekonjugasyon aktivitesi Bölüm 2.5.6.2 ve kolesterol presipitasyonu Bölüm 2.5.6.1’de anlatıldığı gibi test edilmiştir. Hazırlanan inulin stoğu 0,45 µm’lik filtreden geçirilerek steril edilmiş ve Bölüm 2.5 ve 2.6 da belirtilen besiyerlerine % 5 oranında ilave edilmiştir. Hazırlanan besi ortamına aktif *Enterococcus* sp. suşlarından % 2 oranında inokülasyon yapılarak 37°C’de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda Bölüm 2.5.6.2 ve 2.5.6.1’de verilen işlemler tekrarlanmıştır. Prebiyotikli ortamda gelişen kültürlerin son kültür pH’ları, canlılıkları (kob/mL) ve optik yoğunlukları (600 nm) belirlenmiştir. Bu çalışmada prebiyotiklerin, safra asitlerinin dekonjugasyonu ile kolesterol presipitasyonu üzerindeki etkisi arasındaki ilişki istatistiksel analizler ile belirlenmiştir.

3.2.6 Ekzopolisakkarit (EPS) üretiminin, safra tuzlarının dekonjugasyonu ve kolesterol presipitasyonu üzerindeki etkisinin belirlenmesi

Enterococcus sp. suşlarının EPS üretimleri ile safra tuzlarının dekonjugasyonu ve kolesterol ile dekonjuge safranın birlikte presipitasyonu arasındaki ilişkinin belirlenmesi için bu ortamlarda geliştirilen (Bölüm 2.5.6.2 ve 2.5.6.1) kültürlerin EPS üretimleri Li vd. (2012, 2014, 2016) ve Kšoňzeková vd. (2016)'den modifiye edilen metoda göre belirlenmiştir. Bu çalışmada MRS broth besiyerinde geliştirilen suşların EPS üretimleri (kontrol grubu), safra asitleri ile kolestrollü ortamdaki EPS üretimleri ile karşılaştırılarak arasındaki ilişki istatistiksel analizler ile belirlenmiştir.

Enterococcus sp. suşlarının EPS üretimleri, MRS (kontrol), safra asitleri içeren MRS (Bölüm 2.5.6.2) ve kolesterol içeren MRS besiyerlerinde (Bölüm 2.5.6.1) üç kez aktifleştirilen kültürlerinde ayrı ayrı belirlenmiştir. Bu besiyerlerindeki aktif kültürlerden 1 mL örnekler alınarak 100 °C'de 15 dk kaynatılmış ve daha sonra buz üzerinde soğutulmuştur. Oda sıcaklığına gelen kültürler 12000 rpm'de 15 dk 4°C'de santrifüj yapılarak süpernatant temiz bir eppendorfa alınmıştır. Süpernatantın üzerine 1,7 µL triklor asetik asit eklenerek (% 85 w/v) ve 4°C'de 2 saat inkübe edilmiş, örnekler 12000 rpm'de 30 dk 4°C'de santrifüj uygulanarak protein ve peptitler çöktürülmüştür. Süpernatant temiz eppendorfa alınarak üzerine 1 (örnek): 3 (alkol) oranında saf (absolute) alkol eklenerek karıştırılmış ve 4°C'de 1 gece inkübe edilmiştir. Bir gecelik inkübasyondan sonra örnekler 12000 rpm'de 30 dk 4°C'de santrifüj edilerek EPS çöktürülmüştür. Pellet üzerindeki alkol dökülerek tekrardan 500 µL alkol eklenerek tekrar 12000 rpm'de 30 dk 4°C'de santrifüj edilerek yıkama işlemi yapılmıştır. Pellet üzerinden alkol yeniden dökülerek kalan alkol 40°C'de uçurulmuştur. Elde edilen EPS 1 mL steril saf suda çözülerek, üzerine 0,5 mL fenol ve 5 mL sülfirik asit eklenerek oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örnekler vorteks ile karıştırılarak 30°C'de 15-20 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örneklerin optikal yoğunluğu spektrofotometrede 490 nm'de ölçülmüştür. Üretilen EPS miktarı Şekil 3.3'de verilen glukoz standardı (mg/L) kullanılarak belirlenmiştir. Standart 1 mL steril saf suda çözülerek hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki glukoz esas alınarak fenol sülfirik asit metoduna göre çıkarılmıştır (Dubois, 1956).



Şekil 3.3. EPS miktarını belirlemek için oluşturulan EPS Standardı.

3.2.7 Genomik DNA izolasyonu

Enterococcus sp. suşlarının ve *L. acidophilus* NCFM suşunun genomik DNA'ları, GeneJet Genomik DNA İzolasyon kiti (Thermo Scientific) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA'ların saflıkları ve miktarları nanodrop (Thermo Scientific, Nanodrop 200 spectrophotometer) kullanılarak 260 ve 280 nanometre dalga boylarında ölçülerek belirlenmiştir. İzole edilen genomik DNA'lar sonraki çalışmada kullanılmak üzere -40°C'de saklanmıştır. Çalışmada *L. acidophilus* NCFM suşu ve *E. coli* ATCC 35218 suşları referans suş olarak kullanılmıştır.

3.2.8 *bsh* genin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması ve sekans analizi

PZR reaksiyon karışımı (50 µL) 100 ng kalıp DNA, 5 µL 10X tampon, 5,0 birim Taq DNA polimeraz (ThermoScientific), 0,2 mM her bir deoksiribonükleotid trifosfat (dNTP) (ThermoScientific), 200 µM ileri ve geri primerler ve 1,5 mM MgCl₂ içermektedir. PZR reaksiyon döngüleri şu şekildedir: 95°C'de 1 dk süreyle ilk denatürasyon, ardından 32 döngü, 95 °C'de 30 saniye denatürasyon, 52°C'de 30 saniye primer bağlanması ve 72°C'de 1 dk, primer uzaması ve 72°C 'de 10 dk son uzatmadan oluşmuştur. Negatif kontrol olarak nükleaz içermeyen saf su ve *E. coli* 35218 referans suşu, pozitif kontrol olarak *L. acidophilus* NCFM suşu kullanılmıştır. PZR amplikonları, 1 saat 70 V'de % 1 (w/v) agaroz jel elektroforezi ve ardından etidyum

bromür boyama (0,5 mg/mL) ile ayrılmıştır. PZR amplikonları, Jel Ekstraksiyon Kiti (Macherey-Nagel) kullanılarak saflaştırılmış ve EPIGEN Biyoteknoloji, Ankara-Türkiye'de hizmet alımı ile sekans analizi yapılmıştır. Gen dizileri, GenBank veritabanı, BLAST ağ hizmeti (NCBI) kullanılarak homoloji açısından araştırılmıştır.

3.2.9 İstatiksel değerlendirme

Tüm çalışmalar 3 paralelli olarak yapılmış ve ortalama değerler verilmiştir. Elde edilen veriler, SPSS 22.0 istatiksel programda değerlendirilmiştir. Kolesterol seviyesinin düşürülmesinde önerilen safra tuzları dekonjugasyonu ve kolesterol ile dekonjuge safranin presipitasyonu mekanizmaları ile EPS üretim ya da prebiyotik (inulin) etkisi arasındaki ilişkinin önemi One-way ANOVA ve korelasyon analizleri ile belirlenmiştir.

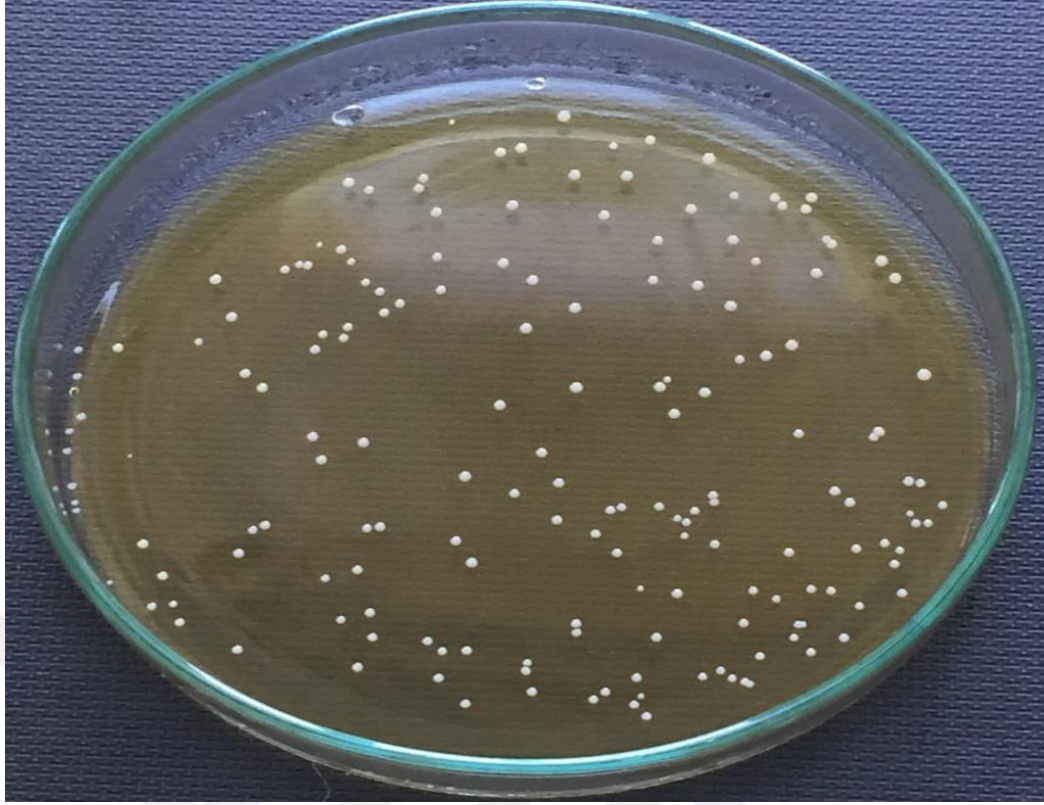
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Glikolik asit (GCA) ve Taurokolik asit (TCA) Safra Tuzlarının Dekonjugasyonu

% 5 (w/v) TCA ve % 5 (w/v) GCA içeren MRS broth besi ortamında geliştirilen *Enterococcus* sp. suşlarının safra tuzları dekonjugasyonu, canlılıkları ve EPS üretimleri Çizelge 4.1’de verilmiştir. *Enterococcus* sp. suşları TCA’yı dekonjüge edemezken, GCA’yı (0,37-1,93 mM) dekonjüge edebildiği belirlenmiştir. En yüksek GCA dekonjugasyon aktivitesi *Enterococcus faecium* RT94 suşunda (1,93 mM) gözlenirken, en düşük dekonjugasyon aktivitesi *Enterococcus faecalis* RT122 suşunda (0,37 mM) gözlenmiştir. *E. faecium* RT 81 ve *E. faecalis* RT98 suşlarında GCA dekonjugasyonu gözlenmemiştir. *Enterococcus* sp. suşlarının TCA içeren besi ortamında canlılıkları 8,57 – 9,34 log kob/mL olarak belirlenmiş ve ortamın pH değeri 4,42 ile 4,57 arasında değiştiği tespit edilmiştir. pH ve GCA dekonjugasyonu arasında yapılan istatistiksel çalışmada anlamlı bir ilişki olduğu belirlenmiştir ($P < 0,05$). Ayrıca canlılık ile GCA dekonjugasyonu arasında da anlamlı bir ilişki olduğu gözlenmiştir ($P < 0,05$). Dekonjugasyon ile pH arasında bir korelasyon tespit edilmemiştir. GCA içeren MRS ortamında *E. faecalis* RT96 suşunun koloni morfolojisi Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. *Enterococcus* sp. suşlarının safra tuzları dekonjugasyonları, canlılıkları ve EPS üretimleri.

Suşlar	Sodyum Taurokolat (TCA)				Sodyum Glikokolat (GCA)			
	Son kültür pH	Log kob/mL	Kolik asit (mM)	EPS (mg/L)	Son kültür pH	Log kob/mL	Kolik asit (mM)	EPS (mg/L)
<i>E. faecium</i> RT 94	4,57±0,03	8,57 ± 0,08	-	222,04 ± 35,42	4,75±0,05	7,82 ± 0,02	1,93±0,22	224,23 ± 24,48
<i>E. faecium</i> RT 101	4,32±0,01	3,56 ± 0,01	-	244,33 ± 15,63	4,79±0,04	4,26 ± 0,12	1,09±0,11	254,75 ± 46,63
<i>E. faecium</i> RT 81	4,52±0,06	2,70 ± 0,00	-	172,66 ± 31,45	4,84±0,01	4,20 ± 0,70	-	226,52 ± 74,47
<i>E. faecium</i> RT 82	4,28±0,01	8,00 ± 0,12	-	246,96 ± 52,71	4,48±0,00	8,56 ± 0,15	0,41	261,83 ± 63,33
<i>E. faecalis</i> RT 98	4,41±0,01	3,79 ± 0,72	-	140,37 ± 17,5	4,80±0,02	2,66 ± 0,93	-	172,88 ± 13,54
<i>E. faecalis</i> RT 96	4,49±0,04	9,00±0,05	-	265,69 ± 11,98	4,81±0,03	5,00±0,80	0,91±0,00	305,89 ± 36,35
<i>E. faecalis</i> RT 97	4,42±0,01	8,96±0,14	-	256,83 ± 0,42	4,78±0,01	4,18±0,14	0,97±0,00	312,77 ± 10,52
<i>E. faecalis</i> RT 122	4,48±0,01	9,00±0,18	-	246,10 ± 14,06	4,86±0,01	3,42±0,27	0,37±0,14	309,33 ± 58,54
<i>E. faecalis</i> RT 102	4,46±0,01	9,34±0,26	-	194,65 ± 0,31	4,87±0,01	2,0±0,0	1,72±0,42	263,5 ± 11,66
<i>E. faecalis</i> RT 84	4,47±0,01	9,27±0,03	-	241,42 ± 8,33	4,93±0,01	2,37±0,1	1,87±0,32	251,62 ± 40,83
<i>L. acidophilus</i> NCFM	4,30±0,00	9,01±0,21	-	-	4,50±0,00	6,75±0,17	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 35218	6,99±0,01	8,39 ± 0,06	-	-	6,99±0,01	8,22 ± 0,06	-	-



Şekil 4.1. GCA içeren MRS ortamında *E. faecalis* RT96 koloni morfolojisi.

4.2 Kolesterol ile Dekonjuge Safranin Presipitasyonu

Safrasız, % 0,2, % 0,4 ve % 0,6 safra tuzları (oxgall) ve 100 µg/mL kolesterol içeren MRS besi ortamında 18-24 saat geliştirilen *Enterococcus* sp. suşlarının inkübasyon süresi sonunda tespit edilen presipitasyon, % kolesterol giderimi ve son kültür pH değerleri Çizelge 4.3’de verilmiştir. Ortalama olarak en yüksek presipitasyon % 0,6 safra içeren ortamda *E. faecalis* RT96 suşunda belirkenirken (4,81 µg/mL), en düşük presipitasyon safrasız ortamda *E. faecium* RT94 suşunda (2,20 µg/mL) belirlenmiştir. Ancak en yüksek % kolesterol giderimi safrasız ortamda *E. faecium* RT94 (% 50) ve *E. faecalis* RT102 (% 45) suşlarında belirlenmiştir. *E. faecium* RT82 suşu % 0,2 safra içeren ortamda (% 30) ve % 0,6 safra içeren ortamda (%15), *E. faecalis* RT122 suşu ise % 0,4 safra içeren ortamda (% 30) en yüksek % kolesterol giderimi sağladığı belirlenmiştir. Kolesterol ile % 0,4 ve % 0,6 safra içeren ortamlardaki ve % 0,2 ile % 0,6 safra içeren ortamdaki presipitasyonların ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($P < 0,05$). *E. faecalis* RT102 ve *E. faecalis* RT84 suşlarının tüm safra konsantrasyonlarında yüksek presipitasyon aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir.

Enterococcus sp. suşlarının kolesterol presipitasyonu sonucunda son kültür pH değerleri incelendiğinde en düşük pH değeri % 0,2 safra içeren ortamda *E. faecium* RT82 suşunda (6,01), en yüksek pH değeri % 0,2 ve % 0,4 safra içeren besi ortamında *E. faecalis* RT96 (6.80) suşunda belirlenmiştir. % 0,2 safra içeren ortamda presipitasyon ve pH arasında ($P=0,162$, $P > 0,05$) ve kontrol olarak kullanılan safrasız safra içeren besi ortamında presipitasyon ve pH arasında da korelasyon bulunamamıştır ($P=0,568$, $P > 0,05$). *Enterococcus* sp. suşlarının kolesterol presipitasyonu ile pH arasında herhangi bir ilişki belirlenmemiştir.

Enterococcus sp. suşlarının safrasız, % 0,2, % 0,4 ve % 0,6 safra içeren ortamdaki canlılıkları Çizelge 4.2’de verilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *Enterococcus* sp. suşlarının 100 µg/mL kolesterol ve farklı safra konsantrasyonu içeren besi ortamlarında canlılıklarının önemli düzeyde değişmediği belirlenmiştir. En yüksek canlılık % 0,4 safra içeren besi ortamında *E. faecalis* RT97 suşunda (8,37 kob/mL), en düşük canlılık % 0,4 safra içeren besi ortamında *E. faecalis* RT102 suşunda (6,64 kob/mL) belirlenmiştir. % 0,2 safra içeren ortamda canlılık ile presipitasyon arasında ($P=0,97$, $P > 0,05$) korelasyon tespit edilmemiştir. Ortalama en yüksek canlılığın % 0,4 safra içeren ortamda olduğu belirlenmiştir. Safrasız besi ortamında presipitasyon ile canlılık arasında korelasyon bulunmamıştır ($P=0,771$, $P > 0,05$). %0,2 safra içeren ortamda canlılık ile presipitasyon arasında ($P=0,568$, $P>0,05$) ve % 0,4 safra içeren ortamda canlılık ile presipitasyon arasında ($P=0,224$, $P > 0,05$) korelasyon belirlenmemiştir. *Enterococcus* sp. suşlarının presipitasyon aktivitesi ile canlılık arasında bir ilişki belirlenmemiştir.

% 0,4 safra içeren ortamda pH ile presipitasyon arasında ($P=0,229$, $P > 0,05$) ve aynı ortamda canlılık ile presipitasyon arasında korelasyon belirlenmemiştir ($P=0,224$, $P > 0,05$). % 0,6 safra içeren ortamda pH ile presipitasyon arasında ($P=0,256$, $P > 0,05$) ve aynı ortamda canlılık ile presipitasyon arasında korelasyon tespit edilmemiştir ($P=0,196$, $P > 0,05$). *Enterococcus* sp. suşlarının presipitasyon, pH üretimi ve canlılıkları arasında yapılan istatistik analizi sonucu herhangi bir ilişki belirlenmemiştir. *E. faecium* RT94 suşunun kolesterol presipitasyon görüntüsü Şekil 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. *Enterococcus* sp. suşlarının safrasız, % 0,2, % 0,4 ve % 0,6 safra içeren ortamdaki canlılıkları (Log kob/mL).

SUŞ	MRS (Kontrol)	Kolesterol	% 0,2 Safra	% 0,4 Safra	% 0,6 Safra
RT 81	9,61 ± 0,17	7,17 ± 0,12	7,16 ± 0,11	7,13 ± 0,09	6,81 ± 0,18
RT 82	9,13 ± 0,02	6,82 ± 0,05	6,55 ± 0,11	6,36 ± 0,21	7,01 ± 0,08
RT 84	9,61 ± 0,41	6,93 ± 0,25	7,30 ± 0,05	7,48 ± 0,10	7,48 ± 0,22
RT 94	9,48 ± 0,20	7,50 ± 0,23	7,31 ± 0,15	7,80 ± 0,08	7,26 ± 0,07
RT 96	9,60 ± 0,23	7,40 ± 0,13	7,18 ± 0,09	7,51 ± 0,02	7,39 ± 0,15
RT 97	9,67 ± 0,19	7,84 ± 0,24	7,87 ± 0,18	8,37 ± 0,18	7,91 ± 0,19
RT 98	9,77 ± 0,11	7,56 ± 0,01	7,28 ± 0,13	7,43 ± 0,20	7,50 ± 0,07
RT 101	9,87 ± 0,06	7,21 ± 0,14	7,07 ± 0,12	7,03 ± 0,24	6,85 ± 0,14
RT 102	9,79 ± 0,08	7,44 ± 0,13	6,91 ± 0,24	6,64 ± 0,29	6,71 ± 0,23
RT 122	9,261 ± 0,07	7,20 ± 0,01	7,12 ± 0,26	7,23 ± 0,04	7,13 ± 0,19
NCFM	10,07 ± 0,01	7,45 ± 0,08	6,75 ± 0,39	5,65 ± 0,38	5,98 ± 0,28

Çizelge 4.3. *Enterococcus* sp. suşlarının safrasız, % 0,2, % 0,4 ve % 0,6 safra tuzları (oxgall) ve 100 µg/mL kolesterol içeren MRS besi ortamlarındaki kolesterol presipitasyonları.

	Kolesterol + Bakteri			% 0,2 Safra + Bakteri		
Suşlar	Son kültür pH	Kolesterol presipitasyonu µg/mL	Kolesterol Giderimi (%)	Son kültür pH	Kolesterol presipitasyonu µg/mL	Kolesterol Giderimi (%)
RT 81	6,34 ± 0,01	3,56 ± 0,52	%20	6,30 ± 0,02	4,03 ± 0,48	%2
RT 82	5,97 ± 0,01	3,37 ± 0,38	%24	6,01 ± 0,01	2,80 ± 0,35	%32
RT 94	6,48 ± 0,01	2,20 ± 0,10	%50	6,52 ± 0,01	2,87 ± 0,58	%30
RT 101	6,65 ± 0,02	2,42 ± 0,63	%45	6,62 ± 0,02	2,72 ± 0,27	%34
RT 96	6,69 ± 0,04	3,39 ± 0,10	%23	6,80 ± 0,04	3,97 ± 1,16	%4
RT 97	6,58 ± 0,01	2,89 ± 0,71	%35	6,63 ± 0,01	2,89 ± 0,72	%30
RT 98	6,59 ± 0,04	3,68 ± 0,14	%17	6,61 ± 0	3,78 ± 0,43	%8
RT 84	6,26 ± 0,01	2,64 ± 0,42	%40	6,28 ± 0,02	2,99 ± 0,52	%27
RT 102	6,30 ± 0,02	2,43 ± 1,01	%45	6,35 ± 0,01	3,12 ± 0,74	%24
RT 122	6,43 ± 0,04	3,10 ± 1,13	%30	6,43 ± 0,04	3,68 ± 0,33	%11
NCFM	6,12 ± 0,08	3,44 ± 0,47	%22	6,33 ± 0,07	3,15 ± 0,35	%24

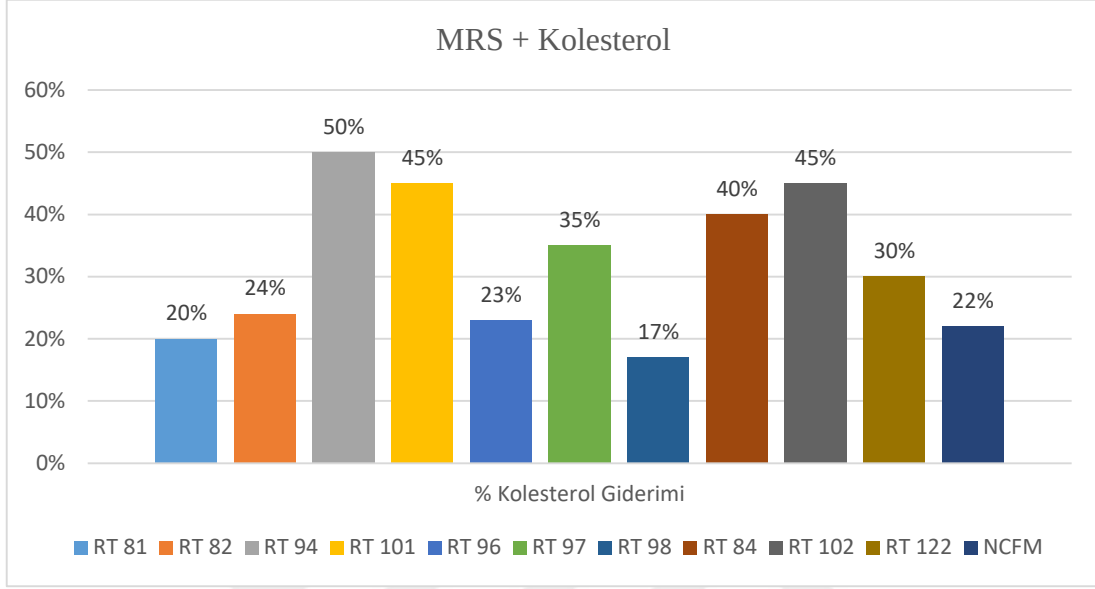
Çizelge 4.3 (devam). *Enterococcus* sp. suşlarının safrasız, % 0,2, % 0,4 ve % 0,6 safra tuzları (oxgall) ve 100 µg/mL kolesterol içeren MRS besi ortamlarındaki kolesterol presipitasyonları.

	Kolesterol + Bakteri			% 0,4 Safra + Bakteri		
Suşlar	Son kültür pH	Kolesterol presipitasyonu µg/mL	Kolesterol Giderimi (%)	Son kültür pH	Kolesterol presipitasyonu µg/mL	Kolesterol Giderimi (%)
RT 81	6,34 ± 0,01	3,56 ± 0,52	%20	6,32 ± 0,03	3,78 ± 0,41	%10
RT 82	5,97 ± 0,01	3,37 ± 0,38	%24	6,07 ± 0,01	3,23 ± 0,86	%23
RT 94	6,48 ± 0,01	2,20 ± 0,10	%50	6,55 ± 0,02	4,67 ± 0,11	-
RT 101	6,65 ± 0,02	2,42 ± 0,63	%45	6,65 ± 0,02	3,04 ± 0,16	%28
RT 96	6,69 ± 0,04	3,39 ± 0,10	%23	6,80 ± 0,06	4,09 ± 0,72	%3
RT 97	6,58 ± 0,01	2,89 ± 0,71	%35	6,66 ± 0,01	3,95 ± 0,60	%6
RT 98	6,59 ± 0,04	3,68 ± 0,14	%17	6,70 ± 0,01	3,64 ± 0,02	%14
RT 84	6,26 ± 0,01	2,64 ± 0,42	%40	6,34 ± 0,01	3,78 ± 0,29	%29
RT 102	6,30 ± 0,02	2,43 ± 1,01	%45	6,46 ± 0,01	3,39 ± 0,33	%20
RT 122	6,43 ± 0,04	3,10 ± 1,13	%30	0,44 ± 0,01	2,96 ± 0,77	%30
NCFM	6,12 ± 0,08	3,44 ± 0,47	%22	6,39 ± 0,03	3,53 ± 1,67	%16

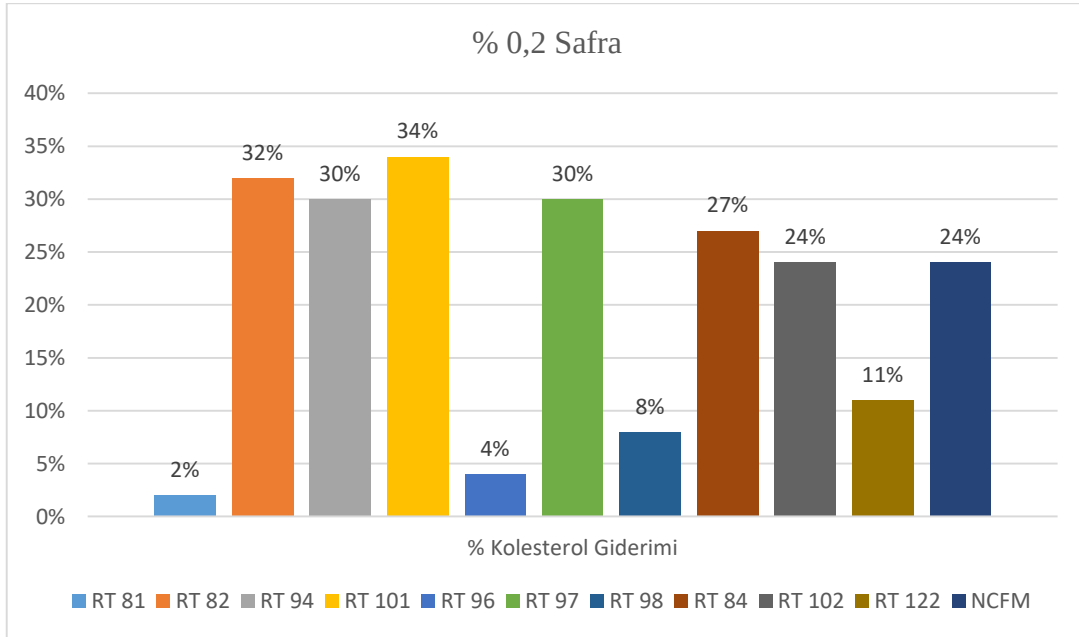
Çizelge 4.3 (devam). *Enterococcus* sp. suşlarının safrasız, % 0,2, % 0,4 ve % 0,6 safra tuzları (oxgall) ve 100 µg/mL kolesterol içeren MRS besi ortamlarındaki kolesterol presipitasyonları.

	Kolesterol + Bakteri			% 0,6 Safra + Bakteri		
Suşlar	Son kültür pH	Kolesterol presipitasyonu µg/mL	Kolesterol Giderimi (%)	Son kültür pH	Kolesterol presipitasyonu µg/mL	Kolesterol Giderimi (%)
RT 81	6,34 ± 0,01	3,56 ± 0,52	%20	6,32 ± 0,02	4,50 ± 0,53	-
RT 82	5,97 ± 0,01	3,37 ± 0,38	%24	6,33 ± 0,26	3,36 ± 0,33	%15
RT 94	6,48 ± 0,01	2,20 ± 0,10	%50	6,57 ± 0,02	4,31 ± 0,09	-
RT 101	6,65 ± 0,02	2,42 ± 0,63	%45	6,68 ± 0,03	3,85 ± 0,14	%2
RT 96	6,69 ± 0,04	3,39 ± 0,10	%23	6,74 ± 0,02	4,81 ± 0,96	-
RT 97	6,58 ± 0,01	2,89 ± 0,71	%35	6,68 ± 0,01	3,65 ± 0,49	%7
RT 98	6,59 ± 0,04	3,68 ± 0,14	%17	6,72 ± 0,01	5,13 ± 2,94	-
RT 84	6,26 ± 0,01	2,64 ± 0,42	%40	6,34 ± 0,02	3,58 ± 0,38	%9
RT 102	6,30 ± 0,02	2,43 ± 1,01	%45	6,40 ± 0,03	3,83 ± 0,15	%2
RT 122	6,43 ± 0,04	3,10 ± 1,13	%30	6,49 ± 0,02	4,68 ± 0,79	-
NCFM	6,12 ± 0,08	3,44 ± 0,47	%22	6,22 ± 0,02	3,12 ± 0,18	%21

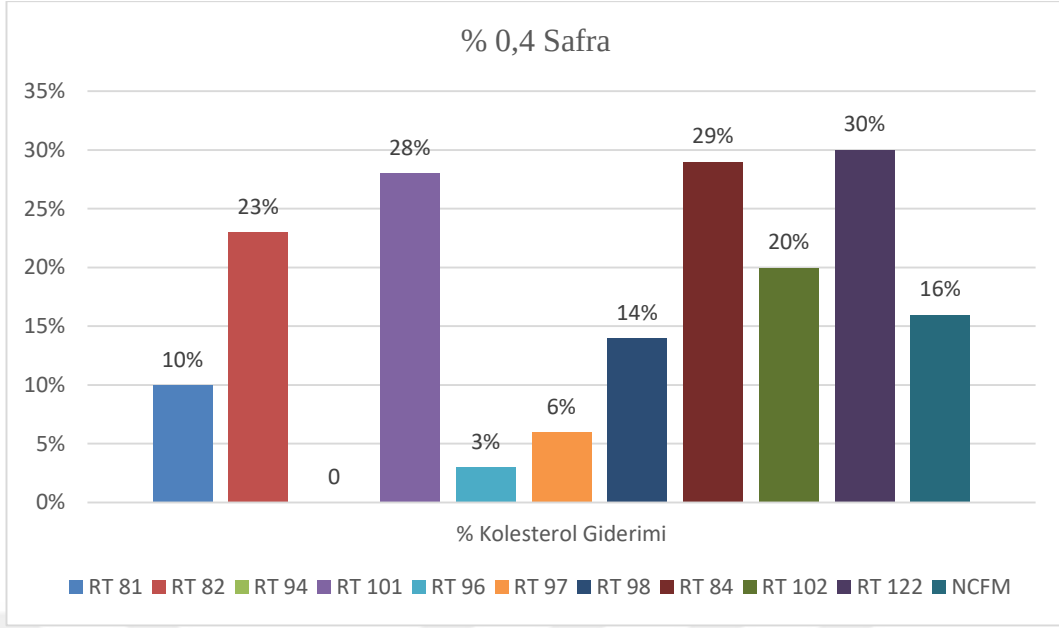
Safrasız, %0,2, %0,4 ve %0,6 safra içeren ortamda *Enterococcus* sp. suşlarının % kolesterol giderimleri Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5’de gösterilmiştir. *Enterococcus* sp. suşlarına ait farklı safra konsantrasyonu içeren ortamlardaki koloni morfolojileri ise Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de verilmiştir.



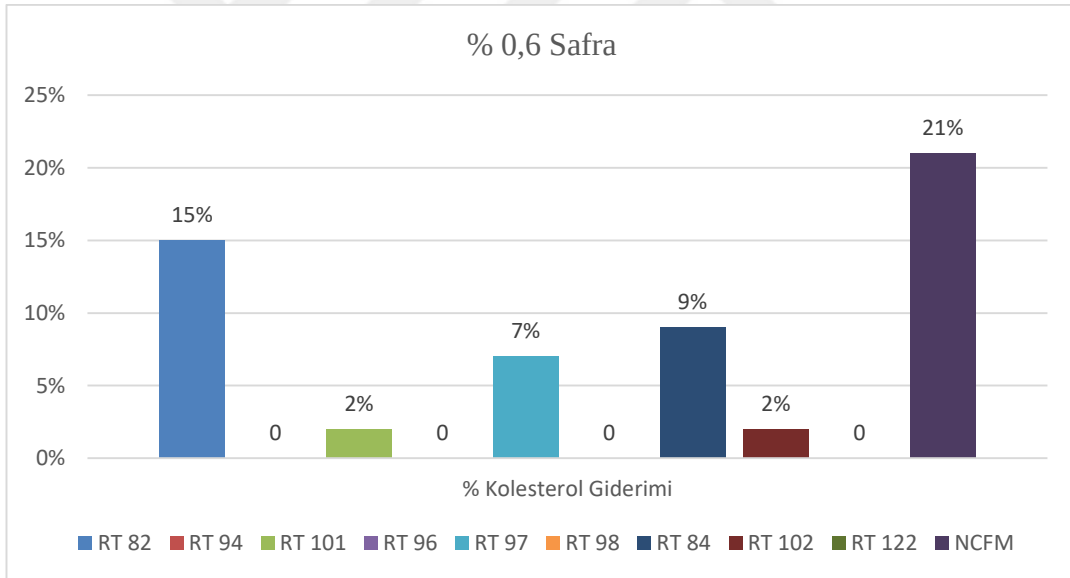
Şekil 4.2. Kolesterol içeren ortamda *Enterococcus* sp. suşlarının kolesterol giderim yüzdeleri.



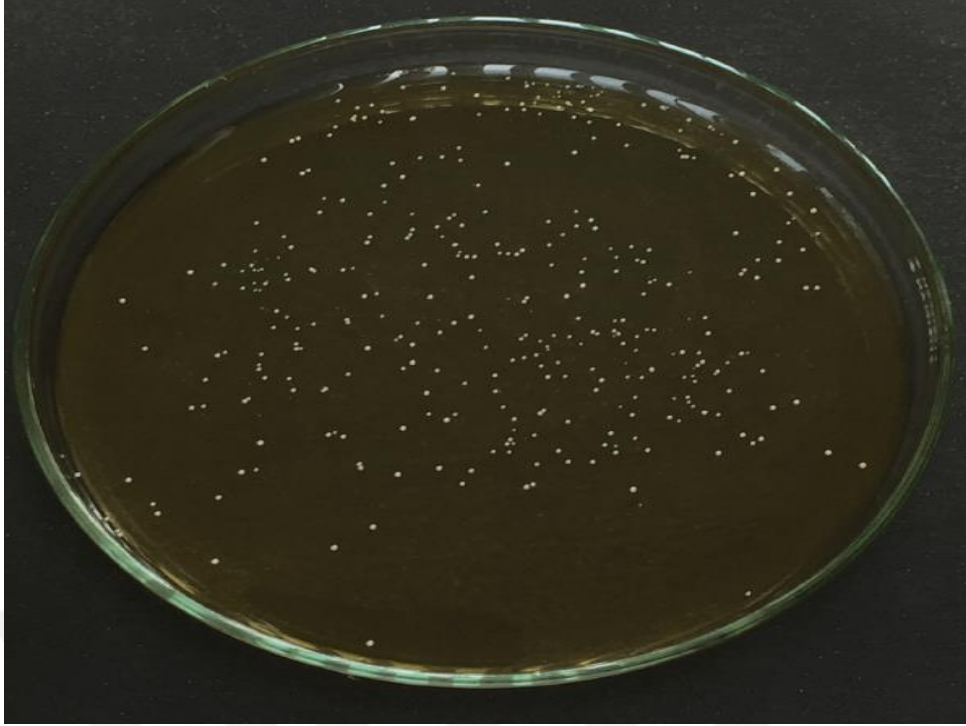
Şekil 4.3. % 0,2 Safra içeren ortamda *Enterococcus* sp. suşlarının kolesterol giderim yüzdeleri.



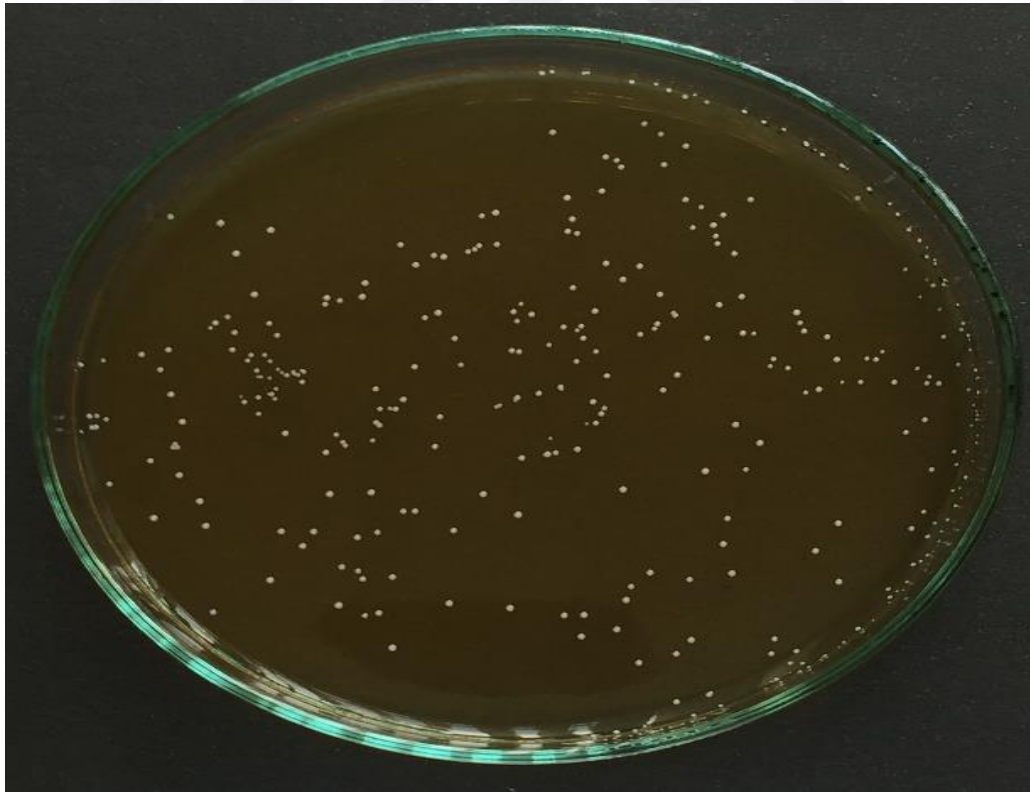
Şekil 4.4. % 0,4 Safra içeren ortamda *Enterococcus* sp. suşlarının kolesterol giderim yüzdeleri.



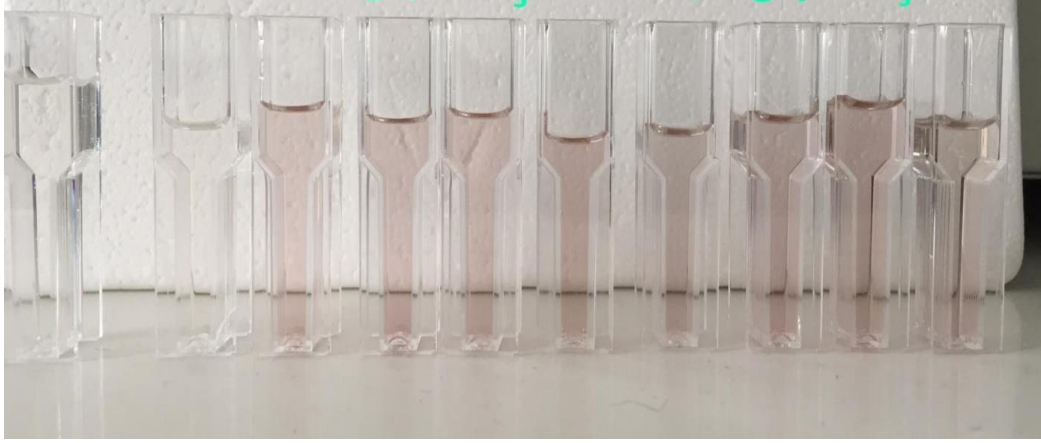
Şekil 4.5. % 0,6 Safra içeren ortamda *Enterococcus* sp. suşlarının kolesterol giderim yüzdeleri.



Şekil 4.6. % 0,4 Safra içeren MRS ortamında *E. faecalis* RT98 suşunun koloni morfolojisi.



Şekil 4.7. % 0,6 Safra içeren MRS ortamında *E. faecalis* RT98 suşunun koloni morfolojisi.



Şekil 4.8. *E. faecium* RT94 suşunun kolesterol presipitasyon görüntüsü.

4.3 Ekzopolisakkarit (EPS) Üretiminin, Safra Tuzlarının Dekonjugasyonu ve Kolesterol Presipitasyonu Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

TCA (%5) ve GCA (%5) içeren MRS besi ortamında geliştirilen *Enterococcus* sp. suşlarının 18-24 saat inkübasyon sonucu EPS üretimi Çizelge 4.1’de gösterilmiştir. *Enterococcus* sp. suşlarının EPS üretimi TCA içeren ortamda 140,37-265,69 mg/L olarak belirlenirken GCA içeren ortamda 172,88-312,77 mg/L olarak belirlenmiştir. TCA içeren ortamda en yüksek EPS üreten suş *E. faecalis* RT96 (265,69 mg/L), en düşük EPS üretimine sahip suş *E. faecalis* RT98 (140,37 mg/L) olarak belirlenmiştir. GCA içeren ortamda en yüksek EPS üreten suş *E. faecalis* RT97 (312,77 mg/L), en düşük EPS üretimine sahip olan suş *E. faecalis* RT98 (172,88 mg/L) olarak tespit edilmiştir. *Enterococcus* sp. suşlarının ortalama EPS üretimlerinin GCA içeren ortamda (258,33 mg/L), TCA içeren ortama (223,07mg/L) göre daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Safrasız, % 0,2, % 0,4 ve % 0,6 safra ve 100 µg/mL kolesterol içeren MRS besi ortamında yetiştirilen *Enterococcus* sp. suşlarının 18-24 saat inkübasyon sonucu EPS üretimleri Çizelge 4.4’de gösterilmiştir. En yüksek EPS üretimi safrasız ortamda *E. faecalis* RT97 (689,64 mg/L) suşunda belirlenirken, en düşük EPS üretimi % 0,6 safra içeren ortamda *E. faecalis* RT96 (220,69 mg/L) suşunda belirlenmiştir. Ortalama EPS üretimi en yüksek safrasız ortamda belirlenirken en düşük % 0,6 safra içeren ortamda belirlenmiştir. *E. faecalis* RT97 ve *E. faecalis* RT102 suşları safrasız ve % 0,2 safra içeren ortamda yüksek EPS üretimine sahipken % 0,4 ve % 0,6 safra

konsantrasyonlarında EPS üretimlerinde azalma olduğu belirlenmiştir. *E. faecalis* RT84 suşunda safrasız besi ortamında 366,63 mg/L EPS üretimi belirlenirken % 0,6 safra içeren ortamda EPS üretimi 443,81 mg/L olarak belirlenmiştir. Safra konsantrasyonunun artması EPS üretimini artırmıştır. *E. faecium* RT82 suşunda ise artan safra konsantrasyonunun paralel olarak EPS üretiminin azaldığı belirlenmiştir. *E. faecalis* RT94 suşunun EPS çalışmasının görüntüsü Şekil 4.9’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. *Enterococcus* sp. suşlarının kolesterol ve farklı safra konsantrasyonlarında EPS üretimleri (mg/L).

Suşlar	Kolesterol + Bakteri	0,2 Safra + Bakteri	0,4 Safra + Bakteri	0,6 Safra + Bakteri
RT 81	380,89 ± 89,48	453,29 ± 18,96	460,89 ± 16,98	385,89 ± 0,52
RT 82	416,21 ± 83,75	367,87 ± 8,12	354,95 ± 19,79	263,08 ± 17,5
RT 94	432,94 ± 40,08	375,65 ± 15,13	443,77 ± 44,53	331,69 ± 24,35
RT 101	435,93 ± 32,7	400,79 ± 24,33	406,52 ± 16,77	382,56 ± 11,35
RT 96	484,05 ± 53,75	487,94 ± 73,69	326,69 ± 84,56	220,69 ± 10,52
RT 97	689,64 ± 28,23	406,55 ± 30,11	386,72 ± 9,68	386,52 ± 21,56
RT 98	446,21 ± 20,21	501,31 ± 54,48	527,35 ± 127,18	370,06 ± 3,43
RT 84	366,63 ± 18,75	440,17 ± 32,92	419,02 ± 43,02	443,81 ± 36,35
RT 102	504,02 ± 101,35	516,10 ± 4,27	411,52 ± 66,35	427,25 ± 29,16
RT 122	431,63 ± 4,58	441,83 ± 20,41	371,83 ± 50,21	228,81 ± 30,1
NCFM	380,89 ± 89,48	453,29 ± 18,96	460,89 ± 16,98	385,89 ± 0,52



Şekil 4.9. *E. faecalis* RT94 suşunun EPS çalışmasının görüntüsü.

4.4 Prebiyotiğin (İnülin), Safra Tuzlarının Dekonjugasyonu ve Kolesterol Presipitasyonu Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

%5 oranında prebiyotik (İnülin) içeren MRS besi ortamında geliştirilen *Enterococcus* sp. suşlarının dekonjugasyon, canlılık, son kültür pH ve EPS üretimleri Çizelge 4.5’de gösterilmiştir. *Enterococcus* sp. suşları 18-24 saat inkübasyon sonunda hem TCA’yı hem de GCA’yı dekonjuge edebilmişlerdir. Prebiyotik ve TCA içeren ortamda *E. faecium* RT94 (1,05 mM) suşunun *E. faecalis* RT102 (0,91 mM) suşuna göre daha yüksek dekonjugasyon aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Prebiyotik ve GCA içeren ortamda ise *E. faecalis* RT102 (1,07 mM) suşunun *E. faecium* RT94 (0,78 mM) suşundan daha yüksek dekonjugasyon aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Besi ortamına prebiyotik ilave edilmesi *Enterococcus* sp. suşlarının TCA dekonjugasyonunu artırdığı fakat GCA dekonjugasyonunda azalmaya sebep olduğu belirlenmiştir.

Prebiyotik ve TCA içeren besi ortamında *E. faecium* RT94 suşunun (3,09 kob/mL), *E. faecalis* RT102 (8,44 kob/mL) suşuna kıyasla düşük canlılık gösterdiği belirlenmiştir. Prebiyotik ve TCA içeren ortamda *E. faecium* RT94 suşunun dekonjugasyon aktivitesinin artışı ile canlılığının azaldığı belirlenmiştir.

Prebiyotik içermeyen besi ortamında *E. faecium* RT94 ve *E. faecalis* RT102 suşlarının TCA dekonjugasyonu sırasında son kültür pH değerleri sırası ile 4,57 ve 4,46 iken prebiyotik içeren besi ortamında son kültür pH değerlerinin sırası ile 3,10 ve 3,11

olduğu belirlenmiştir. Besi ortamında prebiyotik eklenmesinin son kültür pH değerinde azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir.

Prebiyotik, 100 µg/ml kolesterol ve % 0,2, % 0,4 ve % 0,6 safra içeren besi ortamlarında *Enterococcus* sp. suşlarının 18-24 saat inkübasyon sonunda presipitasyon, canlılık, son kültür pH ve EPS üretimleri Çizelge 4.6'de gösterilmiştir. En yüksek kolesterol presipitasyonu *E. faecium* RT94 suşunda % 0,6 safra içeren ortamda (3,39 µg/ml), en düşük kolesterol presipitasyonunun safrasız ortamda (1,53 µg/mL) *E. faecalis* RT102 suşunda olduğu belirlenmiştir.

% 0,2 safra ve % 0,6 safra içeren besi ortamlarında pH arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmiştir ($P < 0,05$). En yüksek pH (5,32) % 0,2 safra içeren ortamda *E. faecalis* RT102 suşunda belirlenirken, en düşük pH değeri (3,49) % 0,4 safra içeren ortamda *E. faecalis* RT102 suşunda belirlenmiştir. Dekonjugasyon miktarının artmasına bağlı olarak son kültür pH değerinde azalma belirlenmiştir.

Prebiyotikli ortamda ortalama en yüksek EPS üretimi % 0,4 safra içeren ortamda (627,87 mg/L) *E. faecium* RT94 suşunda, en düşük EPS üretimi safrasız ortamda (387,04 mg/L) *E. faecalis* RT102 suşunda gözlenmiştir. Safrasız ortam ile % 0,2 safra içeren ortamdaki EPS üretimi arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P < 0,05$). *Enterococcus* sp. suşlarının en yüksek EPS üretiminin % 0,2 safra içeren besi ortamında olduğu belirlenmiştir.

Prebiyotik ile safrasız, % 0,2 ve % 0,6 safra içeren ortamlarda EPS üretimi ile presipitasyon arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir. EPS üretiminin artması presipitasyon miktarını etkilememiştir. Ancak prebiyotik ile % 0,4 safra içeren ortamda EPS ile presipitasyon arasında orta düzeyde pozitif bir ilişki tespit edilmiştir ($P=0,026$, $P > 0,05$). Presipitasyon arttıkça EPS üretimi artmıştır.

Prebiyotik ile safrasız, % 0,2, % 0,4 ve % 0,6 safra içeren besi ortamlarında *Enterococcus* sp. suşlarının canlılıkları karşılaştırıldığında en yüksek canlılığın safrasız safra içeren ortamda *E. faecium* RT94 suşunda (10,60 kob/mL), en düşük canlılığın % 0,6 safra içeren ortamda *E. faecium* RT94 suşunda (7,80 kob/mL) olduğu belirlenmiştir. safrasız ve % 0,4 safra içeren ortamda canlılık ile presipitasyon arasında korelasyon tespit edilmezken, % 0,2 safra içeren ortamda canlılık ile presipitasyon arasında negatif orta düzey istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($P=0,036$, $P < 0,05$). Canlılık arttıkça, presipitasyonun azaldığı belirlenmiştir. % 0,6 safra içeren

ortamda ise canlılık ile presipitasyon arasında istatistiksel olarak 0,01 düzeyinde anlamlı bir ilişki bulunmuştur. % 0,6 safra içeren ortamda canlılık arttıkça, presipitasyon arttığı gözlemlenmiştir. Safrasız ortam ile % 0,4 safra içeren ortamdaki canlılık arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P < 0,05$). Safra konsantrasyonu arttıkça canlılığın azaldığı tespit edilmiştir.



Çizelge 4.5. *Enterococcus* sp. suşlarının prebiyotikli (inülin) ortamda safra tuzları dekonjugasyonu, son kültür pH, canlılık ve EPS üretimleri.

	Sodyum Taurokolat (TCA)				Sodyum Glikoksolat (GCA)				MRS Kontrol
Suşlar	Son kültür pH	Log kob/mL	Kolik asit (mM)	EPS Üretimi (mg/L)	Son kültür pH	Log kob/mL	kolik asit (mM)	EPS Üretimi (mg/L)	EPS Üretimi (mg/L)
<i>E. faecium</i> RT 94	3,1 ± 0,01	3,09 ± 0,01	1,05 ± 0,04	344,44 ± 27,19	3,12±0,01	9,687 ± 0	0,78 ± 0,03	355,37 ± 81,87	476,83 ± 16,87
<i>E. faecalis</i> RT 102	3,11 ± 0	8,44 ± 0,11	0,91 ± 0,23	626,63 ± 92,08	3,09 ± 0	9,60 ± 0	1,07 ± 0,08	574,44 ± 34,9	637,14 ± 66,56

Çizelge 4.6. *Enterococcus* sp. suşlarının prebiyotik (İnülin) içeren kolesterol ve safrasız, % 0,2, % 0,4 ve % 0,6 safra tuzları karışımı içeren MRS ortamlarındaki presipitasyon ve EPS üretimleri.

	Kolesterol + Bakteri				% 0,2 Safra + Bakteri			
Suşlar	Son kültür pH	Kolesterol presipitasyonu µg/mL	Kolesterol Giderimi (%)	EPS Üretimi (mg/L)	Son kültür pH	Kolesterol presipitasyonu µg/mL	Kolesterol Giderimi (%)	EPS Üretimi (mg/L)
RT 94	4,11 ± 0,15	2,26 ± 0,22	60	568,19 ± 28,02	4,8 ± 0,06	3,36 ± 0,42	1	441,42 ± 45
RT 102	4,18 ± 0,01	1,53 ± 1,81	9	387,04 ± 26,46	5,32 ± 0	2,25 ± 2,03	-	549,23 ± 40,73

Çizelge 4.6 (devam). *Enterococcus* sp. suşlarının prebiyotik (İnülin) içeren kolesterol ve safrasız, % 0,2, % 0,4 ve % 0,6 safra tuzları karışımı içeren MRS ortamlarındaki presipitasyon ve EPS üretimleri.

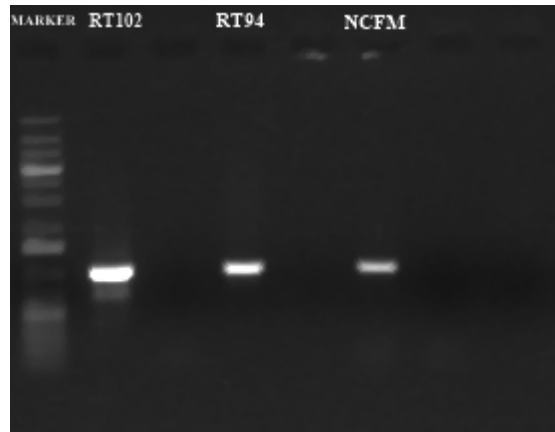
	% 0,4 Safra + Bakteri				% 0,6 Safra + Bakteri			
Suşlar	Son kültür pH	Kolesterol presipitasyonu µg/mL	Kolesterol Giderimi (%)	EPS Üretimi (mg/L)	Son kültür pH	Kolesterol presipitasyonu µg/mL	Kolesterol Giderimi (%)	EPS Üretimi (mg/L)
RT 94	4,29 ± 0,02	3,15 ± 0,4	-	627,87 ± 17,71	4,06 ± 0,03	3,39 ± 0,83	-	509,54 ± 26,46
RT 102	3,49 ± 0,02	2,11 ± 2,02	-	438,92 ± 14,17	3,95 ± 0,01	3 ± 1,05	-	408,71 ± 6,46

Çizelge 4.7. *Enterococcus* sp. suşlarının prebiyotikli (inülin) ortamda kolesterol ve safrasız, % 0,2, % 0,4 ve % 0,6 safra tuzları karışımı (oxgall) içeren MRS ortamlarındaki canlılık sonuçları (Log kob/mL).

SUŞ	MRS (Kontrol)	Kolesterol + Bakteri	% 0,2 Safra + Bakteri	% 0,4 Safra + Bakteri	% 0,6 Safra + Bakteri
RT 94	10,27 ± 0,32	10,60 ± 0,16	8,40 ± 0,01	8,21 ± 0,18	7,80 ± 0,43
RT 102	10,17 ± 0,15	10,07 ± 0,08	8,42 ± 0,20	8,41 ± 0,08	8,37 ± 0,25

4.5 *bsh* Geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Çoğaltılması ve Sekans Analizi

E. faecalis RT102 ve *E. faecium* RT94 suşlarında *bsh* amplifikasyonu için kullanılan primer çiftleri, izolatlarda ~ 1,1 kbp istenen ampliconlarda tespit edilmiştir. PZR ampliconlarının saflaştırılması, sekanslanması ve BLAST analizi, bunların *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarında *bsh* geni için kodlandığı doğrulanmıştır. *E. faecalis* RT102 ve *E. faecium* RT94 için Gen Bankası erişim numaraları sırasıyla SAMN13818009 ve SAMN13818010 olarak belirlenmiştir. *E. faecalis* RT102, *E. faecium* RT94 ve *L. acidophilus* NCFM suşlarının *bsh* genine ait gen görüntüsü Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. *E. faecalis* RT102, *E. faecium* RT94 ve *L. acidophilus* NCFM suşlarının *bsh* gen görüntüsü.

5.TARTIŞMA ve SONUÇLAR

DSÖ'ye göre, kardiyovasküler rahatsızlıkların 2030 yılına kadar başlıca ölüm nedeni olacağı ve dünya çapında yaklaşık 23 milyon insanı etkileyeceği tahmin edilmektedir (Joyce vd., 2014). Son yirmi yılda hiperkolesteroleminin Batı Avrupa'da % 45, Orta ve Doğu Avrupa'da % 35 kalp krizi ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Khare ve Gaur, 2020). Hiperkolesterolemili kişilerin kalp krizi geçirme riskinin, normal lipid profili seviyelerine sahip kişilere göre üç kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Reid, 1998). Hiperkolesterolemili hastalarda kolesterol seviyesini düzenlemede yaygın olarak ilaç tedavisi kullanılmaktadır. Kolesterol seviyesinin düzenlenmesinde hidroksimetilglutaril-CoA redüktazın (HMG-CoAR) spesifik inhibitörleri olan statinler, kolesterol biyosentezinde hız sınırlayıcı enzimler olarak uygunlanmaktadır (Farmer, 1998). Hiperkolesteroleminin önlenmesinde ve tedavi edilmesinde kullanılan çoğu ilacın pahalı olmakla birlikte, kas ağrısı, artan diabetes mellitus riski ve karaciğer enzim testlerinde anormallikler gibi yan etkilere sahip oldukları bildirilmiştir (Naci vd., 2013). Serum kolesterol seviyesini düşürmek için yeni alternatif yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda serum kolesterol miktarının düşürülmesine yönelik probiyotik tedaviler giderek popülerite kazanmıştır (Huang vd., 2018; Singhai vd., 2019; Zheng vd., 2020). Bildirilen çalışmalar probiyotiklerin oral yoldan uygulanmasının, serum kolesterol seviyesini etkili bir şekilde azalttığını ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisi için umut verici bir seçenek olabileceğini göstermektedir. Zanotti vd. (2015) *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 suşunun bağırsak mikrobiyotasını modüle ederek kolesterol seviyesini düşürebileceği bildirilmiştir.

Gıda-Tarım ve DSÖ tarafından probiyotik seçim kriterleri arasına BSH aktivitesinin varlığı da eklenmiştir (Joint FAO/WHO; 2011). BSH enzimi, enterohepatik dolaşım sırasında safra tuzu dekonjugasyonundan sorumludur. Dekonjugasyon, amid bağlarını hidrolize eden BSH enzimi tarafından katalize edilir ve glisin veya taurin grupları steroidin çekirdeğinden salınır. Dekonjüge safra tuzları düşük çözünürlüğe sahiptir ve konjuge muadillerine kıyasla daha az etkinlikle bağırsak lümeninin içinden emilirler, bunun sonucunda fekal maddede fazla miktarda serbest safra atılır. Serbest safra tuzları, bağırsak içindeki lipidleri çözündürme ve emmede daha düşük etkinlik gösterir (Madjd vd., 2016). Böylece *de novo* sentez yolunda kolesterol için artan bir gereksinim olduğundan, safra tuzlarının dekonjugasyonu nedeniyle serum kolesterolü azalır (Micheal vd., 2016).

Liong ve Shah (2005a), yaptıkları çalışmada *Bifidobacterium* sp. suşlarının sodyum taurokolata kıyasla sodyum glikokolatı daha yüksek hidroliz ettiğini bildirmişlerdir.

Liong ve Shah (2005b), safra tuzu dekonjugasyon aktivitesi için *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus casei* suşları ile yaptıkları çalışmada sodyum taurokolata göre sodyum glikokolatın dekonjugasyonunun daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ramasamy vd. (2010), tavuktan izole edilen *Lactobacillus* sp. suşlarının sodyum glikokolatı, sodyum taurokalattan daha fazla dekonjuge edebildiğini gözlemlemiştir. Belicova vd. (2013) Slovak Bryndza peynirinden izole edilen *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus fermentum* suşlarından *L. plantarum* K10, K21 ve ZS07 suşlarının, % 0,3 safra varlığında % 50'nin üzerinde canlılık gösterdiğini ve CK06 ile K21 suşlarının güçlü dekonjugasyon etkinliği olduğunu belirlemişlerdir. Nwachukwu vd. (2019) mısır-soya fasulyesi atıklarından izole edilen ve potansiyel probiyotik olarak tanımlanan *Lactobacillus plantarum* C-S ve *Micrococcus luteus* C S suşlarından *L. plantarum* C S suşunun düşük safra konsantrasyonunda dekonjugasyon aktivitesi gösterirken, *M. luteus* C S suşunun dekonjugasyon aktivitesi göstermediğini ve bu nedenle güçlü bir probiyotik suş olarak kabul edilemeyeceğini bildirmişlerdir. Onal Darılmaz ve Beyatlı (2019) geleneksel Türk beyaz peynirlerinden izole edilen *Propionibacterium* sp. suşlarının sodyum glikolatı sodyum taurokolattan daha yüksek hizroliz aktivitesi sergilediğini bildirmişlerdir. Mishra vd. (2019) Wistar sıçanından izole edilen *Enterococcus faecalis* AG5'in 4-48 saat aralığındaki inkübasyon süresi boyunca farklı zaman dilimlerindeki dekonjugasyon aktivitelerini araştırmış, *E. faecalis* AG5'in sodyum glikolatı dekonjuge edebildiğini ve ortama 0,4-479 µg/mL arasında kolik asit saldıgını tespit etmişler, en yüksek dekonjugasyon aktivitesinin 18. saatte gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Yerlikaya ve Akbulut, (2019) çiğ süt ve çeşitli süt ürünlerinden izole edilen 30 *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus durans* suşunun safra tuzu dekonjugasyon aktivitelerini incelediğinde *E. faecium* ve *E. durans* suşlarının tamamının TCA varlığında büyüme gösterdiğini ancak herhangi bir dekonjugasyon aktivitesi oluşturmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmalarla birlikte yaptığımız çalışmada test edilen *Enterococcus* sp. suşlarının dekonjugasyon aktiviteleri değerlendirildiğinde sodyum taurokolat (TCA) ve sodyum glikolattan (GCA) sadece sodyum glikolatın dekonjugasyonunu yapabildikleri tespit edilirken suşlar arasında dekonjugasyon miktarları farklılık göstermektedir. En yüksek dekonjugasyon aktivitesi *E. faecium* RT94 suşunda (1,93mM) gözlenirken en düşük dekonjugasyon aktivitesi *E. faecalis* RT122 suşunda (0,37 mM) belirlenmiştir. *E. faecalis* RT102 (1,72 mM) ve *E. faecium* RT101 (1,09 mM) suşlarında orta düzeyde GCA dekonjugasyonu olduğu tespit edilmiştir ($P < 0,05$). Test edilen *Enterococcus* sp. suşlarının TCA'yı dekonjuge edemediği gözlemlenmiştir. Glisinle konjuge safra tuzlarının taurinle konjuge safra tuzlarından daha toksik olması, glisin ve taurin konjugantlarının ayrışma sabitlerinin farklı olması ile açıklanmaktadır (Lye vd. 2010; Ramasamy vd. 2010). Taurinle konjuge safra tuzlarına karşı yüksek BSH aktivitesi,

yüksek hidrojen sülfür üretimi ile sonuçlandığı için ve bu da konakçı üzerinde toksik etki yaratacağından dolayı probiyotik mikroorganizmalarda arzu edilmeyen özellik olarak bildirilmiştir (Jiang vd., 2010).

Probiyotik laktik asit bakterilerinin hipokolesterolemik özellikleri birçok çalışmada rapor edilmiştir (Ma vd., 2019b; Ding vd., 2020). Yeterli miktarda aktif laktik asit bakterisi içeren belirli fermente süt ürünlerinin uzun süreli kullanımı ile serum kolesterol seviyelerinin düşürüldüğü bildirilmiştir (Nguyen vd., 2007; Lye vd., 2010). Agerholm-Larsen vd. (2000) tarafından yapılan bir araştırmada, üç farklı probiyotik yoğurt (birinci grubu *Streptococcus thermophilus*, ikinci grubu *L. acidophilus*, *S. thermophilus* ve *Lactobacillus rhamnosus* türlerininin karışımından ve üçüncü grubu ise *S. thermophilus* ve *E. faecium* içeren) verilen fazla kilolu ve obez 70 yetişkinin çift kör randomize bir çalışmada sekizinci haftanın sonunda üçüncü tip yoğurdu alan deneklerde, LDL kolesterol seviyelerinde % 8,4'lük bir azalma ($P < 0,05$) gözlemlenmiş ve bu durumun kardiyovasküler hastalık riskinde % 20-30'luk bir düşüşe paralel olacağı önerilmiştir. Huang vd. (2013) kefirde izole ettikleri *L. plantarum* Lp09 ve Lp45 suşlarının *in vitro* ortamda kolesterol düşürücü etkisinin olduğunu belirlemişler ve Sprague-Dawley sıçanlarında yaptıkları *in vivo* çalışmalar sonucu sıçanlarda serum kolesterol seviyelerinde ve karaciğer kolesterol-trigliserit düzeylerinde önemli ölçüde azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Ma vd. (2019) mısır slajından izole ettikleri ve tanımladıkları *Enterococcus* ve *Lactobacillus* cinslerine ait 85 suşun *in vitro* kolesterol giderimlerini araştırdıklarında, 18 saatlik inkübasyon sonunda suşların kolesterol gideriminin % 3,8 ile % 55,2 oranında olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar, *E. faecium* suşlarının kolesterol giderimlerinin düşük ve suşların besi ortamından % 10'dan fazla kolesterolü uzaklaştıramadığını bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar test edilen 8 *Lactobacillus* suşu arasında *L. plantarum* CAAS 18010, *L. brevis* CAAS 18052 ve *L. fermentum* CAAS 18069 suşlarının ise % 40 oran ile en yüksek kolesterol giderimi kabiliyetini gösterdiği tespit etmişlerdir. *In vitro* ortamda yüksek kolesterol giderimi gösteren bu suşların hamsterlarda serum kolesterol seviyelerini önemli ölçüde etkilemediğini ve *L. brevis* CAAS 18052, *L. fermentum* CAAS 18078 ve *L. plantarum* CAAS 18008 suşlarının kan kolesterol düşürme yüzdeleri sırasıyla % 28,8, % 21,7 ve % 30,9 olarak belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada test edilen *Enterococcus* sp. suşlarının kolesterol presipitasyonlarının % 50 ile % 2 arasında değiştiği ve en yüksek presipitasyon yeteneğinin *E. faecium* RT94, *E. faecalis* RT102 ve *E. faecium* RT101 suşlarında sırası ile % 50, % 45 ve % 45 oranında olduğu tespit edilmiştir. Literatürde incelenen *Enterococcus* sp. suşlarının kolesterol presipitasyonları göz önüne alındığında bu oranların yüksek olduğu görülmektedir.

Enterokoklar insanlarda, hayvanlarda ve fermente edilmiş gıdalardaki yaygın laktik asit bakteri türleridir (Franz vd., 2011). Bununla birlikte, enterokokların serum kolesterol seviyesi üzerindeki yararlı etkileri nadiren bildirilmiştir. Literatürde *Enterococcus* sp. suşlarının kolesterol düşürücü aktivitesini içeren sınırlı veriler mevcuttur (Agerholm-Larsen vd., 2000; Hlivak vd., 2005; Cavallini vd., 2009; Guo vd., 2016). Zhu vd. (2019) yaptıkları bir çalışmada *E. faecalis* ATCC 19433'ün oral uygulamasının, hiperkolesterolemik farelerde serum kolesterol konsantrasyonunu önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada test edilen *Enterococcus* sp. suşları farklı konsantrasyonlarda safra bulunan besi ortamlarında kolesterol presipitasyonu göstermiştir. Ancak suşların presipitasyon oranları arasında önemli farklılık belirlenmiştir. *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının *in vitro* ortamda farklı safra konsantrasyonlarda kolesterol giderim oranları incelenmiş ve 100 µg/mL kolesterol içeren ortamda % 17-50 arasında kolesterol giderim miktarları olduğu gözlemlenmiştir. En yüksek kolesterol giderim yüzdesi safrsız ortamda *E. faecium* RT94 (% 50) suşunda gözlenirken, en düşük koleterol giderim yüzdesi % 0,2 safra konsantrasyonu içeren ortamda *E. faecium* RT81 (% 2) suşunda gözlemlenmiştir. Ortalama en yüksek kolesterol giderim yüzdesi safrsız ortamda gözlenirken (% 32,9) ortalama en düşük kolesterol giderim yüzdesi % 0,6 safra içeren ortamda (% 3,5) tespit edilmiştir. Safra konsantrasyonunun artmasının kolesterol presipitasyonunda azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlardan farklı olarak Singhal vd. (2019) rizosferden izole ettikleri potansiyel probiyotik *Enterococcus* sp. suşlarının safra içermeyen ortamda kolesterolün en az % 50'sini asimile edebildikleri ve safra tuzu varlığında kolesterol asimilasyon yüzdesinin arttığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar test edilen enterokok suşları arasında *E. faecium* LR13 suşunun safra tuzları içermeyen ortamda % 76 ve safra tuzları içeren ortamda % 98 oranında kolesterol giderimi gösterdiğini bildirmişlerdir.

Dekonjuge safra tuzları serbest kolesterol molekülleri ile birlikte asidik ortamlarda presipite olmaktadır. Çalışmamızda en yüksek yüzde kolesterol giderimi *E. faecium* RT94 suşunda safrsız ortamda görülürken bu ortamda pH değeri 6,48 olarak belirlenmiştir. Aynı ortamdaki en düşük yüzde kolesterol giderimi % 17 ile *E. faecalis* RT98 suşunda belirlenmiş ve bu suşun bu ortamdaki pH değeri 6,59 olarak tespit edilmiştir. Kolesterol presipitasyonu ve pH arasında yapılan istatistiksel çalışmalar sonu herhangi bir ilişki tespit edilememiştir ($P > 0,05$).

Çalışmamızda yüksek dekonjugasyon aktivitesi gözlenen *E. faecium* RT94 (224,23 mg/L) ve *E. faecalis* RT84 (251,62 mg/L) suşlarının EPS üretimlerinde yüksek olduğu gözlemlenmiştir. % 0,2, % 0,4 ve % 0,6 safra ortamlarında yüksek presipitasyon gösteren *E. faecium* RT81 (453,29 mg/L), *E. faecium* RT94 (443,77 mg/L) ve *E. faecalis* RT98 (370,06 mg/L) suşlarının EPS üretimlerinde yüksek

olduğu belirlenmiştir. Artan safra konsantrasyonu ile EPS üretiminde paralel olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir. EPS, serbest safra asitlerine bağlanabilir ve böylece dışkı yoluyla atılımını artırabilir. Bu karaciğerde prekürsör olarak kolesterolü kullanan yeni safra asitlerinin sentezlenmesine ve böylece dolaşımdaki kolesterol seviyesinin düşmesine neden olur.

Enterokokların EPS üretimi üzerine çok az çalışma bulunmaktadır. Mozzi vd. (2006) *E. faecalis* CRL316, *E. faecalis* CRL434 ve *E. faecium* CRL210 suşlarında üretilen EPS miktarlarının sırasıyla 110 mg/L, 66 mg/L ve 27 mg/L olduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada ise Ribeiro vd. (2013) artisanal inek sütünden yapılan peynirlerden izole edilen yedi *E. faecalis* suşunda EPS üretimini araştırmışlar ancak hiçbir suşta EPS üretimi gözlemlenmemişlerdir.

Bhat ve Bajaj (2019) yaptıkları çalışmada probiyotik izolat *Lactobacillus. paracasei* M7'den elde edilen EPS'nin, *in vitro* ortamda önemli kolesterol düşürme aktivitesi (% 70,78) sergilediğini ve *L. paracasei* M7'nin ürettiği EPS'nin kolesterol düşürücü aktivitesi çok yönlü nedenlere bağlı olabileceğini bildirmişlerdir. Avcı vd. (2020) yaptıkları çalışmada geleneksel el yapımı peynirden izole edilmiş iki yeni probiyotik suşun (*Lactobacillus plantarum* GA06 ve GA11) ürettiği EPS'nin kolesterol mekanizması ve safra dekonjugasyonu üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar, EPS üretimini *L. plantarum*'un GA11 ve GA06 suşlarında 96,5 ve 32,5 mg/L olarak ve kolesterol giderim miktarlarını ise % 36,7 ve % 28,6 olarak belirlemişlerdir. Aynı çalışmada *L. plantarum* GA11 suşunun glikokolat dekonjugasyon aktivitesi, GA06 suşundan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca suşların EPS üretim kapasitesi ile kolesterolün giderimi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenirken, hem EPS üretim kapasitesi-kolesterol giderimi hem de EPS üretim kapasitesi-glikokolat dekonjugasyon arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda da benzer şekilde *E. faecalis* RT102 probiyotikli ortamda yüksek EPS üretimi ve-glikokolat dekonjugasyon aktivitesi göstermiştir. Prebiyotikli ortam ile safrasız, % 0,2, % 0,6 safra içeren ortamlarda EPS üretimi ile presipitasyon arasında anlamlı bir fark tespit edilemezken ($P > 0,05$), prebiyotik ve % 0,4 safra içeren ortamda üretilen EPS ile presipitasyon arasında orta düzeyde pozitif bir ilişki tespit edilmiştir ($P=0,026$, $P > 0,05$). Bu nedenle bir probiyotiğin ürettiği EPS'nin serum kolesterol düşürme potansiyeli dikkate alındığında, EPS'nin giderek artan kardiyovasküler rahatsızlıklarda büyük bir azalmaya sebep olabileceği sonucuna varılabilir.

Prebiyotikler, "gastrointestinal sistemde mikrofloranın büyümesini, kompozisyonunu ve aktivitesini seçici olarak uyaran ve böylece konakçıların sağlığını ve refahını iyileştiren sindirilemeyen fermente gıda substratları" olarak

tanımlanmaktadır.(Roberfroid, 2007). Prebiyotiklerin serum kolesterol seviyesininin düşürülmesinde rol oynadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Adebola vd., 2020; Kuerman vd., 2020). Causey vd. (2000) hastaların kan kolesterol düzeyleri üzerinde inülinin (hindiba köklerinden elde edilen) etkisini değerlendirmek için on iki hiperkolesterolemik erkek hastayı kullanarak 3 haftalık *in vivo* bir çalışmanın sonucunda, günlük 20 g inülin alımının serumda bulunan trigliseridleri önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. Wang vd. (2008) hiperkolesterolemik 10 erkek Wistar sıçanında yaptıkları bir çalışmada 8 hafta boyunca Çin Yam'ından saflaştırılan bir nişasta ile beslendiklerinde serum kolesterol seviyelerinde % 27,5 ile % 46,2 arasında bir düşüş görüldüğünü bildirmişlerdir.

Probiyotiklerin ve prebiyotiklerin hipokolesterolemik etkilerinin kanıtları araştırmacıları simbiyotik çalışmalara yönlendirmektedir. Liong vd. (2007) yaptıkları *in vivo* bir çalışmada 24 hiperkolesterolemik erkek domuza sinbiyotik bir ürünün (*L. acidophilus* ATCC 4962, frukto-oligosakkarit ve inulin içeren) uygulanmasının umut verici hipokolesterolemik etkiler sağladığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, kontrol ile karşılaştırıldığında, sekiz hafta boyunca sinbiyotik diyet tüketen domuzlarda plazma toplam kolesterolünün (% 40-41), triaçilgliserol (% 15-48) ve LDL-kolesterolünün (% 46-59) önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. Kuerman vd. (2020) % 0,3 safra tuzu ve 100µg/ml kolesterol içeren besi ortamını prebiyotik ve probiyotikle destekleyerek 37°C'de 12-15 saat inkübasyon süresi sonunda kolesterol giderim miktarlarını % 50 olarak tespit etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada % 5 inülin içeren ortamda *E. faecium* RT94 suşunun TCA içeren ortamda 1,05 mM, GCA içeren ortamda 0,78 mM kolik asit salınımı yaptığı belirlenirken, *E. faecalis* RT102 suşunun TCA içeren ortamda 0,91 mM ve GCA içeren ortamda 1,07 mM kolik asit salınımı yaptığı tespit edilmiştir. *E. faecium* RT94 ve *E. faecalis* RT102 suşları prebiyotik içermeyen ortamda TCA'yı dekonjuge edemezken, prebiyotik içeren ortamda TCA'yı dekonjuge edebildikleri gözlenmiştir. Bu iki suşun prebiyotik içeren ortamda GCA dekonjugasyonlarının azaldığı belirlenmiştir. Prebiyotik ve TCA içeren ortamda *E. faecium* RT94 ve *E. faecalis* RT102 suşlarının pH değerleri sırası ile 3,10 ve 3,11 olarak belirlenirken prebiyotik içermeyen ortamda pH değerleri sırası ile 4,57 ve 4,46 olarak belirlenmiştir. Prebiyotik içeren ortamda TCA dekonjugasyonları artarken pH değerlerinde azalma olduğu gözlemlenmiştir. *E. faecium* RT94 ve *E. faecalis* RT102 suşlarının prebiyotik ve TCA içeren ortamdaki EPS üretim miktarları incelendiğinde, *E. faecium* RT94 (344,44 mg/L) ve *E. faecalis* RT102'nin (626,63 mg/L) EPS üretimlerinin arttığı belirlenmiştir. *E. faecium* RT94 ve *E. faecalis* RT102 suşlarının prebiyotik içermeyen ortamda GCA dekonjugasyonları sırası ile 1,93 mM ve 1,72 mM iken prebiyotik içeren ortamda GCA dekonjugasyonları *E. faecium* RT94 suşu için 0,98 mM ve *E. faecalis* RT102 suşu için 1,07 mM olarak belirlenmiş ve suşlarının prebiyotikli ortamda GCA

dekonjugasyonlarında azalma olduğu gözlemlenmiştir. Prebiyotik ve GCA içeren ortamda pH üretimleri incelendiği zaman *E. faecium* RT94 ve *E. faecalis* RT102 suşlarının prebiyotik içermeyen ortamda pH üretimleri sırası ile 4,75 ve 4,87 iken prebiyotik içeren ortamda 3,12 ve 3,09 olarak belirlenmiştir. Prebiyotik içeren ortamda GCA dekonjugasyonunda azalma görülürken pH miktarlarında da azalma olduğu tespit edilmiştir. EPS üretimleri karşılaştırıldığında prebiyotik ve GCA içeren ortamda *E. faecium* RT94'ün EPS üretimi 476,83 mg/L, *E. faecalis* RT102'nin EPS üretimi 637,14 mg/L olarak belirlenmiştir ve prebiyotikli ortamda her iki suşunda EPS üretimlerinin arttığı gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda *Enterococcus* sp. suşlarının prebiyotik (İnülin) içeren ortamda (% 5 oranında) kolesterol giderimleri incelendiğinde *E. faecium* RT94 suşunun safrasız ortamda kolesterol giderimi % 60 olarak belirlenmiş ve prebiyotik içermeyen ortama göre (% 50) kolesterol gideriminde artış gözlemlendiği tespit edilmiştir. *E. faecalis* RT102 suşunun ise safrasız ortamda kolesterol giderimi % 9 olarak belirlenmiş ve prebiyotik içermeyen ortama göre (% 45) kolesterol gideriminde azalma tespit edilmiştir. *E. faecium* RT94 ve *E. faecalis* RT102 suşlarının % 0,2, % 0,4, % 0,6 safra ve prebiyotik içeren ortamdaki kolesterol giderimlerinde prebiyotik içermeyen ortama kıyasla azalma gösterdiği belirlenmiştir. Son kültür pH değerleri incelendiğinde safrasız ve prebiyotik içermeyen ortamda *E. faecium* RT94 ve *E. faecalis* RT102 suşlarının pH değeri sırası ile 6,48 ve 6,30 iken safrasız ve prebiyotik içeren ortamda pH değerleri sırası ile 4,11 ve 4,18 olarak tespit edilmiştir. Prebiyotik içeren ortamda son kültür pH değerlerinde azalma meydana geldiği gözlemlenmiştir. Ortamda prebiyotik bulunması *Enterococcus* sp. suşlarının asit üretimini arttırdığı ve buna bağlı olarak oluşan asidik ortam ile bakteriler inhibe olduğu için kolesterol presipitasyonunda azalma meydana geldiği düşünülmektedir. Besi ortamına prebiyotik eklenmesinin *Enterococcus* sp. suşlarının safra tuzu dekonjugasyonunu ve safra içeren ortamda kolesterol presipitasyonunu azalttığı yapılan çalışma ile tespit edilmiştir. Literatürde *Enterococcus* cinsine ait probiyotik bakterilerin prebiyotik içeren *in vitro* besi ortamında kolesterol presipitasyonu ve EPS üretimi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yaptığımız çalışma ile prebiyotikli ortamda EPS üretimi ile kolesterol presipitasyonun ilk kez belirlenmiş olması ile literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

BSH (EC 3.5.1.24), glisin veya taurin ile konjuge safra asitlerinin dekonjugasyonunu katalize eden ve kan kolesterol seviyelerinin düşürülmesine yardımcı olan önemli bir enzimdir. Wijaya vd. (2004) gıdalardan izole ettikleri *E. faecium* FAIR-E 345 suşunun dekonjugasyon aktivitesi olduğunu belirlemişler ve yaptıkları PZR çalışması sonucunda bu aktiviteden sorumlu *bsh* geninin varlığını tespit etmiş ve bu genin dizi analizini belirlemişlerdir. Chand vd. (2016), *E. faecalis*'ten izole ettikleri *bsh* geninin

Escherichia coli'de ifade edilen proteininin pH 5,0-7,0 aralığında ve 50°C'ye kadarki sıcaklıkta oldukça stabil olduğunu belirlemişlerdir. Yaptığımız çalışmada *E. faecium* RT94 ve *E. faecalis* RT102 suşlarının DNA izolasyonları yapılmış ve uygun primerler kullanılarak yapılan PZR sonucunda *bsh* genin varlığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak probiyotik mikroorganizmaların kolesterol gideriminin belirlendiği çalışmalar olmasına rağmen, enterokokların hem kolesterol düşürücü özelliklerinin belirlendiği hem de mekanizmadaki rolünün araştırıldığı, EPS ve prebiyotik etkisinin belirlendiği ilk çalışma olması açısından önemlidir. Bu çalışmada kolesterol giderme özelliği gösteren probiyotik *E. faecium* RT94 ve *E. faecalis* RT102 suşlarının bu çalışmanın devamında yapılması planlanan hayvan deneyleri ile kolesterol düşürücü probiyotik ürünler veya tabletler şeklinde çalışmaların geliştirilmesi mümkün olabilecektir. Bu şekilde mevcut kimyasal içerikli kolesterol düşürücü preperatlardan dolayı doğabilecek dezavantajlara karşı *Enterococcus* sp. probiyotik kültürler gibi doğal kaynakları içeren ürünler kullanılarak kolesterolün düşürülmesinin birçok avantajı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Adebalo, O. O., Corcoran, O. ve Morgab, A. W., 2020. Prebiotics may alter bile salt hydrolase activity: Possible implications for cholesterol metabolism, *Pharma Nutrition*, 12, 100182.
- Agerholm-Larsen, L., Raben, A., Haulrik, N., Hansen, A. S., Manders, M. ve Astrup, A., 2000. Effect of 8 week intake of probiotic milk products on risk factors for cardiovascular diseases, *European Journal of Clinical Nutrition*, 54, 4, 288–297.
- Agha, M. ve Agha, R., 2017. The rising prevalence of obesity: Part A: Impact on public health, *International Journal of Surgical Oncology*, 2, 17.
- Ahn, Y. T., Kim, G. B., Lim, K. S., Baek, Y. J. ve Kim, H. U., 2003. Deconjugation of bile salts by *Lactobacillus acidophilus* isolates, *International Dairy Journal*, 13, 303-311.
- Avcı, G., 2020. Probable novel probiotics: eps production, cholesterol removal and glycocholate deconjugation of *Lactobacillus plantarum* Ga06 and Ga11 isolated from local handmade- cheese, *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 10, 1, 83–86.
- Begley, M., Hill, C. ve Gahan C. G. M., 2006. Bile salt hydrolase activity in probiotics, *Applied Environmental Microbiology*, 72, 1729–1738.
- Belicová, A., Mikulášová, M. ve Dušínský, R., 2013. Probiotic potential and safety properties of *Lactobacillus plantarum* from Slovak Bryndza cheese, *BioMed Research International*, 2013, 1-8.
- Bhat, B. ve Bajaj, B. K., 2019a. Hypocholesterolemic potential of probiotics: Concept and mechanistic insights, *Indian Journal of Experimental Biology*, 57, 2, 73–85.
- Bhat, B. ve Bajaj, B. K., 2019b. Hypocholesterolemic potential and bioactivity spectrum of an exopolysaccharide from a probiotic isolate *Lactobacillus paracasei* M7, *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 19, 100191.
- Binda, S., Hill, C., Johansen, E., Obis, D., Pot, B., Sanders, M. E., Tremblay, A. ve Ouwehand, A. C., 2020. Criteria to qualify microorganisms as “Probiotic” in foods and dietary supplements, *Frontiers in Microbiology*, 11, 1–9.
- Brashears, M. M., Gilliland, S. E. ve Buck, L. M., 1998. Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus casei*, *Journal of Dairy Science*, 81, 8, 2103-2110.

- Cavallini, D. C., Bedani, R., Bomdespacho, L. Q., Vendramini, R. C. ve Rossi, E. A., 2009. Effects of probiotic bacteria, isoflavones and simvastatin on lipid profile and atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: A randomized double-blind study, *Lipids in Health and Disease*, 8, 1–8.
- Champe, P. C. ve Harvey, R. A. 1997. *Biyokimya, Tokullugil, A., Dirican, M. ve Ulukaya, E., Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.*
- Chand, D., Ramasamy, S. ve Suresh, C. G., 2016. A highly active bile salt hydrolase from *Enterococcus faecalis* shows positive cooperative kinetics, *Process Biochemistry*, 51, 2, 263–269. .
- Cousey, J. L., Joellen, M., Daniel, D., Bryan, C., Tungland, B. S. ve Slavin, R. D., 2000. Effects of dietary inulin on serum lipids, blood glucose and the gastrointestinal environment in hypercholesterolemic men, *Nutrition Research*, 2, 191-201.
- Corzo, G. ve Gilliland, S., 1999. Bile Salt Hydrolase Activity of three strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Journal of Dairy Science*, 82, 472-480.
- Ding, Z., Hani, A., Li, W., Gao, L., Ke, W ve Guo, X., 2020. Influence of a cholesterol-lowering strain *Lactobacillus plantarum* LP3 isolated from traditional fermented yak milk on gut bacterial microbiota and metabolome of rats fed with a high-fat diet, *Royal Society of Chemistry*, 11, 8342-8353.
- Fernandez, M., Martinez-Bueno, M., Martin, M. C., Valdivia, E. ve Maqueda, M., 2007. Heterologous expression of enterocin AS-48 in several strains of lactic acid bacteria, *Journal of Applied Microbiology*, 102, 5, 1350-1361.
- Franz, C. M. A. P., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W. ve Gálvez, A., 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety, *International Journal of Food Microbiology*, 151, 2, 125–140.
- Franz, C. M. A. P., Specht, I., Haberer, P. ve Holzapfel, W. H., 2001. Bile salt hydrolase activity of enterococci isolated from food: Screening and quantitative determination, *Journal of Food Protection*, 64, 5, 725–729.
- García, J. L., Uhía, I., ve Galán, B. 2012. Catabolism and biotechnological applications of cholesterol degrading bacteria, *Society for Applied Microbiology*, 5. 6, 679-699.
- George Kerry, R., Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H. S. ve Das, G., 2018. Benefaction of probiotics for human health: A review, *Journal of Food and Drug Analysis*, 26, 3, 927–939.
- Gilliland, S. E., Nelson, C. R. ve Maxwell, C., 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 2, 377-381.

- Goderska, K., Pena, S. A. ve Alarcon, T., 2018. *Helicobacter pylori* treatment: antibiotics or probiotics, *Applied microbiology and biotechnology*, 102, 1, 1-7.
- Goldstein, J. L. ve Brown, M. S., 1984. Progress in understanding the LDL receptor and HMG-CoA reductase, two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol, *Journal of Lipid Research*, 25, 13, 1450–1461.
- Guo, L., Li, T., Tang, Y., Yang, L. ve Huo, G., 2016. Probiotic properties of *Enterococcus* strains isolated from traditional naturally fermented cream in China, *Microbial Biotechnology*, 9, 6, 737–745.
- Hajikhani, R., 2011. Türkiye ve İran’ da üretilen beyaz peynirlerden izole edilen *Enterococcus* bakterilerinin probiyotik özelliklerinin araştırılması, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J. ve Salminen, S., 2014. Expert consensus document: the international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11, 506-514.
- Huang, Y., Wang, X., Wang, J., Wu, F., Sui, Y., Yang, L. ve Wang, Z., 2013. *Lactobacillus plantarum* strains as potential probiotic cultures with cholesterol-lowering activity, *Journal of Dairy Science*, 96, 5, 2746–2753.
- Irvin, J. L., Johnston, C. G. ve Kopala, J., 1944. A photometric method for the determination of cholates in bile and blood, *Journal of Biological Chemistry*, 153, 439-457.
- Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H. ve Salminen, S., 2001. Probiotics: effects on immunity, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 2, 444s-450s.
- Jiang, J., Hang, X., Zhang, M., Liu, X., Li, D. ve Yang, H., 2010. Diversity of bile salt hydrolase activities in different lactobacilli toward human bile salts, *Annals Microbiology*, 60, 81–88.
- Jones, M. L., Chen, H., Ouyang, W., Metz, T. ve Prakash, S., 2004. Microencapsulated genetically engineered *Lactobacillus plantarum* 80 (pCBH1) for bile acid deconjugation and its implication in lowering cholesterol, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1, 61-69.
- Khalkhali, S. ve Mojgani, N., 2018. *In vitro* and *in vivo* safety analysis of *Enterococcus faecium* 2C isolated from human breast milk, *Microbial Pathogenesis*, 116, 73-77.

- Khaneghah, A. M., Abhari, K., Eş, İ., Soares, M. B., Oliveria, R. B. A., Hosseini, H., Rezaei, M., Balthazar, C. F., Silva, R., Cruz, A. G., Ranadheera, C. S. ve Sant'Ana, A. S., 2020. Interactions between probiotics and pathogenic microorganisms in hosts and foods: A review, *Trends in Food Science and Technology*, 95, 205-218.
- Khare, A. ve Gaur, S., 2020. Cholesterol-lowering effects of *Lactobacillus* species, *Current Microbiology*, 77, 4, 638–644.
- Klein, G., 2003. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract, *International Journal of Food Microbiology*, 88, 123-131.
- Kšonžeková, P., Bystrický, P., Vlčková, S., Pátoprstý, V., Pulzová, L., Mudroňová, D., Kubašková, T., Csank, T. ve Tkáčiková, Ľ., 2016. Exopolysaccharides of *Lactobacillus reuteri*: their influence on adherence of *E. coli* to epithelial cells and inflammatory response, *Carbohydrate polymers*, 141, 10-19.
- Kuerman, M., Bao, Y., Guo, Y. ve Guo, M., 2020. Effects of prebiotic carbohydrates on the growth promotion and cholesterol-lowering abilities of compound probiotics *in vitro*, *Lwt*, 118, 108703.
- Kumar, R., Grover, S. ve Batish, V. K., 2012. Bile Salt Hydrolase (Bsh) Activity screening of Lactobacilli: *in vitro* selection of indigenous *Lactobacillus* strains with potential bile salt hydrolysing and cholesterol-lowering ability, *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4, 3, 162–172.
- Lambert, J. M., Bongers, R. S., de Vos, W. M. ve Kleerebezem, M., 2008. Functional analysis of four bile salt hydrolase and penicillin acylase family members in *Lactobacillus plantarum* WCFS1, *Applied Environmental Microbiology*, 74, 4719–4726.
- LeBlanc, J. G., Chain, F., Martín, R., Bermúdez-Humarán, L. G. ve Courau, S., Langella, P., 2017. Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria, *Microbial cell factories*, 16, 1, 79.
- Lee, D., 1997. *Essential Fatty Acids*, Woodland Publishing, Caregivers of Pleasant Grove, 8-9.
- Li, C., Li, W., Chen, X., Feng, M., Rui, X., Jiang, M. ve Dong, M., 2014. Microbiological, physicochemical and rheological properties of fermented soymilk produced with exopolysaccharide (EPS) producing lactic acid bacteria strains, *LWT-Food Science and Technology*, 57, 477-485.
- Li, D., Li, J., Zhao, F., Wang, G., Qin, Q. ve Hao, Y., 2016. The influence of fermentation condition on production and molecular mass of EPS produced by *Streptococcus thermophilus* 05-34 in milk-based medium, *Food chemistry*, 197, 367-372.

- Li, W., Mutuvulla, M., Chen, X., Jiang, M. ve Dong, M., 2012. Isolation and identification of high viscosity-producing lactic acid bacteria from a traditional fermented milk in Xinjiang and its role in fermentation process, *European Food Research and Technology*, 235, 497-505.
- Liong, M. T., Dunshea, F. R. ve Shah, N. P., 2007. Effects of a synbiotic containing *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4962 on plasma lipid profiles and morphology of erythrocytes in hypercholesterolaemic pigs on high- and low-fat diets, *British Journal of Nutrition*, 98, 4, 736–744.
- Liong, M. T. ve Shah, N. P., 2005. Bile salt deconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of lactobacilli strains, *International Dairy Journal*, 15, 391–398.
- Lodemann, U., Strahlendorf, J., Schierack, P., Klingspor, S., Aschenbach, J. R. ve Martens, H., 2015. Effects of the probiotic *Enterococcus faecium* and pathogenic *Escherichia coli* strains in a pig and human epithelial intestinal cell model, *Hindawi Publishing Corporation Scientifica*, 1-10.
- Lye, H. S., Rahmat-Ali, G. R. ve Liong, M. T., 2010. Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract. *International Dairy Journal*, 20, 3, 169–175.
- Ma, C., Zhang, S., Lu, J., Zhang, C., Pang, X. ve Lv, J., 2019. Screening for cholesterol-lowering probiotics from lactic acid bacteria isolated from corn silage based on three hypothesized pathways, *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 9, 1–13.
- Ma, H., 2004. Concept and protocol to isolate cholesterol-reducing bacteria from carnivores, *Natural Science*, 2, 11-17.
- Madjd, A., Taylor, M. A., Neek, L. S., Delavari, A., Malekzadeh, R., MacDonald, I. A. ve Farshchi, H. R. 2016. Effect of weekly physical activity frequency on weight loss in healthy overweight and obese women attending a weight loss program: A randomized controlled trial, *American Journal of Clinical Nutrition*, 104, 5, 1202–1208.
- Marinelli, L., Tenore, G. C. ve Novellino, E., 2017. Probiotic species in the modulation of the anticancer immune response, *Seminars in Cancer Biology*, 46, 182–190.
- Markowiak, P. ve Śliżewska, K., 2017. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health, *Nutrients*, 9, 10-21.
- Mazloom, K., Siddiqi, I. ve Covasa, M., 2019. Probiotics: How effective are they in the fight against obesity?, *Nutrients*, 1–24.
- Mc Auliffe, O., Cano, R. J. ve Klaenhammer, T. R., 2005. Genetic analysis of two bile salt hydrolase activities in *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Applied Environmental Microbiology*, 71, 4925-4929.

- Michael, D. R., Moss, J. W. E., Lama Calvente, D., Garaiova, I., Plummer, S. F. ve Ramji, D. P., 2016. *Lactobacillus plantarum* CUL66 can impact cholesterol homeostasis in Caco-2 enterocytes, *Beneficial Microbes*, 7, 443–451.
- Mishra, A. K., Kumar, S. ve Ghosh, A. R., 2019. Probiotic *Enterococcus faecalis* AG5 effectively assimilates cholesterol and produces fatty acids including propionate, *FEMS Microbiology Letters*, 366, 4, 1–9.
- Moreno, M. F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. ve De Vuyst, L., 2006. The role and application of enterococci in food and health, *International Journal of Food Microbiology*, 106, 1-24.
- Nakajima, H., Suzuki, Y. ve Hirota, T., 1992. Cholesterol lowering activity of ropy fermented milk, *Journal of Food Science*, 57, 6, 1327-1329.
- Nguyen, T. D. T., Kang, J. H. ve Lee, M. S., 2007. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects, *International Journal of Food Microbiology*, 113, 3, 358–361. .
- Nwachukwu, U., George-Okafor, U., Ozoani, U. ve Ojiagu, N., 2019. Assessment of probiotic potentials of *Lactobacillus plantarum* CS and *Micrococcus luteus* CS from fermented milled corn-soybean waste-meal, *Scientific African*, 6. 00183.
- Ogier, J. C. ve Serror, P., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus, *International Journal of Food Microbiology*, 126, 291-301.
- Onal Darilmaz, D. ve Beyatli, Y., 2019. Bile salt deconjugation activity of *Propionibacterium* strains and their cholesterol co-precipitation abilities, *International Journal of Dairy Technology*, 72, 4, 551–558.
- Onal Darilmaz, D., Discioglu, G. ve Beyatli, Y., 2016a. Probiotic evaluation of *Enterococcus faecalis* strains isolated from different regions of Iran and Turkey, *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 8, 6.
- Onal Darilmaz, D., Discioglu, G. ve Beyatli, Y., 2016b. Probiotic using and acid-bile resistance of *Enterococcus faecium* strains isolated from traditional naturally fermented white cheese in Iran and Turkey, *Biology and medicine (Aligarh)*, 8, 6.
- Onal Darilmaz, D., Oruc, O., Çetin, O. ve Ceylan, E., 2017. Dairy *Propionibacterium* strains with potential oxalate degrading activity and the effect of exopolysaccharide production, 4th World Congress and Expo on Applied Microbiology.
- Oruç, O. 2019. Probiyotik olarak kullanım potansiyeli olan *Enterococcus* cinsi bakterilerin güvenilirliğinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, ASÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aksaray.

- Öner, Ö., Aslim, B. ve Aydaş, S. B., 2014. Mechanisms of cholesterol-lowering effects of Lactobacilli and Bifidobacteria strains as potential probiotics with their bsh gene analysis, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 24, 1, 12-18.
- Parnell, J. A. ve Reimer, R. A., 2010. Effect of prebiotic fibre supplementation on hepatic gene expression and serum lipids: A dose-response study in JCR:LA-cp rats, *British Journal of Nutrition*, 103, 11, 1577–1584.
- Perumal, V. ve Venkatesan, A., 2017. Antimicrobial, cytotoxic effect and purification of bacteriocin from vancomycin susceptible *Enterococcus faecalis* and its safety evaluation for probiotization, *Food Science and Technology*, 78, 303-310.
- Pigeon, R. M., Cuesta, E. P. ve Gilliland, S. E., 2002. Binding of free bile acids by cells of yogurt starter culture bacteria, *Journal Dairy Science*, 85, 2705-2710.
- Reid, G., 2001. Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection—, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 2, 437-443.
- Ridlon, J. M., Kang, D. J., ve Hylemon, P. B., 2006. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria, *Journal of Lipid Research*, 47, 2, 241–259.
- Roberfroid, M., 2007. Prebiotics: The concept revisited, *Journal of Nutrition*, 137, 3.
- Rudkowska, I., 2012. Lipid lowering with dietary supplements: Focus on Diabetes, *Maturitas*, 72, 113–116.
- Salazar, N., Arboleya, S., Valdés, L., Stanton, C., Ross, P., Ruiz, L., Gueimonde, M. ve de los Reyes-Gavilán, C. G., 2014. The human intestinal microbiome at extreme ages of life. Dietary intervention as a way to counteract alterations, *Frontiers in Genetics*, 5, 1–9.
- Scavuzzi B. M., Henrique, F. C., Miglioranza, L. H. S., Simão, A. N. C. ve Dichi, I., 2014. Impact of prebiotics, probiotics and synbiotics on components of the metabolic syndrome, *Annals of Nutritional Disorders and Therapy*, 1, 2, 1-13.
- Schrezenmeir, J. ve de Vrese, M., 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 361-364.
- Shujun, W., Jinglin, Y., Hongyan, L. ve Weiping, C., 2008. Characterisation and preliminary lipid-lowering evaluation of starch from Chinese Yam, *Food Chemistry*, 108, 1, 176–181.
- Singh, V., Sharma, R., Kumar, A. ve Deedwania, P., 2010. Low high-density lipoprotein cholesterol: Current status and future strategies for management, *Vascular Health and Risk Management*, 6, 1, 979–996.

- Singhal, N., Maurya, A. K., Mohanty, S., Kumar, M. ve Viridi, J. S., 2019. Evaluation of bile salt hydrolases, cholesterol-lowering capabilities, and probiotic potential of *Enterococcus faecium* isolated from rhizosphere, *Frontiers in Microbiology*, 10, 1–9.
- Sivamaruthi, B. S., 2018. A comprehensive review on clinical outcome of probiotic and synbiotic therapy for inflammatory bowel diseases, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 8, 3, 179–186.
- Taherian, M., Samadi, P. M., Rastegar, H., Faramarzi, M. A., Rostami-Nejad, M., Yazdi, M. H., Rezaei-Tavirani, M. ve Yazdi, Z., 2019. An overview on probiotics as an alternative strategy for prevention and treatment of human diseases, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 18, 31–50.
- Tsai, C. C., Lin, P. P., Hsieh, Y. M., Zhang, Z. Y., Wu, H. C. ve Huang, C. C., 2014. Cholesterol-lowering potentials of lactic acid bacteria based on bile-salt hydrolase activity and effect of potent strains on cholesterol metabolism *in vitro* and *in vivo*, *Scientific World Journal*, 1-10.
- Van Calsteren, M., Pau-Roblot, C., Begin, A. ve Roy, D., 2002. Structure determination of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains RW-9595M and R, *Biochemical Journal*, 363, 7-17.
- Wang, G., Huang, W., Xia, Y., Xiong, Z. ve Ai, L., 2019. Cholesterol-lowering potentials of *Lactobacillus* strain overexpression of bile salt hydrolase on high cholesterol diet-induced hypercholesterolemic mice, *Food and Function*, 10, 3, 1684–1695.
- Wijaya, A., Hermann, A., Abriouel, H., Specht, I., Yousif, N. M. K., Holzapfel, W. H. ve Franz, C. M. A. P., 2004. Cloning of the bile salt hydrolase (*bsh*) gene from *Enterococcus faecium* FAIR-E 345 and chromosomal location of *bsh* genes in food Enterococci, *Journal of Food Protection*, 67, 12, 2772–2778.
- Witzler, J. J. P., Pinto, R. A., de Valdez, G. F., de Castro, A. D. ve Cavallini, D. C. U., 2017. Development of a potential probiotic lozenge containing *Enterococcus faecium* CRL 183, *LWT - Food Science and Technology*, 77, 193-199.
- Worsztynowicz, P., Olejnik-Schmidt, A., Białas, W. ve Grajek, W., 2019. Identification and partial characterization of proteolytic activity of *Enterococcus faecalis* relevant to their application in the dairy industry, *Acta Biochimica Polonica*, 66 ,1, 61–69.
- Yerlikaya, O. ve Akbulut, N., 2020. *In vitro* characterisation of probiotic properties of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* strains isolated from raw milk and traditional dairy products, *International Journal of Dairy Technology*, 73, 1, 98–107.
- Yıldız, G. G., Öztürk, M. ve Aslım, B., 2011. Identification of *Lactobacillus* strains from breast-fed infant and investigation of their cholesterol-reducing effects, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 23-97.

- Zanotti, I., Turrone, F., Piemontese, A., Mancabelli, L., Milani, C., Viappiani, A., Prevedini, G., Sanchez, B., Margolles, A., Elviri, L., Franco, B., van Sinderen, D. ve Ventura, M., 2015. Evidence for cholesterol-lowering activity by *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 through gut microbiota modulation, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 16, 6813–6829.
- Zhang, F., Qiu, L., Xu, X., Liu, Z., Zhan, H., Tao, X., Shah, N.P. ve Wei, H., 2017. Beneficial effects of probiotic cholesterol-lowering strain of *Enterococcus faecium* WEFA23 from infants on diet-induced metabolic syndrome in rats, *Journal Dairy of Science*, 100, 3, 1618-1628.
- Zhang, M.M., Cheng, J.Q., Lu, Y.R., Yi, Z.H., Yang, P. ve Wu, X.T., 2010. Use of pre-, pro-and synbiotics in patients with acute pancreatitis: A meta-analysis, *World Journal Gastroenterology*, 3970–3978.
- Zheng, Z. Y., Cao, F. W., Wang, W. J., Yu, J., Chen, C., Chen, B., Liu, J. X., Firman, J., Renye, J. ve Ren, D. X., 2020. Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* E680 and its effect on Hypercholesterolemic mice, *BMC Microbiology*, 20, 1, 1–9.
- Zhu, Y., Li, T., Din, A. U., Hassan, A., Wang, Y. ve Wang, G., 2019. Beneficial effects of *Enterococcus faecalis* in hypercholesterolemic mice on cholesterol transportation and gut microbiota, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 7, 3181–3191.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Orhan ÇETİN
Adres :Manavkuyu Mahallesi 245. Sokak Mustafa Bey
Apartmanı 8/1 Daire:1 Bayraklı/İZMİR
E-posta adresi : orhancetin5282@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Aksaray Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Moleküler
Biyoloji Bölümü, 2013-2017
Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Moleküler
Biyoloji ABD, 2017-

YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

1. Oruç, O., Çetin, O., Önal Darılmaz, D., YÜSEKDAĞ, Z. N., 2020. Determination of the biosafety of potential probiotic *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from traditional white cheeses, LWT Food Science and Technology (In Press).
2. Oruç, O., Önal Darılmaz, D., Çetin, O., Beyatlı, Y., 2018. Geleneksel Beyaz Peynirlerden İzole Edilen Potansiyel Probiyotik *Enterococcus faecalis* Suşlarında Sitolizin Aktivitesi ve Vankomisin Direnç Genlerinin Biyogüvenlik Değerlendirmesi Uluslararası Avrasya Kongresi, “Doğal Beslenme ve Sağlıklı Yaşam”, Ankara, Bildiriler Kitabı, 680-686.
3. Önal Darılmaz, D., Oruç, O., Çetin, O., Ceylan, E., 2017. Dairy *Propionibacterium* Strains With Potential Oxalate Degrading Activity And The Effect Of Exopolysaccharide Production, 4th World Congress and Expo on Applied Microbiology.

PROJELER

1. Projenin Adı: Potansiyel Probiyotik *Enterococcus* Cinsi Bakterilerin Kolesterol giderim Mekanizmaları ve *bsh* Gen Analizleri, Projeyi Destekleyen Kurum: Aksaray Üniversitesi, Proje No: 2018-2020, Projedeki görevi: araştırmacı.

