

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ KULLANILARAK
YAĞLARDAN KONJUGE LİNOLEİK ASİT ÜRETİMİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Gıda Müh. Seval BALLIKAYA**

**Anabilim Dalı : Gıda Mühendisliği
Programı : Gıda Mühendisliği**

OCAK 2007

**LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ KULLANILARAK
YAĞLARDAN KONJUGE LİNOLEİK ASİT ÜRETİMİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Gıda Müh. Seval BALLIKAYA
506031523**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 25 Aralık 2006
Tezin Savunulduğu Tarih : 30 Ocak 2007**

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Necla ARAN

Jüri Üyesi : Prof.Dr. Artemis KARAALİ

Jüri Üyesi : Prof.Dr. Güldem ÜSTÜN

OCAK 2007

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın her aşamasında bana destek olan, yardımlarını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, fikirleri ile beni yönlendiren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Necla Aran ve Sayın Prof. Dr. Güldem Üstün'e teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan Ar. Gör. Volkan K. Köseoğlu, Ar. Gör. Neşe Şahin, Ar. Gör. Funda K. Güler, yüksek mühendis Nalan Demir, Ar. Gör. Harika Çankaya, Kimya Mühendisliği Bölümü Ar. Gör. Sevil Yücel ve teknisyen Levent Dinçer'e teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK, Ankara) 105 O 535 No.lu Hızlı Destek Projesi ile vermiş olduğu desteklerinden ötürü teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalışmamı, yaşamım boyunca her zaman olduğu gibi bu çalışmam sırasında da yanımda olan ve bana maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen anlayış gösteren aileme, tüm arkadaşlarıma ve dostlarıma ithaf ediyorum.

Ocak, 2007

Seval BALLIKAYA

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR	v
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÖZET	ix
SUMMARY	x
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. Laktik Asit Bakterileri	3
2.1.1. <i>Lactobacillus</i> ssp.	4
2.1.1.1. <i>Lactobacillus plantarum</i>	5
2.2. Konjuge Linoleik Asit	6
2.2.1. Konjuge Linoleik Asidin Yapısı	7
2.2.2. Gıdalarda CLA Varlığı	8
2.2.3. CLA'nın Sağlık Üzerine Etkileri	10
2.2.3.1. Anti-kanserojen Etkisi	10
2.2.3.2. Koroner Kalp Damar Hastalıklarına Etkisi	12
2.2.3.4. Antioksidan Etkisi	12
2.2.3.5. Anti-diyabetik Etkisi	13
2.2.3.6. Diğer Etkileri	13
2.2.4. Ticari CLA Üretimi	14
2.2.4.1. Alkali İzomerizasyonu	14
2.2.4.2. Hidroksi Yağ Asitlerinin Dehidrasyonu	14
2.2.4.3. Asetilenik Bağların İndirgenmesi	15
2.2.4.4. Biyokimyasal Sentez	15
2.2.5. Laktik Asit Bakterileri Kullanılarak Yağlardan Konjuge Linoleik Asit Üretimi	15
2.2.6. Ayçiçek Yağı	17
2.2.7. Soya Yağı	18
3. MATERYAL VE METOT	19
3.1. Laktik Asit Kültürleri ve Substratlar	19
3.2. Deneysel Çalışmalar	19
3.2.1. Kültürlerin Aktivasyonu	19
3.2.2. Konjuge Linoleik Asit Sentezi	19
3.2.3. Yağların Hidrolizi	20
3.2.4. Yağların Ekstraksiyonu	21
3.2.5. Yağların Metillendirilmesi	21
3.2.6. Kromatografik Analiz	22

3.2.7. Kùltùrlerin CLA Üretimine Etkileri	23
3.2.8. Yağ Asidi Miktarının CLA Üretimine Etkisi	23
3.2.9. <i>Lactobacillus plantarum</i> L5. Kùltürünün Gelişim Eğrisinin Belirlenmesi	23
3.2.10 pH Değişiminin CLA Üretimine Üzerine Etkisi	24
3.2.11. Farklı Yağ Asidi Kompozisyonlarının CLA Üretimine Etkileri	24
3.3. İstatistiksel Analiz	24
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	25
4.1. Yağ Asidi Bileşimleri	25
4.1.1. Ayçiçek Yağı	25
4.1.2. Soya Yağı	26
4.2. Metillendirme Yöntemleri	26
4.3. Bakteri Suşlarının Belirlenmesi	27
4.4. Yağ Asidi Miktarının CLA Üretimine Etkisi	29
4.5. <i>Lactobacillus plantarum</i> L5'in Gelişim Eğrisi	31
4.6. pH Değişiminin CLA Üretimine Etkisi	32
4.7. Farklı Yağ Asidi Kompozisyonlarının CLA Üretimine Etkisi	34
5. SONUÇ	35
KAYNAKLAR	37
EKLER	42
ÖZGEÇMİŞ	48

KISALTMALAR

LAB	: Laktik Asit Bakterileri
G	: Guanin
C	: Sitozin
CLA / KLA	: Konjuge Linoleik Asit
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asidi
DMBA	: 7,12-dimethylbenz[a]anthracene
MNU	: Metil nitrosoüreanin
IQ	: 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f] quinoline
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
VLDL	: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein
DMSO	: Dimetil sülfosid
DMF	: N,N-dimetil formamid
DBU	: 1,8-diazobicyclo [5.4.0]undec-5-ene
DBN	: 1.5-diazobicyclo[4.3.0]non-5-ene
MRS	: Man, Rogosa ve Sharpe Broth
HPLC	: Yüksek Performans (Basınç) Sıvı Kromatografisi
GC	: Gaz Kromatografisi

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1 : Gıdalarda Bulunan CLA Miktarı	10
Tablo 2.2 : Ayçiçek Yağı Yağ Asidi Kompozisyonu.....	17
Tablo 2.3 : Soya Yağı Yağ Asidi Bileşenleri	18
Tablo 4.1 : Ayçiçek Yağı Yağ Asitleri.....	25
Tablo 4.2 : Soya Yağı Yağ Asidi Bileşimi.....	26
Tablo 4.3 : Kullanılan Bakteriler ve CLA, EPA ve DHA Üretimi	27
Tablo 4.4 : Farklı Bakterilerin Farklı Yağ Asidi Miktarlarında CLA Üretimi	29
Tablo 4.5 : Farklı Bakterilerin Farklı Yağ Asidi Miktarlarında ω -3 Yağ Asidi Üretimi	30
Tablo 4.6 : Başlangıç pH Değerinin CLA Üretimine Etkisi	32
Tablo 4.7 : Farklı Yağ Asitleri Kompozisyonun CLA Sentezine Etkisi.....	34
Tablo A.1 : Farklı Bakteri Suşlarının ve Farklı Yağ Asidi Miktarlarının CLA Üretimi Üzerinde Etkilerinin “ANOVA” İstatistiksel Yöntemiyle Değerlendirilme Sonuçları	42
Tablo A.2 : Farklı Başlangıç pH’larının CLA Üretimi Üzerine Etkilerinin “ANOVA” İstatistiksel Yöntemiyle Değerlendirilme Sonuçları	42
Tablo A.3 : Tukey Testi ile Farklı Başlangıç pH’larının Karşılaştırılması.....	42
Tablo A.4 : pH Müdahalesinin CLA Üretimi Üzerine Etkilerinin “ANOVA” İstatistiksel Yöntemiyle Değerlendirilme Sonuçları	42
Tablo B.1 : Ayçiçek Yağı Yağ Asitleri	43
Tablo B.2 : Soya Yağı Yağ Asitleri	44

Tablo B.3 : Konjuge Linoleik Asit Standardı	45
Tablo B.4 : <i>Lactobacillus ssp.</i> L5'in CLA Üretimi	46
Tablo B.5 : <i>Lactobacillus ssp.</i> L1' 100 µL Yağ Asidi İlavesiyle CLA Üretimi	47

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1	: CLA'nın işkembedeki biyohidrojenasyon ve meme dokusundaki desaturasyon ile sentezi.....	7
Şekil 2.2	: Linoleik asidin ve CLA izomerlerinin kimyasal yapıları	8
Şekil 4.1	: <i>Lactobacillus plantarum</i> 'in Gelişim Eğrisi.....	31
Şekil 4.2	: Belirli Saatlerdeki CLA Üretim Yüzdeleri.....	32
Şekil 4.3	: pH Müdahalesinin CLA Üretimine Etkisi.....	33
Şekil B.1	: Ayçiçek Yağı Kromatogramı.....	43
Şekil B.2	: Soya Yağı Yağ Asitleri Kromatogramı.....	44
Şekil B.3	: Konjuge Linoleik Asit Standardı.....	45
Şekil B.4	: <i>Lactobacillus ssp.</i> L5'in CLA Üretimi.....	46
Şekil B.5	: <i>Lactobacillus ssp.</i> L1'in 100 µL Yağ Asidi İlavesiyle CLA Üretimi..	47

LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ KULLANILARAK YAĞLARDAN KONJUGE LİNOLEİK ASİT ÜRETİMİ

ÖZET

Konjuge linoleik asitler, oktadekadienoik asidin (C18:2) geometrik ve pozisyonel izomerleri grubuna girmektedir. Kısaca CLA (conjugated linoleic acid) olarak adlandırılan izomerler birçok gıdada, bazı hayvansal ürünlerde bulunmaktadır. Konu ile ilgili olarak farelerde çeşitli kanser türleri üzerinde yapılan çalışmalarda CLA'nın tümör oluşumunu ve metastazı önlediği gözlemlenmiştir. Ayrıca bağışıklık sistemini güçlendirdiği, gıda alerjenlerine karşı vücut hassasiyetini azalttığı saptanmıştır. Son yapılan çalışmalarda vücut yağlarında azalmaya neden olduğu belirtilmektedir. Ayrıca LDL kolesterolü ve LDL kolesterol / HDL kolesterol oranının azalmasını sağlayarak ve sahip olduğu antioksidan ve pro-oksidan özellikleriyle de damar sertliğini ("arteriosclerosis") önleyici etkileri gözlenmiştir.

Konjuge linoleik asidin ticari eldesinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Alkali izomerizasyonunda, linoleik asidin alkali ortamında izomerizasyonu ile CLA karışımları üretilir. Diğer bir yöntem olan hidroksi yağ asitlerinin dehidrasyonu verimli bir teknik olmasına rağmen, üretim maliyeti ve sentez yolu ticari CLA eldesi için uygun değildir. Son yıllarda önem kazanan metod ise LAB kullanılarak linoleik asitten CLA üretimidir.

Bu projede LAB (laktik asit bakterileri) kullanılarak linoleik asitten CLA (conjugated linoleic acid) sentezi üzerinde çalışılmıştır. Bu amaçla linoleik asit içeriği yüksek yağlardan (ayçiçek ve soya yağı) yağ asidi hidrolizi gerçekleştirilmiş, daha sonra LAB ilave edilen farklı özellikteki ortamlarda linoleik asidin konjuge linoleik aside dönüşümü incelenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde laktik asit bakterileri içinde *Lactobacillus plantarum*'un CLA üretimi için en uygun bakteri olduğu anlaşılmıştır. *Lb. plantarum* 150 µL ayçiçek yağı yağ asitlerinden % 0,8 CLA üretmiştir. İnkübasyon süresi içinde yapılan yapılan pH müdahalesi ile bu oran % 2,33'e kadar artmıştır.

PRODUCTION OF CONJUGATED LINOLEIC ACID FROM OILS BY USING LACTIC ACID BACTERIA

SUMMARY

Conjugated linoleic acids (CLAs) belong to the family of positional and geometric isomers of octadecadienoic acid (18:2). The CLA isomers are found in various kinds of foods, particularly in animal products. Animal studies conducted in this field indicated that CLA inhibited tumourigenesis and metastases in test animals as well as modulating immune system. It was also reported that CLA reduced the sensitivity of animals to allergens, decreased the accumulation of body fat, LDL cholesterol and LDL cholesterol / HDL cholesterol ratio. Besides these beneficial effects it was indicated that CLA exhibited inhibitory effect on arteriosclerosis due to their antioxidant and pro-oxidant properties.

There are several methods for the industrial production of CLA including alkalization of linoleic acid and derivation CLA mixtures. One of the other methods is dehydration of hydroxy fatty acids. Although this is an efficient way to produce CLA, production costs are high for commercial production of CLA. In recent years synthesis of CLA by using LAB from linoleic has received considerable great attention.

In this project, CLA synthesis from linoleic acid was studied by using LAB (lactic acid bacteria). After hydrolyzing of linoleic acid rich oils such as sunflower and soybean oil, CLA synthesis was investigated by using LAB under different cultural conditions. *Lactobacillus plantarum* was obtained as the most suitable bacterium among the lactic acid bacteria. *Lb. plantarum* produced 0,8% CLA from 150 µL fatty acids which was hydrolyzed from sunflower oil. The CLA yield was increased to 2,33% by the treatment of pH change.

1. GİRİŞ

Besinlerin temel işlevi, organizmanın ihtiyaç duyduğu metabolitleri ve enerjiyi karşılamaktır. Aynı zamanda matrikslerinde bulunan çeşitli bileşenler de sağlığınıza olumlu etkiler sağlamaktadırlar. Son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalarda, tüketilen besinlerle (diyet) sağlık (özellikle de kronolojik rahatsızlıklar) arasında önemli etkileşimler olduğu anlaşılmıştır. Özellikle bazı besinlerin sağlığı direk etkilediği ve doğal yollardan alınması gerektiği bilimsel olarak ortaya konduğundan beri tüketicilerin beslenme alışkanlıkları değişim göstermiştir. Besleyici özelliği dışında vücuda fizyolojik yararlar sağlayan ve/veya kronik hastalık riskini azaltabilen besinlere fonksiyonel gıdalar denmektedir. Fonksiyonel besinler teriminin sağlık besinleri, tıbbi besinler ve özel beslenme amaçlı besinler gibi kullanım adları da mevcuttur. LDL kolesterol düzeyinin azaltılmasında rol oynayan α -linoleik asit içeren keten tohumu; fitoöstrojen kaynağı olan ve kanser, kardiyovasküler hastalık, osteoporoz önleme ve tedavisinde rolü olan soya fasulyesi; antioksidan özellikli polifenolik bileşikler içeren yeşil çay, kırmızı üzüm suyu, kırmızı şarap; antikarsinogenik ve antiaterojenik etkiye sahip konjuge linoleik asit (CLA veya KLA) içeren geviş getiren hayvanların et ve süt ürünleri fonksiyonel gıdalara örnek gösterilebilir (Coşkun, 2005).

Batı ülkelerinde günlük besin alımının %30 ile %45'ni yağlar oluşturmaktadır. Yağların, hücre membranında; biyokimyasal düzenleyici sistemlerde; prostogladin, steroid hormonlar ve safra asitleri gibi aktif bileşenlerde öncülük hizmeti; vücutta termal izolasyonu sağlama, iç organları dış etki ve şoklardan koruma; yağda çözünen vitaminlerin yapısında yer alma ve bu vitaminleri vücutta sindirim ve emilimlerini sağlama; vücut için gerekli olan elzem yağ asitlerini sağlama; gıdalarda doku ve lezzete katkıda bulunma gibi rolleri vardır (Dunford, 2004).

Linoleik asidin geometrik ve pozisyonel izomer karışımı olan konjuge linoleik asit insan ve hayvanlar için elzem yağ asididir. Antikanserojen ve damar tıkanlığını azaltma, yağsız kas dokuyu artırma gibi fonksiyonlarının belirlenmesiyle dikkatleri üzerine çekmiştir (Aydın, 2005).

Bu çalışmanın amacı farklı *Lactobacillus* türlerini kullanarak konjuge linoelik asit üretimi, farklı yağ asidi kompozisyonlarını, miktarlarını ve farklı asitlik değęlerinin üretime etkilerinin incelenmesidir.

Çalışma giriş bölümünü takiben, laktik asit bakterileri, konjuge linoleik asitlerin yapısı, gıdalarda bulunuşu, sağlık etkileri, ticari üretim yöntemleri, laktik asit bakterileri kullanılarak üretimini kapsayan özet, kullanılan materyal ve metotlar, elde edilen bulgular ve tartışma ile sonuçlar ve kaynaklar şeklinde sunulmuştur.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Laktik Asit Bakterileri

Laktik Asit Bakterileri (LAB) kavramı, bir grup organizma olarak 19.yy'nın ikinci yarısından sonra bilimsel ve teknik gelişmelerin öncülüğünde, 1900'lerin başında geliştirilmiştir. LAB'in gıda ile etkileşimi, bilim adamlarının dikkatini çekmiş ve Pasteur'ün 1857'de laktik asit fermantasyonu ve takibinde 1873'de Listerin ilk saf bakteri kültürünü (*Bacterium lactis*) ekşimiş süttten izole etmesiyle sonuçlanmıştır (Stiles ve Holzapfel, 1997; Matsuzaki,2003). Daha sonra bu bakteri bağırsaklardan da izole edilmiştir. 1889'da Tissier tarafından *Bifidobacterium* türleri ve 1890'da Moro tarafından da *Lactobacillus acidophilus* keşfedilmiştir (Matsuzaki,2003). 1890 yılında Kiel'de Weigmann ve Kopenhag'da Storch tarafından ekşi süt ve peynir üretiminde starter kültür kullanılmıştır, böylece endüstriyel olarak gıda fermantasyonunun yolu açılmıştır (Stiles ve Holzapfel, 1997).

Grup olarak LAB'lerin önceki tanımları koliform ve laktik bakteriler de dahil olmak üzere süütün fermente edilmesi ve pıhtılaştırılmasına dayanmıştır. 1901 yılında Beijerinck tarafından *Lactobacillus* cinsi bakterilerin Gram pozitif olarak tanımlanmasıyla koliform bakteriler LAB grubundan ayrılmıştır (Stiles ve Holzapfel, 1997). 1919 yılında Orla-Jensen tarafından yapılan taksonomik sınıflandırmada temel olarak morfolojik (kok, basil, spiral, sarmal veya ince uzun) özellikleri, glikoz fermantasyon (homo- veya heterofermantatif) şekli, gelişim gösterdikleri sıcaklıklar ve şekerden faydalanma özellikleri baz alınmıştır. Bu sınıflandırmada LAB'leri *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, ve *Streptococcus* olmak üzere dört gruba ayrılmışlardır (Axelsson, 2004). Genel olarak yapılan sınıflandırmalar bakterilerin hücre morfolojisine, metabolizmasına, metabolizma ürünlerine, fermente şekerlerin spektrumlarına, gelişim sıcaklıklarına, asit ve alkali koşullar ile tuza dirençlerine, hücre duvarı yapısına ve peptidoglikanlardaki peptid bağlarına göredir (Schillinger, 2006).

Tipik laktik asit bakterileri; Gram pozitif, sporsuz formda, katalaz negatif, sitokromdan yoksun, mutlak anaerobik veya fakültatif anaerobik, aside toleranslı, başlıca son ürünü laktik asit olan fermentatif bakterileridir. Gıdalardan, ağız ve bağırsak florasından izole edilmektedir. LAB *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Lactobacillus* ve *Carnobacterium* bakterilerinden oluşmaktadır (Axelsson, 2004).

Gram tarafından geliştirilen gram boyamada, bakterilerin boyamaya karşı gösterdikleri reaksiyona göre sınıflandırma yapmakta mümkündür. Bu boyama yöntemi sonunda kristal viyole ile boyanan bakteriler Gram pozitif (mor renkte), safraninle boyanan bakteriler ise Gram negatif (pembe renkte) olarak sınıflandırılmaktadırlar. Gram boyaya karşı gösterdikleri reaksiyon bakterilerin hücre çeperi yapısı hakkında bilgi vermektedir. Buna göre Gram negatif bakterilerin hücre çeperlerindeki yağ oranı çok yüksek olduğu için alkolle muamele aşamasında renksizleşip karşıt bora rengi olan safranin rengine boyanarak pembe renkte bir görünüm almaktadırlar (Ünlütürk ve diğ., 1999). Ayrıca standart şartlar altında (sınırsız glikoz konsantrasyon ve büyüme faktörü ile sınırlı oksijen varlığında) bakterilerin şeker fermentasyon formları da bir sınıflandırma olarak kabul edilmektedir. Bu koşullar altında glikozu laktik aside fermente eden bakteriler homofermantatif; glikozu laktik asitle birlikte etanol/asetik asit ve CO₂'e fermente eden bakteriler ise heterofermantatif bakterilerdir. Buna göre *Leuconostocs*, *Oenococci*, *Weissellas* ve bazı *Lactobacillus* alt grupları heterofermantatif, diğer bütün LAB'ler homofermantatiftir (Axelsson, 2004).

2.1.1. *Lactobacillus* ssp.

Lactobasiller, çubuk şeklinde, fakültatif anaerobik, sporsuz, katalaz ve oksidaz negatif, ve DNA'sında baz kompozisyonunda G+C'nin % 53'ten daha az olduğu bakterilerdir (Mikelsaar ve diğ., 2004; Ünlütürk ve diğ., 1999). Bu bakteriler gıda endüstrisinde de geniş kullanım alanı bulmuşlardır. Doğal floraları bitki, toprak, bağırsak ve süt ürünleridir. Gelişmeleri için kompleks besin maddelerine ihtiyaç duyarlar. Fermente gıdaların üretiminde yaygın olarak kullanılırlar. Laktik asit bakterileri içinde aside en dayanıklı gruptur. Probiyotik özellik gösterirler (Fondén ve diğ., 2003; Stiles ve Holzapfel, 1997; Ünlütürk ve diğ., 1999).

Gıda mikrobiyologları tarafından, zorunlu homofermantatif, fakültatif heterofermantatif ve zorunlu heterofermantatif olmak üzere üç gruba ayrılmışlardır (Stiles ve Holzapfel, 1997; Ünlütürk ve diğ., 1999).

Birinci grupta yer alan zorunlu homofermantatif laktobasiller genel olarak glikozu laktik aside fermente ederken, pentoz şekerleri ve glukonatları fermente edemezler. Orla-Jensen'in yapmış olduğu sınıflandırmada *Thermobacterium* grubu adını alırlar. *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* (eski adı ile *Lactobacillus lactis*), *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (eski adı *Lactobacillus bulgaricus*), *Lb. acidophilus* ve *Lb. helveticus* bu gruptaki bazı bakterilerdir. İkinci grupta yer alan fakültatif heterofermantatif laktobasiller heksoz şekerleri fermente edebilirler. Fermantasyon ürünleri yüksek oranda laktik asit olup glikoz yokluğunda ise bazı türler tarafından üretilen laktik asit, asetik asit etanol ve formik asittir. Glukonattan gaz üretebilirler ancak glikozdan üretemezler. Ayrıca indüklenebilen (uyarılabilen) fosfoketolazlardan laktik asit üretebilirler. Orla-Jensen sınıflandırmasında *Streptobacterium* grubu olarak adlandırılmaktadırlar. *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* ve *Lb. sake* bu gruba ait bakterilerdir. Üçüncü grup olan zorunlu heterofermantatif laktobasiller, heksoz şekerlerini laktik asit, asetik asit ve/veya etanol ve karbondioksit fermente ederler. Glikozdan gaz üretimi bu bakteriler için karakteristik bir özelliktir. Orla-Jensen sınıflandırmasında *Betabacterium* grubu olarak adlandırılırlar. *Lb. brevis*, *Lb. pantis*, *Lb. ponis*, *Lb. kefir*, *Lb. reuteri*, *Lb. fermentum* bu gruba ait laktobasillerdir (Stiles ve Holzapfel, 1997; Ünlütürk ve diğ., 1999).

2.1.1.1 *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum, sıklıkla fermente sebzelerden izole edilirler. Ayrıca bazı fermente et ürünleri ve turşularda starter kültür olarak kullanılmaktadır (Molin, 2003; Stiles ve Holzapfel, 1997; Turantaş, 1999).

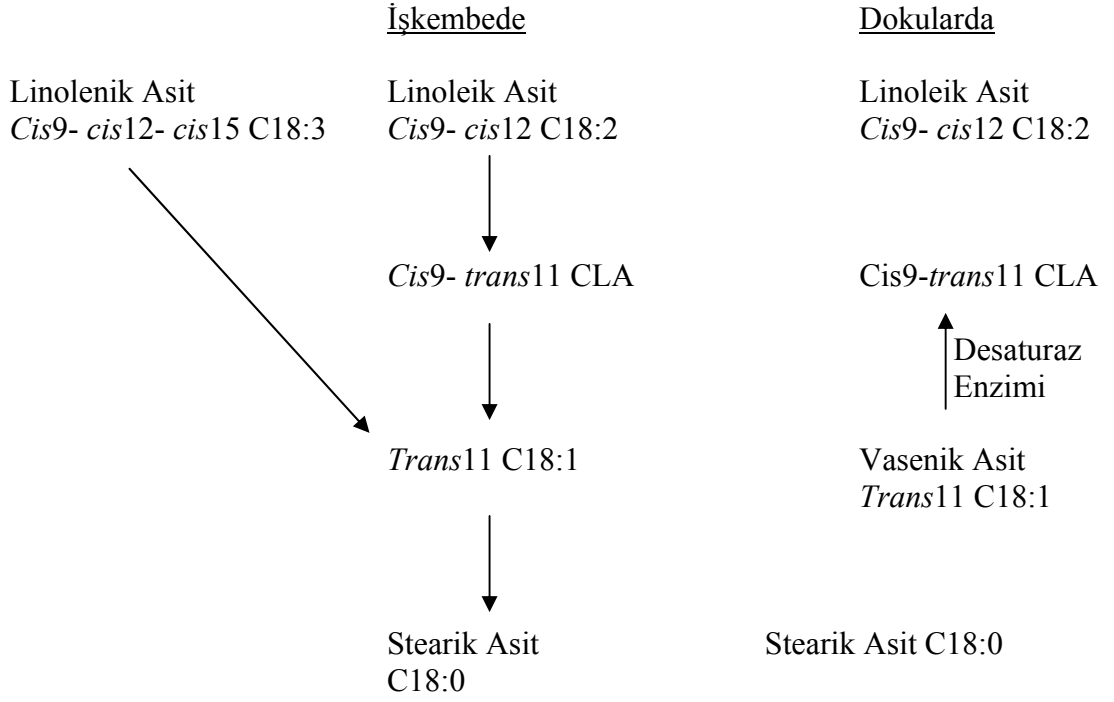
Lb. plantarum türleri, fakültatif heterofermantatif bakteri olup streptobakterdir. Streptobakter olduğu için bazı türleri dışında 45⁰C'de gelişim göstermez (Stiles ve Holzapfel, 1997). Farklı karbonhidratları 37⁰C'de fermente edebilmektedir. Ayrıca heksoz ve pentoz şekerlerinin fermente etmenin yanında malik, tartarik, sitrik asit gibi organik asitlerden de CO₂ üretiminde faydalanmaktadır. Guanin ve sitozin mol

toplamın yüzde değeri % 44-46'dır. pH 4'ün altında da etkinlik gösterebilmektedir (Molin, 2003).

Sebzelerde fermentasyonun son ve baskın bakterisidir. Optimum gelişme sıcaklığı 30⁰C'dir. Adolaz ve fosfoketolaz enzimlerine sahiptir. Starter bakteriler arasında asit üreten bakteri grubundadırlar (Li, 2004). Biyoteknolojik olarak başka kullanım alanları da bulmuştur. Düşük kalorili şekerler olan ve gıdalarda sukroz, laktoz, glikoz veya fruktoz şekerler ile yer değiştirebilen sorbitol, mannitol üretiminde kullanılır. Sorbitol ve mannitol enerji olarak diğer şekerlerden daha az kalori içermektedirler; ancak benzer tatlandırıcı özelliğe sahiptirler. Bu özelliklerinden dolayı diyet besinlerde kullanılmaktadırlar. Bir aminoasit olan, özellikle aminoasitçe zengin ilaçlarda ve glikoz ve fruktoz gibi karbonhidratlarla aynı tatlandırıcı özelliği gösterebilen L-Alanin üretimini de gerçekleştirilir (Sybesma ve Hugenholtz, 2004).

2.2. Konjuge Linoleik Asit (CLA veya KLA)

Konjuge Linoleik Asitler (CLA / KLA), oktadekadienoik asidin geometrik ve pozisyonel izomerlerinin oluşturduğu gruptur. Linoleik asitteki gibi çift bağlar etilen grubuyla (-CH₂-) ayrılmamaktadır. CLA bir çok gıdada bulunmaktadır. Özellikle çoklu doymamış yağ asitleriyle (PUFA) işkembedeki bakteriler biyohidrojenasyon işlemiyle CLA ürettikleri için geviş getiren hayvanlardan elde edilen ürünler (sığır eti, kuzu eti ve süt ürünleri) asıl kaynağıdır (Watkins ve Li, 2002). İşkembede linoleik asidin stearik aside biyohidrojenasyonunda ve meme dokusunda *trans* vassenik asidin linoleik aside desaturasyonunda ara ürün olarak oluşmaktadır. Sütte %70 oranında oluşan *cis*9- *trans* 11 CLA meme salgı bezlerindeki Δ-9 desaturaz enziminin aktivitesiyle vassenik asidin desaturasyonundan oluşur. Şekil 2.1'de biyohidrojenasyon ve desaturasyon yöntemleri gösterilmektedir. Hayvanlara verilen yeme bağlı olarak sütteki CLA miktarı değişir. Örnek vermek gerekirse; taze ot ile beslenen hayvandan elde edilen sütteki CLA miktarı, yem konsantreleriyle beslenen hayvanın sütündeki CLA miktarından daha yüksektir. Buna bağlı olarak özellikle bahar ve yaz mevsiminde sütteki CLA miktarında artış görülmektedir (Yaqoob ve Tricon, 2006; Givens ve Shingfield, 2006).



Şekil 2.1: CLA'nın iştikembedeki biyohidrojenasyon ve meme dokusundaki desaturasyon ile sentezi (Yaqoob ve Tricon, 2006).

Gıdalarda en yüksek CLA değeri, süt ürünlerinde, sığır, dana kuzu etinin yağlı kısımlarında bulunur. Günlük CLA tüketimi, cinsiyete, alınan kaynağa bağılı olarak 0,3 ile 1,5g arasında değışmektedir.

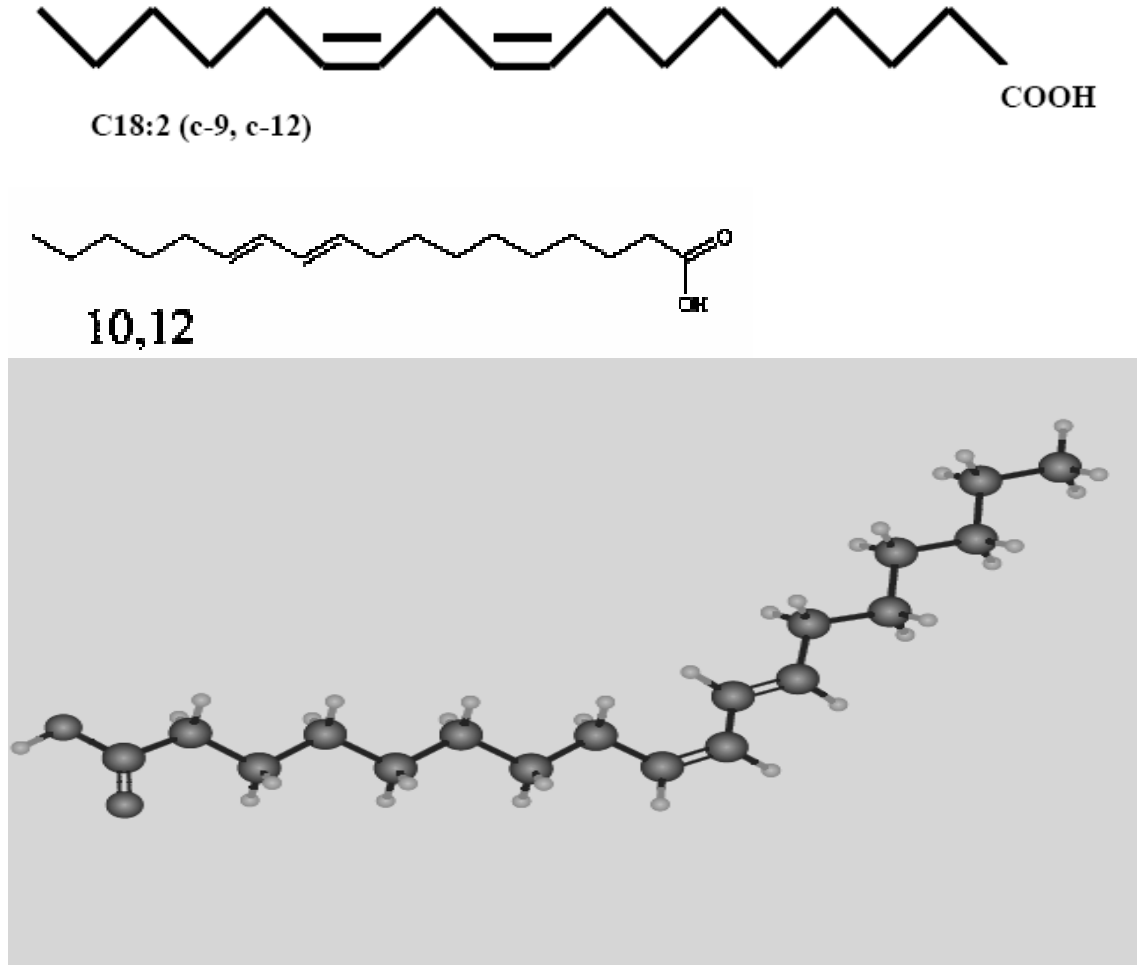
2.2.1. Konjuge Linoleik Asidin Yapısı

CLA'nın dahil olduğı oktadekadienoik asit izomerleri (18:2), 18 karbonlu olup yapılarında 2 çift bağı vardır. Oktadekadienoik asidin diğeri da Linoleik asittir. Linoleik asit yapısında 9 ve 12. pozisyonlarda *cis* konfigürasyonunda çift bağı bulunduran elzem yağ asididir. Mısır, keten tohumu ve pamuk tohumu yağı gibi bitkisel yağlarda yüksek oranda bulunmaktadır (Siems ve diğ., 2001; Watkins ve Li, 2002).

Konjuge dienler; *cis, trans; trans, cis; cis, cis* ve *trans, trans* olmak üzere dört farklı geometrik konfigürasyonda 24 farklı CLA oluşturabilirler. Yüksek konsantrasyonlarda linoleik asit içeren bitkisel yağlardan alkali koşullarda elde edilen ticari CLA preparatlarında bu izomerlerin çoğı bulunmaktadır (Watkins ve Li, 2002).

Geviş getiren hayvanların etinde ve büyükbaş hayvanların süt ürünlerinde en çok bulunan CLA izomerleri; oktadeka-*c9, t11*-dienoik asit ve minör olarak *c9, c11; t9, c11; t9, t11; c10, c12; c10, t12; t10, c12* ve *t10, t12* izomerleridir (Watkins ve Li,

2002; Siems ve diğ., 2001). Şekil 2.2’de linoleik asidin ve CLA izomerlerinin kimyasal yapısı gösterilmektedir.



Şekil 2.2: Linoleik asidin ve CLA izomerlerinin kimyasal yapıları. İlk gösterilen kimyasal yapı linoleik aside aittir (Özsan, 2005). İkinci kimyasal yapı ise *t*10, *t*12 CLA izomerini gösterir (Fritsche ve diğ., 1999). Sonuncu kimyasal yapı ise CLA’nın major izomeri olan *cis*-9, *trans*-11 oktadekadienoik asittir (Dobson, 2002).

Geviş getiren hayvanların etinde ve süt ürünlerinde CLA oluşumunun, hayvanların iştahındaki linoleik veya ihtimal α -linolenik asidin bakteriyel izomerizasyonu sonucu olduğu düşünülür. Ayrıca gıdaların pişme ve ızgara edilmesi gibi ısı işlemlerde CLA oluşur. Izgara işlemi sırasında sığır etindeki CLA miktarı beş kat artmaktadır. CLA izomer karışımlarının endüstriyel ölçekli üretimi mümkündür (Watkins ve Li, 2002; Siems ve diğ., 2001)

2.2.2. Gıdalarda CLA Varlığı

Geviş getiren hayvan kaynaklı gıda lipidleri (sığır eti, süt ürünleri ve kuzu eti) CLA içermektedir. Bu gıdalarda ağırlıklı olarak 9-*cis*, 11-*trans* izomeri bulunmaktadır.

Bu izomerin biyolojik olarak aktif olduğu düşünölmektedir. Süt ürünlerinde, özellikle peynirde CLA miktarı çok yüksektir. Süt ürünlerinde CLA konsantrasyonu 2,9 ile 11,3 mg/g yağ arasında değişmektedir ki 9-*cis*, 11-*trans* izomeri toplam CLA'nın % 73-93 oluşturmaktadır. Sığır yağı, 9-*cis*, 11-*trans* izomeri toplam CLA'nın % 57-85 oluşturacak şekilde 3,1-8,5 mg/g yağ CLA içermektedir. CLA, işkembe bakterileri (rumen bakteriler) tarafından metabolize edilen linoleik asidin normal izomerizasyon ürünüdür; ancak işkembe bakterileri CLA biyosentezi için tek kaynak olmayabilir. Geviş getirmeyen hayvanlardan (domuz ve tavuk) ve bitkisel yağlarda 0,6 ile 0,9 mg/g yağ arasında değişen konsantrasyonlar ile düşük miktarlarda CLA içermektedirler (Chin ve diğ., 1992).

Ha ve diğ. (1989), pişirme sırasında sığır etindeki CLA içeriğinin beş kat arttığını rapor etmişlerdir. Peynir altı suyu proteini ile hazırlanan ticari pastörizasyon işlemi gören peynirin süttten 10 kat daha fazla CLA içerdiği açıklanmıştır. Kızartılmış sığır etindeki CLA seviyesinin 1000 ppm civarında olduğu belirtilmekte olup Amerika'da günlük CLA tüketiminin yüzlerce miligram olabileceğini belirlemektedir. Pişirme sırasında, sığır etinin CLA içeriğini arttırmasına rağmen; pişirme ve gıda işleme boyunca linoleik asidin CLA'e dönüşüm mekanizması bilinmemektedir (Ha ve diğ., 1989).

Geviş getiren hayvanlardan elde edilen ürünleri dışında diğeri bazı hayvansal ürünlerde de özellikle hindi etindeki CLA miktarı oldukça yüksek olup 2,5 mg/g yağ düzeyine ulaşmaktadır. Bu miktarlar tavuk etinde 0,9 mg /g yağ, domuz etinde 0,6 mg/g yağ seviyelerindedir. Bu tip etlerdeki CLA'nın % 82-84'nü *c9*, *t11* CLA izomeri oluşturmaktadır. Ayrıca yumurta sarısı lipidlerinde 0-0,6 mg/g yağ CLA, bitkisel yağlarda 0,1-0,7 mg/g yağ CLA ve bazı deniz ürünlerinde 0,3-0,6 mg/g yağ CLA bulunmaktadır (Watkins ve Li, 2000).

Tablo 2.1: Gıdalarda Bulunan CLA Miktarı

Gıda	CLA içeriği (mg/g yağ) (Watkins ve Li, 2000)	CLA içeriği (mg/g yağ) (Gnädig, 2003)
İşlenmiş Peynir	1,81 - 6,2	5 - 17
Tereyağı	4,7 - 8,11	6,3 - 20,2
Yoğurt	1,7 - 9,01	4,3 - 11,2
İnek Sütü	0,7 - 10,1	4,6 - 17,8
Kuzu Eti	5,6	16,2 - 20,2
Sığır Eti	1,2 - 8,5	6,7 - 9,9
İnsan Sütü	1,7 - 36,4	

2.2.3. CLA'in Sağlık Üzerine Etkileri

1979 yılında Wisconsin-Madison üniversitesinde Micheal Pariza ve arkadaşları pişirme süre ve sıcaklığının hamburger etinde mutajen oluşumu üzerine etkilerini incelerken anti-mutajenik aktivite bulmuşlardır (Cook ve Pariza, 1998; Whigham ve diğ., 2000). Kısmen saflaştırılmış anti-mutajenik ekstraktın 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) tetikli fare epidermal tümörleri önlediği anlaşılmıştır. Anti-karsinojen ve anti-mutajenik etki gösteren bu bileşenin linoleik asidin konjuge formunun geometrik ve pozisyonel izomerleri olduğu anlaşılmıştır. CLA'in sağlık üzerinde çeşitli yararlı etkileri olduğu vurgulanmaktadır (Cook ve Pariza, 1998).

2.2.3.1. Anti-kanserojen Etkisi

Birçok önemli sağlık dergisinde CLA'in anti-karsinojenitesinin çeşitli kanser türleri üzerinde etkisi belirtilmiştir. Sıçan göğüs kanseri modeli kullanılarak CLA'in meme tümörü oluşumu ve ağırlığında azalma sağladığı ve etkin olan dozun diyetle % 1'e

kadar olduğu ispatlanmıştır. Diyetteki CLA miktarının % 1'in üzerinde olmasının herhangi ek koruma sağlanmadığı belirlenmiştir (Whigham ve diğ., 2000).

İlerleyen çalışmalarda metil nitrosoüreanin (MNU) sebep olduğu meme tümörlerinin baskılanmasında tüketilen CLA'nın meme salgı bezi gelişim periyodunu sınırlandığı gösterilmiştir (Whigham ve diğ., 2000).

Otuz altı haftalık çalışmada CLA miktarının % 0.1 olduğu diyetle DMBA'nın kanserojen etkisini azaltmıştır. Ayrıca diyetteki % 1 CLA oranının DMBA tetikli meme tümörü vakalarını % 35 azalttığı kanıtlanmıştır. CLA, meme epitel hücre çoğalma aktivitesini % 15 ile 23 arasında düşürdüğü anlaşılmıştır. Bu gözlem CLA'nın tümör oluşumuna etkisinin direk hedef organa olan etkisi olduğunu düşündürmüştür. Sıçanlarda süten kesilme sonrasında ve buluş çağı dönemlerinde CLA ile beslenme sonraki dönemlerde MNU tetikli tümör oluşumunu % 25 ile 30 oranında azalttığı ispatlanmıştır (Kritchevsky, 2004).

CLA'nın kolon ve rektum kanserlerinin iyileştirilmesinde de olumlu etkileri bulunmaktadır. CLA içeren diyet takviye ürünleri sıçanlarda 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f] quinoline (IQ) oluşumuna karşı korumaktadır. İn vitro analizlerde kanserli hücrelerin çoğalmasını engellediği bilinmektedir. Ancak tüm bu olumlu sonuçlarda etkin olan anti-kanserojen etki mekanizması hala anlaşılmamıştır (Gill ve Rowland, 2003).

CLA'nın anti-kanserojen özelliği, bilinen diğer anti-kanserojenlerden daha farklıdır. CLA hayvansal kaynaklı anti-kanserojendir. Anti-kanserojen özelliği belirlenmiş diğer maddelerin çoğu bitkisel kaynaklıdır. Yağ asidi kaynaklı anti-kanserojen maddedir. CLA'nın anti-kanser etkisi günlük diyetteki tüketim miktarına yakın konsantrasyonlarda olduğu belirtilmektedir. Balık yağının anti-kanserojenik rapor edilmesine rağmen; etki göstermesi için büyük miktarlara (diyet % 10'dan fazlasına) ihtiyaç duyulmaktadır. Diğer taraftan, günlük olarak alınan CLA anti-kanserojen etki göstermesi için yeterlidir (Hunter, 2000).

Yapılan deneyler sonucunda kolon kanseri oluşumunda tüketilen yağ miktarı önemli olduğu açıklanmıştır. Yağ asitlerinin karsinojeniteyi ilerletme etkisi görülmezken linoleik asidin az tüketilmesinde aynı durum söz konusu olmamaktadır. Ayrıca diyetteki yağ miktarı azaltıldığında çoklu doymamış yağ asitlerinin özellikle de elzem yağ asitlerinin etkinliği artmaktadır (Lipkin ve Wargovich, 2000).

2.2.3.2. Koroner Kalp Damar Hastalıklarına Etkisi

Koroner kalp damar hastalıkları ölüm sebepleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Kalp kaslarına oksijen ve kan sağlayan atar damarların işlevini yapamamasıdır. Damarlarda plak oluşumu ve kan akışında azalma olmaktadır. Bu rahatsızlık aterosklerosis olarak bilinmektedir. Oldukça yavaş ilerleyen bir hastalık olup çocukluktan başlayarak ilerleme gösterir (Lovegrove ve Jackson, 2003).

CLA'nın tavşanlardaki damar tıkanması üzerine etkisini araştırmak için kolesterol yağ ve CLA ile çalışma yapılmıştır. 12 haftaya kadar toplam ve LDL kolesterol ve trigliserit kan seviyeleri, fark edilir derecede daha düşük olmuştur. Ayrıca LDL kolesterolün HDL kolesterole oranı ve toplam kolesterolün HDL kolesterole oranı önemli ölçüde azaltılmıştır. CLA ile beslenen tavşanların aort damarları, kontrol tavşanların damarlarına nazaran daha az damar tıkanıklığı göstermiştir (Lee ve diğ., 1994).

CLA karışımları veya *t10*, *c12* izomeri düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterolü (LDL) ve yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterolü (HDL) azalttığı, düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (VLDL) ise arttırdığı açıklanmıştır. Farklı çalışmalarda izomer karışımlarının toplam kolesterol ve trigliserit seviyesini düşürdüğü gözlenmiştir. Ayrıca önemli bir sağlık sorunu olan hipertansiyon iki ana izomerin karışımı (50:50) veya *t10*, *c12* izomeri kan basıncını düşürdüğü için hipertansiyonu da etkilediği rapor edilmiştir. Bu çalışmalarda lipidler üzerinde etkin olan CLA izomerinin *t10*, *c12* izomeri olduğu saptanmıştır (Bhattacharya ve diğ., 2006).

2.2.3.3. Antioksidan Etkisi

Doğal ve sentetik kaynaklı antioksidanların bazı anti-kanserojen etkiler göstermektedir. CLA da antioksidan etkiye sahip olduğu için benzer etki onda da görülmektedir. Oldukça düşük konsantrasyonlarda peroksit oluşumunu önlemektedir. CLA'nın antioksidan aktivitesi α -tokoferolden daha fazladır (Watkins ve Li, 2001). CLA, meme salgı bezinde tiobarbütirik asit oluşumu engellemede E vitamini kadar etkinlik göstermektedir (Ip ve diğ., 1991).

2.2.3.4. Anti-Diyabetik Etkisi

CLA'nın anti-diyabetik etkisi değişkendir. Orta yaşlı kilolu erkeklerle yapılan bir çalışmada *t10, c12* CLA izomeri ve CLA izomerleri karışımı verilmesiyle farklı sonuçlar alınmıştır. CLA izomerleri karışımı verildiğinde glikoz metabolizmasında herhangi bir değişim gözlenmemiştir. *t10, c12* CLA izomeri ise insülin direncini ve glisemiye arttırmıştır. Öte yandan sıçanlarla yapılan bir çalışmada CLA izomer karışımları bozulmuş glikoz toleransı normale dönmüş ve hatta azalmıştır (Gndiğ ve diğ., 2003).

Diyette % 1,5 CLA ile beslenen diyabetik sıçanlarda plazma insülin, kandaki glikoz, trigliserit ve serbest yağ asidi sirkülasyonunda önemli bir azalma gözlenmiştir (Kritchevsky, 2004; Whigham ve diğ., 2000).

İnsanlar üzerinde yapılan çalışmada *t10, c12* izomeri insülin hassasiyetini önemli ölçüde azaltmıştır. Kandaki glikozu bağlanmasını da arttırmıştır. Ancak diğer çalışmaların aksine izomer karışımlarının herhangi bir etkisi gözlenmemiştir (Yaqoob ve Tricon, 2006).

2.2.3.5. Diğer Etkileri

CLA yukarda sayılan etkilerinin yanında bağışıklık sistemine, yağsız kas dokuya, obeziteye etkileri bulunmaktadır.

Yapılan çalışmada, bakteriyel lipopolisakkaritlerin sebep olduğu büyümenin bastırılması üzerine etkisi bilinmektedir. Lipoproteinsakkaritler, gelişimi baskılayarak kilo kaybına sebep olmaktadırlar. CLA takviyesi bu kilo kaybını önlemektedir. Ancak bu önlemede bağışıklık sistemi herhangi kötü bir etki görmeden sorun giderilmektedir (Whigham ve diğ., 2000).

CLA'nın bir diğer etkisi ise yağsız kas doku miktarını arttırmaktır. Çalışmalarda diyetlerinde % 0,5 CLA izomer karışımı ile beslenen farelerde vücut yağ kütlesi azalmakta ve yağsız kas doku miktarı artmaktadır. Diyabetli farelerde yapılan deneyler özellikle *t10, c12* CLA izomerinin yağ kütlesinde azalma sebep olarak kilo alımını azalttığı belirlenmektedir. Yağ kütlesi üzerindeki etkisi artan lipoliz, artan yağ asidi oksidasyonu adipositlerde azalan yağ asidi alımı olarak hipotezlenmektedir (Bhattacharya ve diğ., 2006). CLA lipoprotein lipazı etkisiz hale getirerek trigliseritlerin yağ asidi ve gliserollere ayrılmasını ve daha sonra adipoz dokuda

depolanmasını önlemektedir (Whigham ve diğ., 2000). İnsanlarda yapılan çalışmalarda etkin doz konusunda çelişkiler mevcuttur. Hayvanlarda alınan sonuçların aksine, insanlarla yapılan çalışmalarda net sonuçlar alınamamıştır. Ancak obez kişilerle yapılan bazı çalışmalarda CLA'nın olumlu etkisi gözlenmiştir (Yaqoob ve Tricon, 2006).

2.2.4. Ticari CLA Üretimi

2.2.4.1. Alkali İzomerizasyonu

Alkali koşullar altında linoleik asit (9*c*, 12*c*- 18:2), iki ana izomeri olan 9*c*, 11*t*- 18:2 (% 43-45) ve 10*t*, 12*c*- 18:2 (% 43-45) izomerleri karışımını üretir. Bu iki izomerin yanında 8, 10 ve 11, 13 pozisyonlarındaki CLA'ler üretilir. *cis-trans* ve *trans-cis* izomerlerine ek olarak bütün *cis* ve bütün *trans* izomerleri de oluşur. Farklı solventler (etilen glikol, gliserol, propilen glikol, *tert*-butanol, su, dimetil sülfosid (DMSO), N,N-dimetil formamid (DMF)), katalizörler (lityum, sodyum ve potasyum hidroksit) veya reaksiyon tankını değiştirerek farklı özelliklerde çeşitli CLA izomerleri veya zenginleştirilmiş tek bir CLA izomeri elde etmek mümkündür. Linoleik asidin alkali izomerizasyonu genelde CLA'nın ticari üretiminde kullanılır (Gnädig ve diğ., 2003).

2.2.4.2 Hidroksi Yağ Asitlerinin Dehidrasyonu

Konjuge yağ asitlerinin hazırlanmasında hidroksi yağ asitlerinin dehidrasyonu kullanılır. Saf 9*c*, 11*t*-18:2 CLA'nın hazırlanmasında en iyi yöntem risinoleik asidin dehidrasyonudur. Risinoleik asit (12- hidroksi- oktadeka- 9*Z*- enoik asit), bağlı olarak ucuz başlama maddesi olup hint yağından ekstrakte edilir (Gnädig ve diğ., 2003).

Hidroksi grubu daha kolay ayrılan bir forma dönüşmesi için modifiye edilir ve metil risinolat metilat formuna çevrilir. Metil 12- metiloksioleat, deney koşullarına bağlı olarak yarışçı eliminasyon veya yerine koyma tepkilerine maruz kalabilir. Eliminasyon baskın reaksiyon olup uygun bazla konjuge olan ve olmayan oktadekadienoatlar temel reaksiyonlardır. Özellikle 12 saat 1,8-diazobicyclo [5.4.0]undec-5-ene (DBU) veya 1.5-diazobicyclo[4.3.0]non-5-ene (DBN) gibi polisiklik bazla ısıtılması % 100 eliminasyon verir. Risinolatın % 70'den fazlasından 50-60g 9*c*, 11*t*-18:2 oktadekadienoat izomeri hazırlanmasında DBU bazıyla dört saat

ısıtılması yeterlidir. Verimli bir reaksiyon olmasına rağmen; DBU gibi pahalı eliminasyon ajanının kullanılması üretim maliyetini arttırmakta ve ticari sentez için yöntem kullanışsız kılmaktadır (Gnädig ve diğ., 2003).

Bir başka yöntemde metil 9*t*, 11*t*-18:2 CLA izomeri, 9, 12- dihidroksi- 10*t*-oktadekanoattan klorotrimetilsilan ve asetonitrilde sodyum kullanılarak % 72 oranında üretilir (Gnädig ve diğ., 2003).

2.2.4.3 Asetilenik Bağların İndirgenmesi

Santalum album tohumu yağından izole edilen veya risinoleik asitten hazırlanan santalbik asit (oktadeka-11*E*-en9-noik asit) 9*c*, 11*t*-18:2 CLA izomeri üretmekte faydalı bir öncüdür. *Z*-olefinik bağlara nazaran asetilenik bağların indirgenmesinde sulu *n*-propanol içindeki çinko yüksek seçicilik gösterir. Bu yöntemi kullanarak metil santalbattan % 82 oranında saf 9*c*, 11*t*-18:2 CLA üretilebilir. Aynı şekilde santalbik asidin *Z* izomerinden (oktadeka-11*Z*-en9-noik asit) 9*c*, 11*c*-18:2 CLA üretmek mümkündür. Aynı mantıkla katalizörü değiştirerek veya çinko yerine demir kullanarak CLA izomerleri üretilebilir (Gnädig ve diğ., 2003).

2.2.3.4 Biyokimyasal Sentez

Biyokimyasal sentezle CLA üretiminde bakteri ve alglerden izole edilen spesifik enzimler kullanılır. Sentez, 9*c*, 11*t*-18:2 CLA izomeri ile sınırlıdır. İşkembedeki *Butyrivibrio fibrisolvens* bakterisinden izole edilen linoleat izomeraz enzimi kullanılarak linoleik asitten 9*c*, 11*t*-18:2 CLA üretilir. Son yıllarda *Lactobacillus* türleri kullanılarak da 9*c*, 11*t*-18:2 CLA üretimi gerçekleştirilmektedir (Gnädig ve diğ., 2003).

2.2.5. Laktik Asit Bakterileri Kullanılarak Yağlardan Konjuge Linoleik Asit Üretimi

İşkembedeki bakteriler linoleik asit izomeraz enzimi üretebilmeleri sebebiyle geniş getiren hayvanların işkembesindeki depo yağlarında yüksek oranda CLA sentezlenmektedir. Linoleik asit izomeraz aktivitesine propiyono bakterilerinde ve laktik asit bakteri çeşitlerinde rastlanmaktadır (Lin, 2006).

Ando ve diğ. (2004), *Lb. plantarum* bakterisini kullanarak risinoleik asit açısından zengin ve ucuz bir hammadde olan hint yağından CLA ürettiklerini belirtmektedirler.

De Man Rogosa Sharpe (MRS) besiyerinde α -linolenik asit ilavesi ile geliştirilmiş, yıkanmış hücreler için uygun bir substrat olmayan trigliserit lipaz enzimi kullanılarak uygun hale getirilmekte ve sonuçlar Gaz Kromatografisinde incelenmektedir. Hidroliz sonucu oluşan risinoleik asitten CLA sentezi gerçekleştirilmektedir. Yıkanmış hücre elde etmede en etkin yöntemin α - linolenik asit varlığında hücrelerin çoğaltılması olduğu anlaşılmaktadır.

Risinoleik asit kullanılarak yapılan bir başka çalışmada *Lb. plantarum*'un farklı koşullarda CLA üretebilme özelliği araştırılmaktadır. Hint yağının substrat olarak kullanılmasıyla oldukça düşük miktarda CLA sentezi gözlenmekteyken, risinoleik asidin kullanılmasıyla sentezde en iyi sonuç alınmaktadır. Besiyerine ilave edilen farklı yağ asitleri (linoleik ve α - linolenik asit) kullanılan substrata bağlı olarak farklı sonuç vermektedir (Kishino ve diğ., 2003).

Lin (2006) yaptığı çalışmada yıkanmış *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* bakterisini ve bu bakteriden elde ettiği linoleik asit izomeraz enzimini kullanarak CLA üretmektedir. Lin, çalışmasında substrat olarak oleik, linoleik ve linolenik yağ asidi kullanmaktadır. Yüksek Performans (Basınç) Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile yapılan analiz sonuçlarına göre en yüksek CLA üretimini yıkanmış hücrelerle linoleik asit kullanarak elde ettiğini vurgulamaktadır.

Lin ve diğ. (2005), çalışmalarında *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *Lb. acidophilus* bakterisini immobilize ederek CLA üretmektedirler. En fazla CLA sentezini araştırırken, serbest hücre kullanarak karşılaştırma imkanı sunmaktadırlar. HPLC ile yaptıkları analiz sonuçlarına göre serbest hücrelere nazaran daha alkali ortamlarda (pH=9) CLA üretimini gerçekleştirmektedirler. İmmobilizasyonun en büyük yararlarından biri olan birçok defa kullanma özelliğinden de faydalanmaktadırlar.

Lb. acidophilus ile yapılan bir başka çalışmada bakteriden enzim elde edilmektedir. Farklı enzim ve linoleik asit miktarlarının CLA sentezine etkisi incelenmektedir. Çalışma sonucunda artan enzim ve linoleik asit miktarı üretilen CLA miktarını da artırmaktadır (Lin ve diğ., 2003).

Bir başka çalışmada, süt ve süt ürünleri endüstrisinde kullanılan laktobasil, laktokok, streptokok ve propiyonibakter grubuna ait on dokuz farklı bakteri ile alınan sonuçlar açıklanmaktadır. Çalışmada faktör olarak bakteriler, linoleik asit miktarı ve besiyeri esas alınmaktadır. Sonuçlara göre bu on dokuz bakteriden sadece propiyonobakter

grubuna ait üç bakteri CLA üretebilmektedir. Deney koşulları incelendiğinde soydum laktat içeren besiyerinde sadece bir bakteri CLA üretebilirken, yağsız süt tozu (skim milk) içeren besiyerinde diğer bakteriler de sentez yapabilmektedir. Linoleik asit miktarı bakteriye bağlı olarak değişmekle birlikte belirli bir miktardan sonra bakteri gelişiminde inhibe edici özellik göstermektedir (Jiang ve diğ., 1998).

2.2.6. Ayçiçek Yağı

Ayçiçek yağı, *Helianthus annuus* bitkisi tohumlarından elde edilmektedir. Bitkideki yağ oranı % 39-45 arasında değişmektedir. Ayçiçek tohumunun bazı bileşenlerine bakıldığında kabuk kısmının % 26-35, iç kısmının % 65-74, nemin % 6-11 ve yağın % 39-45 olduğu görülmektedir (Gümüşkesen, 1999).

Ham ayçiçek yağı kehribar rengindeyken, rafine edilmiş ayçiçek yağı sarı renktedir. Ayçiçek yağının diğer yağlardan farklı olarak kötü tat ve kokusu vardır; ancak bu tat ve koku deodorizasyon işlemi ile giderilmektedir. Ayçiçek yağı, yağ asitleri açısından yüksek miktarda linoleik asit içermektedir (Gümüşkesen, 1999; O'Brien, 2004). Ayçiçeği yağının yağ asidi kompozisyonu Tablo 2.2'de verilmektedir.

Tablo 2.2: Ayçiçek Yağı Yağ Asidi Kompozisyonu

Yağ Asidi	% Değerleri (Karaali, 1985)	% Değerleri (Kochhar, 2001)	% Değerleri (O'Brien, 2004)
Palmitik	3 – 6	7	5,6 – 7,6
Stearik	1 – 3	4,5	2,7 – 6,5
Oleik	14 – 43	18,7	14 – 39,4
Linoleik	44 – 75	67	48,3 – 74
Linolenik	< 0,7	0,8	< 0,2
Araşidik	0,6 – 4		02 – 0,4

Ayçiçek yağı, en çok tüketilen yağlar sıralamasında dördüncü sıradadır. Özellikle Rusya, Ukrayna, Arjantin, Macaristan'da geniş üretim alanları bulmaktadır. Ülkemizde tüketilen bitkisel yağların % 48,4'ünü ayçiçek yağı oluşturmakta ve

Trakya ve Marmara bölgesi % 40'lık tüketim oranıyla birinci sırada yer almaktadır. Sıvı yağ olarak yemek ve kızartmalarda ayrıca margarin üretiminde kullanılmaktadır (Hatırlı ve diğ., 2002; Gümüşkesen, 1999; O'Brien, 2004).

2.2.7. Soya Yağı

Soya yağı *Leguminosae* familyasından *Glycine max* bitki türünün tohumlarından elde edilir. Uzak Doğu ülkelerinde ve özellikle Çin'de yüzyıllardır diyetlerinin parçası olan soya yağı yüksek miktarda çoklu doymamış yağ asidi içermektedir (Gümüşkesen, 1999; O'Brien, 2004). Soya yağının yağ asidi bileşenleri Tablo 2.3'de verilmektedir.

Tablo 2.3: Soya Yağı Yağ Asidi Bileşenleri

Yağ Asidi	% Değerleri (O'Brien, 2004)	% Değerleri (Karaali, 1985)
Miristik	< 0,2	< 0,5
Palmitik	8,8 – 13,3	7 – 14
Palmitoleik	< 0,2	< 0,5
Stearik	2,4 – 5,4	1,4 – 5,5
Oleik	17,7 – 26,1	19 – 30
Linoleik	49,8 – 57,1	44 – 62
Linolenik	5,5 – 9,5	4 – 11

Soya yağı önceleri sanayi yağı şeklinde kullanılan; fakat boya yağı olarak oldukça geç kuruyan bir yağdır. İçeriğindeki yüksek linolenik asit tadını olumsuz etkilemekte; hidrojenizasyon ile bu durum giderilebilmektedir. Besinsel kalitesinden, ekonomik olarak ucuz oluşundan, kolay bulunabilirliği ve işlev olarak geniş kullanım alanı bulmasından ötürü oldukça rağbet gören bir yağdır (O'Brien, 2004).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Laktik Asit Kùltürleri ve Substratlar

Bu çalışmada çeşitli fermente gıdalardan izole edilmiş on adet *Lactobacillus* spp. (L 1-10) kùltürleri ile çalışılmıştır. Bakteriler % 25 gliserol içeren “De Man Rogosa Sharpe” (MRS) (Merck, Almanya) ortamında -18°C’de, MRS agar kùltür ortamında dikey ve yatık ekim yapılarak +4°C’de ve Litmus Milk içinde olmak üzere farklı yöntemlerle muhafaza edilmişlerdir.

Çalışmada hidrolizasyon işlemine tabii tutularak kullanılan ayçiçek ve soya yağı marketlerden, saf Linoleik Asit (L1376) ise Sigma (A.B.D.) firmasından temin edilmiştir. Ayçiçek ve soya yağı oda sıcaklığında, saf linoleik asit ise -18°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2. Deneysel Çalışmalar

3.2.1. Kùltürlerin Aktivasyonu

Çalışma öncesi stok kùltürler önce MRS ortamına, ardından MRS yatık agara alınarak 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. MRS agardan alınan kùltürler MRS Broth (5-7 mL) içeren deney tüplerine inoküle edilmiş, 37°C’de 24 saat inkübasyonun ardından MRS Broth’da 12 saat aktive edilmiştir. (Lin ve diğ., 1999).

3.2.2. Konjuge Linoleik Asit Sentezi

Aktive edilen kùltürler % 12 (w/v) yağsız süt tozu (skim milk) içeren MRS Broth’a (10 ml) aktarılmış ve inkübasyona bırakılmıştır (37°C / 24 saat). İnkübasyon süresi sonunda 20 mL MRS Broth içeren erlenlere 0,1 mL bakteri inokulasyonu yapılmıştır. Ortama linoleik asit kaynağı olarak da Bölüm 3.2.3.’de yöntemle elde edilen yağ asitleri ve saf linoleik asit ilave edilmiştir (Lin ve diğ., 1999). İnkübasyon sonunda örneklerdeki yağ asitleri Bölüm 3.2.4. açıklandığı şekilde ekstrakte edilmiştir. Ekstrakte edilen yağ asitleri kromatografik analiz için Bölüm 3.2.5.’de belirtildiği

gibi metillendirilmiştir. Kromatografik analiz Bölüm 3.2.6. anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

3.2.3. Yağların Hidrolizi

Deney çalışması için substrat seçilen ayçiçek ve soya yağı yapılarında triglisertler ihtiva ettiği için öncelikle trigliseritlerin yağ asitlerine dönüştürülmesi sağlanmıştır.

Trigliseritlerin yağ asitlerinin ayrıştırılması için sabunlaştırma işlemi yapılmıştır. 12 g KOH (Riedel, Almanya), 10 mL suda çözündürülmüş ve üzerine 200 mL etanol (Riedel, Almanya) ilave edilerek KOH'li etanol çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiye 20 g yağ ilave edilerek geri soğutuculu ısıtıcıda 1,5 saat kaynatılmıştır. Böylece yağlarda trigliserit yapısını oluşturan gliserol ve üç yağ asidi arasındaki bağlar parçalanmış ve yağ asitleri açığa çıkmıştır. Kaynatma işleminden sonra soğutma yapılarak su ilave edilmiştir. Yağın yapısında bulunan sabunlaşmayan madde ve sterollerin ortamdan uzaklaştırılması için karışım ayırma hunisine alınmış ve 200 mL hekzan (Riedel, Almanya) ilave edilmiştir. Ayırma hunisinde iki faz açığa çıkmıştır. Alttaki faz sulu faz olup içerisinde yağ asitlerini barındırmakta iken üstteki faz hekzan fazı olup sabunlaşmayan maddeleri, sterolleri içermektedir. Ayırma fazı ile alttaki sulu faz alınmış ve ayırma işlemi iki defa tekrarlanmıştır. Sulu fazın içerisinde yağ asitlerinin potasyum sabunları olduğu için ortam oldukça baziktir. Yağ asitlerini bu sabunlardan ayırmak için pH 1-3 olacak şekilde ortama 3N HCl (Riedel, Almanya) ilave edilmiştir. Ortamdaki yağ asitlerinin ekstraksiyonu için yağ asitleri ve tuzların bulunduğu karışım ayırma hunisine alınarak 50 mL hekzan ilave edilmiştir. Ayırma hunisinde oluşan iki fazdan üstteki hekzan fazı olup bünyesinde yağ asitlerini bulundurmakta ve alttaki faz sulu faz olup tuzları ihtiva etmektedir. Hekzan fazı alınarak su ile yıkanıp vakumlu döner buharlaştırıcıda uçurulmuştur. Döner buharlaştırıcının sıcaklığı 40⁰C'ye ayarlanmış ve hekzan 20-25 dakikada uzaklaştırılmıştır. Böylece yağ asitleri elde edilmiştir (Senanayake ve Shahidi, 1999).

Elde edilen yağ asitleri deneylerde kullanılmak amacıyla +4⁰C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.4. Yağ Asitlerinin Ekstraksiyonu

Yağ asitlerinin ekstraksiyonunda Hekzanla Ekstraksiyon metodu uygulanmıştır. Bu metoda göre inkübasyon süresi biten yağ asidi ve bakteri içeren MRS Broth inkübatörden alınarak çeker ocakta 200 mL hekzan ilave edilmiştir. Homojenizasyon için beş dakika boyunca blenderda iyice karıştırılmıştır. Homojenizasyon işleminden sonra ayırma hunisine alınarak faz oluşumu için 2-3 dakika beklenmiştir. Faz oluşumunu kolaylaştırmak için ortama saf su ilave etmek de mümkündür. Daha sonra elde edilen yağ asidi hekzan karışımı vakumlu döner buharlaştırıcıya konarak 40°C'de 5-10 dakika ısıtılmış ve hekzan uçurularak oluşan yağ asitleri elde edilmiştir.

3.2.5. Yağ Asitlerinin Metillendirilmesi

Yağ asitlerinin metillendirme işleminde dört farklı metot kullanılmıştır. Metotlardan biri asitle metillendirme diğeri ise sodyum metoksit kullanarak metillendirmedir.

Asitle metillendirme yöntemi asidik ortamda ısısal işlem temeline dayanmaktadır. Hekzanı uçurulan yağ asitlerine % 6 HCl içeren metanol çözeltisinden 3 mL ilave edilmiş ve 1 dakika karıştırılmış ve 75°C'de 2 saat etüvde bekletilmiştir. 2 saat sonunda hızlı bir şekilde soğutulduktan sonra metanollü karışıma 2 mL hekzan ve 1 mL 0,1 M KCl (Riedel, Almanya) ilave edilmiş ve vorteks yardımıyla 1 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra 1000 rpm'de 3 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj işleminden sonra tüplerde oluşan ikili fazdan üstteki hekzan fazı bir başka tüpe aktarılmıştır. Altta kalan faza ise tekrar 2 mL hekzan ve 1 mL 0,1 M KCl ilave edilerek karıştırılmış ve 1000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan fazlardan üstteki hekzan fazı işlem tekrarlanmadan önce ayrılan hekzan fazının bulunduğu tüpe aktarılmıştır. İçerisine susuz sodyum sülfat (Riedel, Almanya) ilave edilerek ortamdaki su uzaklaştırılmıştır (Jenning ve Akoh, 1999)

Sodyum metoksit kullanılarak metillendirmede üç farklı metot uygulanmıştır.

İlk yöntemde yağ asitleri sodyum metilat (Fluka, Almanya) ile *trans* esterifiye edilerek metillendirilmiştir. Bu yöntemde 1200 µL n-hekzan, 300 µL % 10 yağ asidi içeren n-hekzan ve 30 µL 2 N sodyum metilat – metanol çözeltisi 3 dakika boyunca karıştırılmıştır. Karıştırma işleminden sonra 2000 min⁻¹'de 2 dakika santrifüj edilmiş ve faz oluşumu sağlanmıştır. Üstte kalan sıvı kısım (supernatant) Gaz Kromatografi (GC) aletine direk verilmiştir (Precht ve Molkentin, 2000).

İkinci yöntem olarak Schulte ve Weber yöntemi kullanılmıştır. 10 mg yağ asidi karşımı 1 mL hekzanda çözündürülmüş ve 20-50 µL 2N sodyum metilatlı metanol çözeltisi ilave edilmiştir. Bu karışım 30 saniye boyunca karıştırılmış, ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Bekletme süresini sonunda 100 mg kalsiyum klorit (Merck, Darmstadt, Almanya) ilave edilerek tekrar karıştırılmış ve santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Oluşan üst faz Gaz Kromatografisinde incelenmiştir (Koning ve diğ., 2001).

Son yöntemde ise yaklaşık olarak 100 ± 20 mg yağ asidi 5 mL hekzanda çözündürülmüştür. Bu hekzan çözeltisinden 500 µL alınarak 10 µL 2 N sodyum metilat – metanol çözeltisi ve 240 µL hekzan ile vorteks kullanılarak 3 dakika karıştırılmıştır. 1 dakika santrifüj edildikten sonra 100 mg sodyum hidrojen sülfat monohidrat (Merck, Darmstadt, Almanya) ilave edilmiştir. Karışımın son hali başka bir tüpe aktarılmış ve tekrar karıştırma ve santrifüj işlemleri yapılmıştır. Santrifüj sonunda oluşan berrak berrak üst tabaka GC’de incelenmiştir (Precht ve Molkenin, 1998)

3.2.6. Kromatografik Analiz

Metillendirilen yağ asidi numuneleri, yapılarındaki yağ asidi bileşenlerinin yüzdesinin belirlenmesi amacıyla Gaz Kromatografisi (GC) cihazında incelenmiştir. GC ekipmanı olarak Trace Chromoquest (2000) kullanılmıştır. GC’de endüstriyel analiz metodu uygulanmıştır. Dedektör tipi olarak FID (Flame Ionization Dedector - Alev İyonizasyon Dedektörü), kullanılmıştır. Yöntem spitless olarak düzenlenmiştir. Taşıyıcı gaz olarak Helyum, yanıcı gaz olarak Hidrojen ve kuru hava kullanılmıştır. Metodun ayrıntıları aşağıda verilmiştir:

Dedektör Tipi	: FID (Alev İyonizasyon Dedektörü)
Dedektör Sıcaklığı ($^{\circ}\text{C}$)	: 260
Enjeksiyon Sıcaklığı ($^{\circ}\text{C}$)	: 250
Gaz Hızları (mL/dak)	
Helyum	: 5
Hidrojen	: 35
Hava	: 350
Fırın Sıcaklığı ($^{\circ}\text{C}$)	: 150 (5 dakika)
	: 150 – 225 ($10^{\circ}\text{C}/\text{dak}$)
	: 225 (10 dak.)

Kolon Tipi : Kapiler Kolon
: Polietilen Glikol dolgu maddeli Yağ Asidi Kolonu (DB-Wax)

GC’de numunelerdeki yağ asidi kompozisyonuna bakılmıştır. Referans olarak yağ asitleri ve CLA standartları kullanılmıştır. Numuneler ve standartlar aynı cihaza, aynı şartlar altında verilerek kromatogram sonuçları alınmıştır.

Kromatogram sonuçları incelenerek elde edilen yağ asidi bileşimi ve CLA oluşum yüzdeleri belirlenmiştir.

3.2.7. Kültürlerin CLA Üretimine Etkileri

Lactobacillus kültürlerinin toplam on farklı suşu ile çalışma yapılmış, kromatogram sonuçları değerlendirilerek CLA sentezi açısından en yüksek verim alınan üç bakteri ile çalışmalara devam edilmiştir. Bu bakteriler API sistemi (API 50 CHL Medium (BioMérieux; Marcy l’Etoile Fransa) ile tanımlama yapılmıştır. Tanımlama işlemi sonucunda L1 *Lb. plantarum*, L5 *Lb. plantarum* ve L9 *Lb. rhamnosus* olarak belirlenmiştir. İlerleyen çalışmalara *Lb. plantarum* L5 ile devam edilmiştir.

3.2.8. Yağ Asidi Miktarının CLA Üretimine Etkisi

Ayçiçek yağı yağ asitleri miktarının üretilen CLA miktarına etkisini araştırmak amacıyla hazırlanan deney planında daha önceden yapılan tarama ile belirlenen üç bakteri Bölüm 3.2.1.’de belirtildiği şekilde aktive edilmiştir. Substrat olarak kullanılan ayçiçek yağı yağ asitleri tarama çalışmalarında ortama başlangıçta 150 µL olarak ilave edilmiştir. İleriki çalışmalarda optimizasyon amacıyla 100 µL, 150 µL ve 200 µL’lik miktarlarda ayçiçek yağı yağ asitleri içeren ortamlarda deneyler yürütülmüştür. İnkübasyon süre ve sıcaklığı yine 37⁰Cde 24 saat olarak sabit tutulmuştur.

Bu çalışmada alınan sonuçlara bağlı olarak deneylerin devamında çalışılacak yağ asidi miktarı ve o miktarda en iyi CLA üretim sonucu verebilecek olan bakteri seçilmiştir.

3.2.9. *Lactobacillus plantarum* L5 Kültürünün Gelişim Eğrisinin Belirlenmesi

Üç bakteri arasında en yüksek miktarda CLA sentezleyen *Lb. plantarum* L5 kültürü ile çalışmalara devam edilmiştir. *Lb. plantarum* L5’nin gelişim eğrisini belirlemek amacıyla yapılan deney planında yirmi beş tane 50 mL’lik ağzı vidalı kapaklı

şişelerde 20 mL ve bir tane de 100 mL'lik şişede 40 mL MRS Broth hazırlanarak sterilize edilmiştir (118°C/15 dak.). Yağsız süt tozu içeren MRS Brtoh'tan 50 mL'lik şişelere 0,1 mL ve 100 mL'lik schot şişesine 0,2mL inokülasyon yapılmıştır. İnokülasyonun yapıldığı andan itibaren her saat başı 50 mL'lik şişelerden birer tane alınmış, pH ölçümleri (Hanna Instruments, A.B.D.) yapılmış ve üzerlerine alındıkları saat belirtilerek derin dondurucuda(-18°C) muhafaza edilmişlerdir. Diğer taraftan her saat başı 100 mL'lik şişede bulunan 40 mL'lik MRS Broth'dan da 1'er mL alınarak 9 mL steril peptonlu suya inoküle edilmiş, ileri seyreltimler yapılarak her seyreltimden 0,1 mL alınarak MRS Agar (Merck, Almanya) içeren petrilere yayma plak yöntemiyle ekim yapılmıştır. Petriler 37⁰C'de 48 saat inkübe edilmiş ve bu süre sonunda sayılmıştır. Sayım sonuçları dikkate alınarak bakterinin gelişim eğrisi çizilmiştir.

3.2.10. pH Değişiminin CLA Üretimine Etkisi

Lb. plantarum L5 kültürünün gelişim eğrisi ve pH değişimi dikkate alınarak -18°C'de muhafaza edilen örneklerden bazıları seçilmiş ve CLA analizi yapılmıştır. Ayrıca gelişimin değişik evrelerinde pH'da değişiklikler yapılmış ve pH 5,5 – 6,0'ya ayarlanmıştır. Belirlenen saatlerde steril 3 N NaOH ile yapılan müdahale sonrasında kültürlerin gelişiminin devamı için örnekler inkübatöre alınmış ve inkübasyona devam edilmiştir.

3.2.11. Farklı Yağ Asidi Kompozisyonlarının CLA Üretimine Etkileri

Lb. plantarum L5 için optimum yağ asidi miktarı (150 µL) ve pH değeri (5,5 – 6,0) belirlendikten sonra aynı koşullarda soya yağı yağ asidi ve % 99 saf linoleik asit (Sigma, A.B.D) ile deney tekrarlanmış, farklı yağ asidi kompozisyonlarının CLA üzerindeki etkileri incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda substrat olarak ayçiçek yağı ile birlikte yağ asidi kompozisyonu linoleik asitçe zengin olan soya yağı ve % 99,5 saflıkta linoleik asit kullanılmıştır. Aktive edilen ve süt tozu içeren MRS besiyerinde geliştirilen bakteriler daha sonra 20 mL MRS içeren erlenlere aktarılmıştır. Erlenlere linoleik asit miktarı eşit olacak şekilde ayçiçek yağı yağ asidi, soya yağı yağ asidi ve saf linoleik asit ilave edilmiş, inkübasyona (37⁰C / 24 saat) bırakılmıştır. Inkübasyonun 12. saatinde erlenlere steril 3 N NaOH ilavesiyle pH 5,5 – 6,0 olacak şekilde ayarlanmış ve inkübasyon devam ettirilmiştir.

3.3. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için Varyans analizi (ANOVA) Minitab 12 for Windows paket programı kullanılmıştır. Farklı bakteri kültürlerinin, farklı yağ asidi miktarlarının, farklı pH değerlerinin ve farklı yağ asidi kompozisyonlarının CLA üretimi üzerine etkisi Tek Yollu ve İki Yollu ANOVA istatistiksel yöntemiyle değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Yağ Asidi Bileşimleri

4.1.1. Ayçiçek Yağı

Çalışmalarda kullanılan substrat ayçiçek yağı yağ asitleridir. Ayçiçek yağı yağ asitlerine ayrıldıktan sonra bileşimindeki yağ asitlerinin belirlenmesi amacıyla kromatografik analiz yapılmıştır. Ayçiçek yağının kromatogramı ve alıkonma süreleri Şekil B.1. ve Tablo B.1.'de verilmiştir. Kromatografik analiz sonuçlarına göre ayçiçek yağı yağ asitleri bileşimi Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1: Ayçiçek Yağı Yağ Asitleri

Yağ Asitleri	% Değerler	% Değerleri (Karaali, 1985)
Palmitik Asit (C16:0)	6.08	3 – 6
Palmitoleik Asit (C16:1n-7)	0.11	-
Stearik Asit (C18:0)	3,66	1 – 3
Oleik Asit (C18:1n-9)	30,25	14 – 43
Linoleik Asit (C18:2n-6)	59,39	44 – 75
Araşidonik Asit (C20:4n-6)	0,51	0,6 – 4

Bu elde edilen veriler ile literatürdeki ayçiçek yağı yağ asitleri kompozisyonu benzerlik göstermektedir.

4.1.2. Soya Yağı

Substratlardan biri olan soya yağının hidrolizi sonucunda elde edilen yağ asitleri kromatografik analiz ile belirlenmiştir. Yağ asitlerinin alıkonma süreleri ve yüzde değerleri Şekil B.2 ve Tablo B.2’de belirtilmiştir. Soya yağı yağ asitleri bileşimi Tablo 4.2’de literatürdeki kaynaklarla karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Tablo 4.2: Soya Yağı Yağ Asidi Bileşimi

Yağ Asitleri	% Değerleri	% Değerleri (O’Brien, 2004)
Palmitik Asit (C16:0)	10,76	8,8 – 13,3
Palmitoleik Asit (C16:1n-7)	0,16	< 0,2
Stearik Asit (C18:0)	4,58	2,4 – 5,4
Oleik Asit (C18:1n-9)	20,64	17,7 – 26,1
Linoleik Asit (C18:2n-6)	51,09	49,8 – 57,1
Linolenik Asit (C18:3n-3)	7,06	5,5 – 9,5

4.2. Metillendirme Yöntemleri

Yapılan çalışmalarda metillendirme işlemi üçü sodyum metoksit ve biri asitle olmak üzere toplam dört farklı yöntemle gerçekleştirilmiştir. Metillendirme yöntemleri karşılaştırıldığında sodyum metoksit kullanılarak yağ asitlerinin metillendirilmesi yöntemleri oldukça yeni ve hızlı yöntemler iken asitle metillendirme işlemi daha zaman alan bir yöntemdir. Sodyum metoksit ile metillendirmede kullanılan yöntemlerde metillendirme işlemi tam olarak gerçekleştirilememiş ve elde edilen kromatogram sonuçlarında herhangi bir pik gözlenmemiştir. Öte yandan asitle metillendirme işleminde oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmaların asitle metillendirme yöntemi kullanılarak devam edilmesi kararlaştırılmıştır.

4.3. Bakteri Suşlarının Belirlenmesi

CLA sentezi için analiz edilen *Lactobacillus* kültürleri ile tarama sonuçları Tablo 4.3’de görülmektedir. Konjuge linoleik asitlerinin alıkonma zamanlarının belirlenmesi amacıyla metillendirilmiş CLA standardı da gaz kromatografisinde incelenmiş ve kromatogram ve alıkonma süreleri Şekil B.3 ve Tablo B.3’de verilmiştir.

Tablo 4.3: Kullanılan Bakteriler ve CLA, EPA ve DHA Üretimi

Bakteri Adı	CLA (%)	EPA (%)	DHA (%)
<i>Lactobacillus</i> ssp. L1	0,29	0,94	0,35
<i>Lactobacillus</i> ssp. L2	0,18	1,12	-
<i>Lactobacillus</i> ssp. L3	0,28	1,08	-
<i>Lactobacillus</i> ssp. L4	0,26	0,99	-
<i>Lactobacillus</i> ssp. L5	0,26	0,87	0,12
<i>Lactobacillus</i> ssp. L6	0,17	1,11	-
<i>Lactobacillus</i> ssp. L7	0,21	0,97	0,08
<i>Lactobacillus</i> ssp. L8	0,20	0,92	0,08
<i>Lactobacillus</i> ssp. L9	0,23	0,78	0,1
<i>Lactobacillus</i> ssp. L10	0,21	0,9	0,07

Tarama çalışmasında CLA üretimi, Lin ve diğ. (1999) çalışmasında belirtilen sıra takip edilerek yapılmıştır. Öncelikle bakteriler metotta belirtildiği gibi aktive edilmişlerdir. Aktif olan bakteriler daha sonra yağsız süt tozu içeren MRS Broth'a alınmış ve gelişimlerini tamamladıktan sonra tekrar başka bir ortama aktarılmıştır. Lin ve diğ. (1999) ilave edilen yağ miktarı olarak 20 ile 100 mg linoleik asit uygun

görmüşlerdir. Belirtilen sınırlar içinde ayçiçek yağı yağ asitleri miktarı 150 µL olarak ayarlanmıştır.

Tablo 4.3’de görüldüğü gibi genel olarak bakterilerin ortalaması % 0,23’tür. *Lactobacillus* bakteri suşlarından en iyi CLA dönüşümünü yapan kültürler sırasıyla L1, L5 ve L9 olarak belirlenmiştir. İleri çalışmalara bu kültürlerle devam edilmiştir. Tablo B.4 ve Şekil B.4’te *Lactobacillus* L5’in kromatogram sonucu ve ürettiği yağ asidi bileşimleri verilmiştir.

Kromatogramlar incelendiğinde göze çarpan bir başka bulgu da CLA üretimi yanında şaşırtıcı olarak ω-3 yağ asitleri olan EPA (Eicosapentaenoic Acid) ve DHA’nın (Docosahexaenoic Acid) üretiminin de gerçekleşmiş olmasıdır. Yapılan tarama sonucuna göre sentezlenen EPA ve DHA sonuçları Tablo 4.3’de verilmiştir. Sijtsma ve Swaaf (2004) yaptıkları literatür çalışmasında genel olarak DHA’nın biyoteknolojik olarak üretiminin deniz alg ve mantarları kullanılarak yapıldığını belirtmişlerdir. Çalışmada bakterilerin çoklu doymamış yağ asidi üretimi için uygun olmadıkları yapılarında yüksek miktarda triaçilgliserol ihtiva etmediklerini açıklamıştır.

4.4. Yağ Asidi Miktarının CLA Üretimine Etkisi

Bundan sonra yapılacak çalışmalarda CLA üretimi için koşulların optimize edilmesi amaçlanmış ve yağ asidi miktarı üzerinde çalışılmıştır.

Buraya kadar olan denemelerde 150 µL yağ asidi ilavesi kullanılmıştır. Ancak yapılan literatür taramasında Lin ve diğ. (1999) çalışmasında iki farklı miktar ile çalıştığı belirlenmiştir. Çalışmalarında 20 ve 100 mg saf linoleik asit ilavesini tercih etmişlerdir. Yağ asitlerinin inhibe edici etkisinin süt proteinleri ile nötralize edildiği, süt proteinlerinden oluşan alkil radikallerin CLA oksidasyonunu önlediği; ancak linoleik asit miktarındaki aşırı artışın CLA üretimi üzerinde inhibe etkisi olduğunu belirtmişlerdir.

Deney planına göre üç farklı yağ asidi miktarı belirlenmiştir. Bu miktarlar 100, 150 ve 200 µL’dir. Materyal ve Metotta belirtilen aktivasyon ve inokülasyon açıklamalarına sadık kalınarak deney gerçekleştirilmiştir. İki tekrarlı paralel çalışmalar sonucunda elde edilen ekstraktlar gaz kromatografisinde incelenmiştir. Alınan kromatografi sonuçları Tablo 4.4’te belirtilmiştir.

Tablo 4.4: Farklı Bakterilerin Farklı Yağ Asidi Miktarlarında CLA Üretimi (Yüzde Ortalamaları)

	100 µL	150 µL	200 µL
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,78	1,02	0,91
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,77	1,60	0,91
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	0,94	0,96	0,82

Tablo 4.4’te verilen ortalamalara bakılarak en iyi sonucun 150 µL ile elde edilmiştir. 150 µL yağ asidi ağırlık olarak 80 mg tekabül etmekte ve bunun 47,5128 mg linoleik asit (yaklaşık 48 mg linoleik asit) olmaktadır. Buna göre 80 mg yağ asidi kullanıldığında % 1,596 CLA yani 1,2768 mg CLA (yaklaşık 1,28 mg CLA) üretilmiştir. Lin ve diğ. (1999) yaptıkları çalışmada *Lactobacillus acidophilus* sonuçları ile kıyaslandığında 20 ve 100 mg saf linoleik asitle ile 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda 1,65 mg ve 1,33 mg CLA üretmişlerdir. Yine aynı çalışmada *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bakterisinin CLA sentez sonuçlarına bakıldığında 20 ve 100 mg saf linoleik asitle 24 saat sonrasında 1,3 ve 1,24 mg CLA üretimi gözlenmiştir. Yapılan çalışmada elde edilen 1,28 mg CLA sonucu referans alınan çalışma ile uygunluk göstermiştir. Sonuçlarda oluşan farklılık ise bakterilerin linoleik asit izomeraz aktivitelerinin farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Ando ve diğ. (2004) *Lb. plantarum* ile hint yağında yaptıkları çalışmada yıkanmış hücreler kullanmış ve böylece bakterinin direncini arttırmışlardır. 5 mg/mL hint yağından 2,7 mg/mL CLA üretmişlerdir. Yaptığımız çalışmada ise 4 mg/mL ayçiçek yağından 0,064 mg/mL CLA üretilmiştir. Sonuçlardaki büyük fark bakterinin yağ asidinin inhibe edici özelliğine karşı daha da dirençli olmasıyla açıklanmaktadır.

Değişen yağ asidi miktarının ω-3 yağ asitleri üzerine etkisi incelendiğinde yine en iyi sonucun 150 µL ile alındığı gözlenmiştir. Bakteri türü ve yağ asidi miktarına bağlı olarak ω-3 yağ asidi üretim değerleri Tablo 4.5’te verilmiştir. Ayrıca *Lactobacillus* ssp L1’in 100 µL yağ asidi ilavesiyle ürettiği CLA miktarı kromatogram sonucu ve yağ asidi kompozisyonu şeklinde Şekil B.5 ve Tablo B.5’te açıklanmıştır.

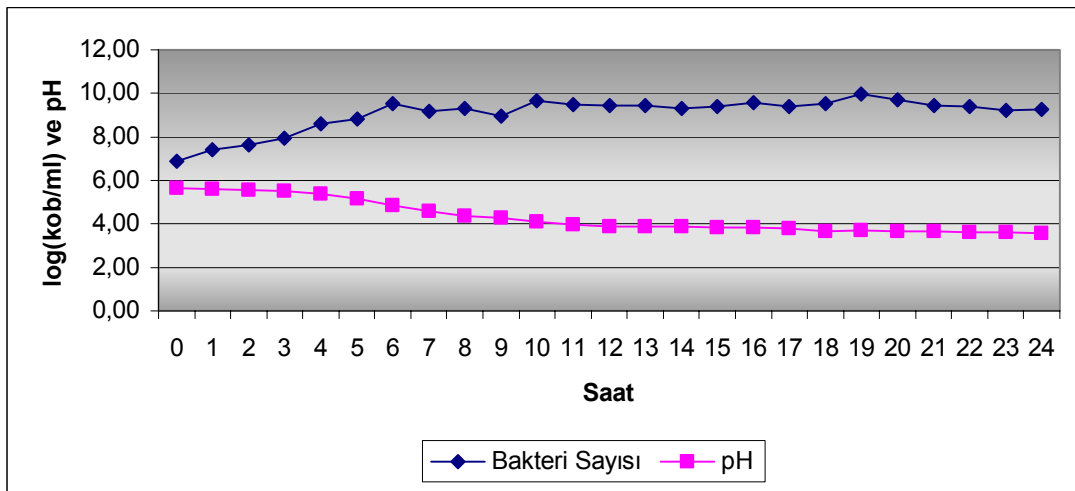
Tablo 4.5: Farklı Bakterilerin Farklı Yağ Asidi Miktarlarında ω -3 Yağ Asitleri Üretimi (Yüzde Değerler)

	100 μ L	150 μ L	200 μ L
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,79	1,02	0,92
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,98	1,60	1,02
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1,28	0,96	0,79

Alınan kromatografi sonuçları ile yapılan Tablo A.1'deki istatistiksel analizde yağ asidi miktarı değişimin CLA üretimi üzerinde önemli sayılabilecek bir etkisi yoktur ($p>0,05$). Ancak deney devamlılığının sağlanması amacıyla CLA üretim yüzdeleri göz önünde tutularak *Lactobacillus plantarum* ile deneysel çalışmalara devam edilmiştir.

4.5. *Lactobacillus plantarum* L5'in Gelişim Eğrisi

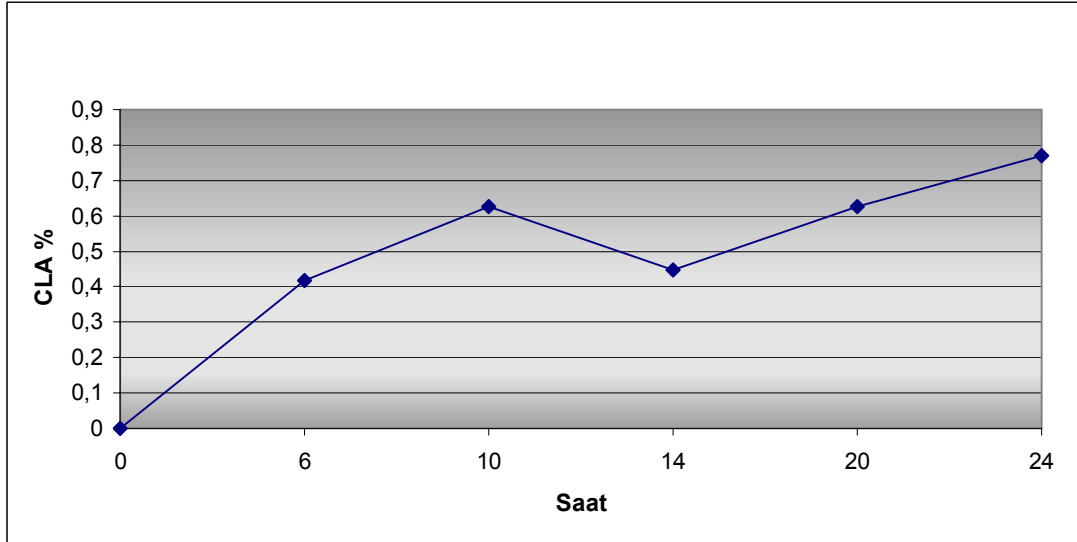
Lactobacillus plantarum ile yapılan 24 saatlik deney sonucunda bakterinin gelişim eğrisi çizilmiş ve inkübasyon sürecinde pH'da meydana gelen değişiklikler gözlemlenmiştir. Sonuç Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1: *Lactobacillus plantarum*'un Gelişim Eğrisi

Şekilde *Lb. plantarum*'un gelişiminin düzenli bir gelişim eğrisi şeklinde olmadığı görülmektedir. Ancak pH değişimi daha düzenli bir şekilde devam etmiştir. pH

eğrisi incelendiğinde bakteri belirli saatlerde belirgin değişimler sergilemiştir. Bu saatler 6, 10, 14 ve 20 olarak belirlenmiş ve bu saatlerdeki CLA üretimi incelenmiştir. Belirlenen saatlerdeki CLA üretimi Şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.2: Belirli Saatlerdeki CLA Üretim Yüzdeleri

Şekil 4.2’de bakterinin CLA üretiminin ilk başta artış gösterdiği ancak zamanla azaldığı gözlenmiştir. Bu azalmanın ortam pH’sının düşmesi ve bakterilerin linoleik asit izomeraz enzim üretimini olumsuz etkilediği düşünülmektedir. 24 saatlik süre sonunda pH değeri 3,5’a kadar düşmüştür. CLA miktarını arttırmak amacıyla pH müdahale etme kararı alınmıştır.

4.6. pH Değişiminin CLA Üretimine Etkisi

pH’nın CLA üretimine etkisinin araştırılması için yapılan ilk çalışmada başlangıçtaki pH değeri 5,5 olan MRS Broth’un pH değerleri sırasıyla pH 7,0, 8,0 ve 9,0 ayarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.6’da verilmiştir.

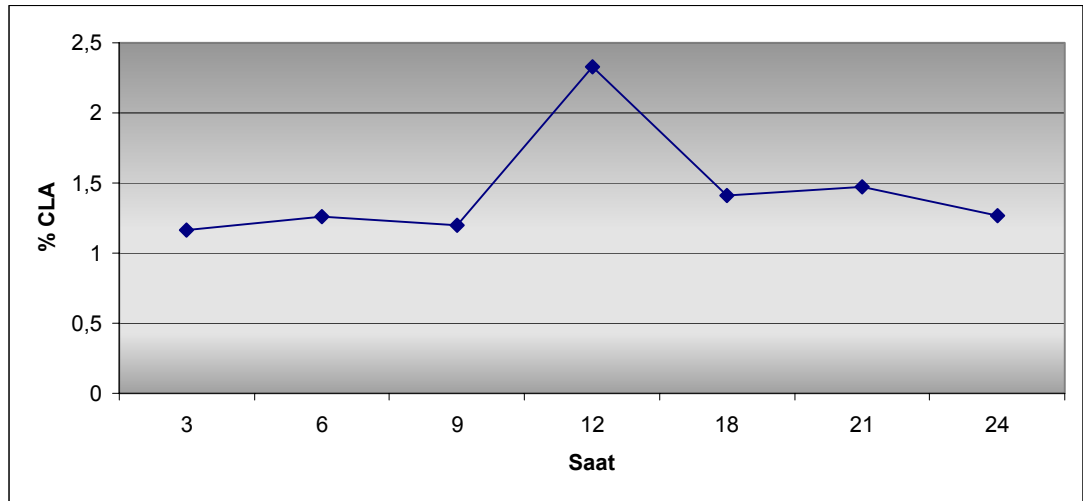
Tablo 4.6: Başlangıç pH Değerinin CLA Üretimine Etkisi

	I. DENEME		II. DENEME	
	I. Paralel	II. Paralel	I. Paralel	II. Paralel
pH=5,5	0,80	0,75	0,68	0,56
pH=7,0	1,11	-	-	0,85
pH=8,0	-(*)	-	-	-
pH=9,0	-	-	-	-

-(^{*}): Tespit Edilemedi.

pH=5,5 MRS Brothun müdahale edilmemiş başlangıç pH olmakta, diğerleri ise müdahale edilerek ayarlanan pH değerlerini ifade etmektedir. Tablo 4.6'ye göre en iyi sonuçlar başlangıç pH'sına müdahale edilmeksizin alınmıştır. Ancak Lee ve diğ. (2003) *Lb. reuteri* ile yaptıkları çalışmada immobilize edilmiş hücreler ile başlangıç pH'sını 9,0 ayarlayarak CLA miktarını arttırmışlardır. Yaptıkları çalışmada yıkanmış hücre ile immobilize hücreleri karşılaştıran Lee ve diğ., immobilizasyon ile hücrelerin direncini daha da arttırdıklarını belirlemişlerdir. Sonuçlara bakıldığında yıkanmış hücre ile en yüksek pH 9,5 iken, immobilize hücre ile bu sayıyı 10,5 olmuştur. Ayrıca immobilizasyon ile CLA üretimi, yıkanmış hücre ile CLA üretimine nazaran 5,5 kat artmıştır. İmmobilizasyonun avantajları arasında yer alan tekrar kullanım özelliği de CLA üretim miktarını olumlu etkilemiştir.

Tablo 4.6'deki sonuçlarla yapılan istatistiksel analiz sonuçları Tablo A.2'de verilmiştir. Sonuçlara göre pH 5,5 diğer pH değerlerinin CLA üretimi üzerinde önemli ölçüde farklılıklara sebep olmaktadır ($p<0,05$). Tukey Testi ile yapılan Tablo A.3'deki analizde başlangıç pH'sının 5,5 değerinde olması önemlidir. Ancak başlangıçta MRS Broth'a herhangi bir müdahale edilmediği halde pH zaten 5,5 olduğundan başlangıç pH'sına müdahale etmek yerine inkübasyon süresi boyunca 3'er saatlik süre ile pH'a müdahale etme kararı alınmıştır. Buna göre her 3 saatte bir pH 5,5 – 6,0 değerine ayarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.3: pH Müdahalesinin CLA Üretimine Etkisi

Sonuçlara göre 12. saatte yapılan pH müdahalesi ile CLA üretimi % 2,33 olmuştur. Tablo A.4.'de istatistiksel olarak pH müdahalesinin CLA üretimi üzerinden önemli bir etkisi olmadığı görülmektedir ($p>0,05$). Ancak elde edilen sonuçlara göre pH

müdahalesi ile daha önceki CLA üretimi ortalama % 0,8'ten, % 2,33 değerine çıktığı için oldukça önemli bir sonuç olarak düşünülmektedir.

4.7. Farklı Yağ Asidi Kompozisyonlarının CLA Üretimine Etkisi

CLA üretiminde uygun bakteri, yağ asidi miktarı ve pH belirlendikten sonra çalışmalara yağ asidi bileşimlerinin CLA üretimine olan etkilerinin araştırılması şeklinde devam edilmiştir. Farklı yağ asidi kompozisyonları içeren MRS besi ortamından inkübasyon sonrası ekstrakte edilen CLA miktarlarının ortalama değerleri Tablo 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.7: Farklı Yağ Asitleri Kompozisyonun CLA Sentezine Etkisi

Saf Linoleik Asit	Soya Yağı	Ayçiçek Yağı
% 1,20	% 1,44	% 1,52

Substrat olarak kullanılan ayçiçek ve soya yağı yağ asitlerinin CLA üretiminde benzer etkiyi gösterdiği gözlenmiştir. Kültür ortamına saf linoleik asit ilavesinin bir avantaj sağlamadığı gözlenmiştir. Buradaki farkın ayçiçek ve soya yağı hidrolizatlarında linoleik aside ek olarak palmitik, oleik linolenik ve araşidonik gibi yağ asitlerinin bulunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Patarnen ve diğ. (2001), yaptıkları çalışmada besiyeri ortamında bulunan Tween 20, 40, 60 ve 80'nin *Lactobacillus delbrueckii* bakterisinin gelişimini olumlu etkilediğini rapor etmişlerdir. Söz konusu çalışmada farklı yağ asidi kompozisyonu içeren Tween 20, 40, 60 ve 80 bileşiklerinin her birinin bakteri gelişimini arttırdığı belirlenmiştir. Aynı şekilde Tablo 4.7'deki sonuçlar, substratlardaki farklı yağ asitlerinin gerek bakteri gelişimini gerekse CLA sentezini arttırdığını göstermektedir.

5. SONUÇ

Bu çalışmada ayçiçek yağı başta olmak üzere soya yağı ve saf linoleik asidin laktik asit bakterilerinin CLA üretimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Çalışma kapsamın on farklı *Lactobacillus* ssp. ile tarama yapılmış ve sonuçlara göre bakteri sayısı üçe indirilmiştir. Üç bakteri ile hidrolize edilmiş ayçiçek yağının optimum miktarının belirlenmesi için 100, 150 ve 200 µL olacak şekilde üç farklı düzeyde çalışma yapılmıştır. Kromatogram sonuçları dikkate alınarak yağ asitleri miktarı 150 µL olarak belirlenmiştir.

Kromatografik analizde metillendirme yöntemlerinin karşılaştırılması da gerçekleştirilmiştir. Son yıllarda dikkat çeken metillendirme ajanı sodyum metoksit kullanılarak üç yöntem ve asitle metillendirme yöntemi karşılaştırılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde sodyum metoksit ile yapılan üç farklı metillendirmede metillendirme işleminin verimli olmadığı gözlenmiştir. Bu üç yöntemde de ısıtma işlemi veya yüksek asitli ortam uygulanmamıştır. Isıtma işlemi kullanımı veya ortamın asitliğinin artırılması yöntemin etkin hale gelmesini sağlayabilmektedir.

Bakterilerin CLA üretim kapasitelerinin incelendiği çalışmada üç bakteri içinde en yüksek verim *Lactobacillus plantarum* L5 ile alınmıştır. Bu bakteri ile özellikle 150 µL’de en iyi CLA oluşumu gözlenmiştir. Yapılan çalışmada 80 mg hidrolize ayçiçek yağı ilavesiyle 1,28 mg CLA oluştuğu belirlenmiştir. CLA sentezini arttırmak için ortamın başlangıç pH’sı alkali değerlere getirilmiş ancak bu uygulamanın verimi olumsuz etkilediği saptanmıştır. İlerleyen çalışmalarda inkübasyon süresi içinde besi ortamının pH’sına müdahale edilmiştir. Bu kapsamda inkübasyonun on ikinci saatinde pH değeri 5,5 – 6,0 ayarlanmıştır. Yapılan pH müdahalesi ile elde edilen CLA değerinde artış olduğu gözlenmiştir.

Yağ asidi kompozisyonunun etkisi incelendiğinde substrat olarak kullanılan ayçiçek ve soya yağı yağ asitlerinin CLA üretiminde benzer etkiyi gösterdiği, kültür ortamına saf linoleik asit ilavesinin bir avantaj sağlamadığı gözlenmiştir. Buradaki farkın ayçiçek ve soya yağı hidrolizatlarında linoleik aside ek olarak palmitik, oleik

linolenik ve araşidonik gibi yağ asitlerinin bulunmasından kaynaklandığı düşünölmektedir.

Yapılan çalışmalarda konjuge linoleik asit yanında ω -3 asitleri olan EPA ve DHA üretildiği de gözlenmiştir. Özellikle alglerden elde edilen bu yağ asitlerinin laktik asit bakterilerince üretilmesi üzerine yapılan çalışmalar sınırlı seviyededir. Bu alışma ile EPA ve DHA'nın laktik asit bakterileri tarafından üretiminin mümkün olabileceğı kanıtlanmıştır.

Mikroorganizmalarla yapılan çalışmalarda koşulları sabitleyerek çeşitli metabolitlerin sentezini arttırmak mümkündür. Bu amaçla çalışmaların reaktör gibi ortam koşullarının stabil tutulabildiğı koşullarda daha yüksek verim alınması olasıdır. Ayrıca konu ile ilgili yapılan çalışmalarda immobilizasyon yönteminin de mikrobiyal metabolit üretiminde daha iyi sonuç verdiği belirtilmektedir.

KAYNAKLAR

Ando, A., Ogawa, J., Kishino, S. ve Shimizu, S., 2004. Conjugated linoleic acid production from castor oil by *Lactobacillus plantarum* JCM 1551. *Enzyme and Microbial Technology*, **35**, 40-45.

Axelsson, L., 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology, in *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects*, Eds. Salminen, S., Wright, A. ve Ouwehand, A., Marcel Dekker, Inc., New York.

Aydın, R., 2005. Conjugated linoleic acid: chemical structure, sources and biological properties. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **29**, 189-195.

Banks, J. M. ve Williams A. G., 2004. Cheddar cheese, in *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology*, Eds. Hui, Y. H., Goddik, L. M., Hansen, Å. S., Josephen, J., Nip, W. K., Stanfield, P.S. ve Toldrá, F., Marcel Dekker, Inc., New York.

Bhattacharya, A., Banu, J., Rahman, M., Causey, J. ve Fernandes, G., 2006. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **17**, 789-810.

Calder, P.C., 2004. Dietary lipids an immune function, in *Functional Foods, Ageing and Degenerative Disease*, Eds. Remacle, C ve Reusens, B., Woodhead Publishing, Cambridge.

Chin, S. F., Liu, W. M. N., Storkson, J. M., Ha, Y. L. ve Pariza, M. W., 1992. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *Journal of Food Composition and Analysis*, **5**, 185-197.

Cook, M. E. ve Pariza, M., 1998. The role of conjugated linoleic acid (CLA) in health. *International Dairy Journal*, **8**, 459-462.

Coşkun T., 2005. Fonksiyonel besinlerin sağlığımız üzerine etkileri, *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, **48**, 69-84.

De Vuyst, L., Avonts, L. ve Makras, L., 2004. Probiotics, prebiotics and gut health, in *Functional Foods, Ageing and Degenerative Disease*, Eds. Remacle, C ve Reusens, B., Woodhead Publishing, Cambridge.

Dobson, G., 2002. Analysis of fatty acids in functional foods with emphasis on ω 3 fatty acids and conjugated linoleic acid. *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals*. Ed. Hurst, W. J., CRC Press, Washington DC.

Fondén, R., Saarela, M., Mättö, J. ve Sandholm, T. M., 2003. Lactic acid bacteria in functional dairy products, in *Functional Dairy Products*, Eds. Sandholm, T. M. ve Saarela, M., Woodhead Publishing, Cambridge.

- Fritsche, J., Rickert, R., Steinhart, H., Yurawecz, M. P., Mossoba, M. M., Sehat, N., Roach, J. A. G., Kramer, J. K. G. ve Ku, Y.,** 1999. Conjugated linoleic acid (CLA) isomers: formation, analysis, amounts in food, and dietary intake. *Fett/ Lipid*, **101**, 8, 272-276.
- Gill, C. ve Rowland, I.,** 2003. The health benefits of functional dairy products, in *Functional Dairy Products*, Eds. Sandholm, T. M. ve Saarela, M., Woodhead Publishing, Cambridge.
- Givens, D. I. ve Shingfield, K. J.,** 2006. Optimising dairy milk fatty acid composition, in *Improving the Fat Content of Foods*, Eds. Williams, C. ve Buttriss, J., Woodhead Publishing, Cambridge.
- Gnädig, S., Xue, Y., Berdau, O., Chardigny, J. M. ve Sebedio, J. L.,** 2003. Conjugated linoleic acid (CLA) as a functional ingredient, in *Functional Dairy Products*, Eds. Sandholm, T. M. ve Saarela, M., Woodhead Publishing, Cambridge.
- Gümüşkesen, A. S.,** 1999. *Bitkisel Yağ Teknolojisi*, Asya Tıp Yayıncılık Ltd. Şti., İzmir, pp. 157-172.
- Ha, Y., L., Grimm, N. K. ve Pariza, M. W.,** 1989, Newly recognized anticarcinogenic fatty acids: identification and quantification in natural and processed cheeses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **37**, 75-81.
- Hatırlı, S. A., Demircan, V. ve Aktaş, A. R.,** 2002. Ayçiçek ve soya yağı ithalat talebinin analizi. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, **15** (2), 71-79.
- Holzapfel, W.,** 2006. Introduction to prebiotics and probiotics, in *Probiotics in Food Safety and Human Health*, Eds. Göktepe, İ., Junega, V. K. Ve Ahmedna, M., CRC Press, New York.
- Hunter, J. E.,** 2000. Safety and health effects of isomeric fatty acids. In *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*, 2nd ed., Ed. Chow, C. K, Marcel Dekker, Inc, New York.
- Ip, C., Chin, S. F., Scimeca, J. A., and Pariza, M.W.,** 1991. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid, *Cancer Research*, **51**, 6118-6124.
- Jenning, B. ve Akoh, C. C.,** 1999. Triacylglycerol of high eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid contents to produce structured lipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **76**, 1133-1137.
- Jiang, J., Björck, L. ve Fondén, R.,** 1998. Production of conjugated linoleic acid by starter cultures. *Journal of Applied Microbiology*, **85**, 95-102.
- Karaali,** 1985. The effects of refining on the chemical composition of Turkish sunflower seed oil. *Fette Seifen Anstrichmittel*, **87** (3), 112-117
- Kishino, S., Ogawa, J., Ando, A., Omura, Y. ve Shimizu, S.,** 2003. Ricinoleic acid and castor oil as substrate for conjugated linoleic acid production by washed cells of *Lactobacillus plantarum*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, **66**, 2283-2286.
- Kochhar, S. P.,** 2001. The composition of frying oil, in *Frying Improving Quality*, Ed. Rossel, J. B., Woodhead Publishing Ltd., Cambridge.
- Koning, S., Meer, B., Alkema, G., Janssen, H. G. ve Brinkman, U. A. Th.,** 2001. Automated determination of fatty acid methyl ester and *cis* / *trans* methyl ester composition of fast and oils. *Journal of Chromatography A*, **922**, 391-397.

Kritchevsky, D., 2004. Conjugated linoleic acid, in *Handbook of Functional Dairy Products*, Eds. Shortt, C. And O'Brien, J., CRC Press, New York.

Lee, K. N., Kritchevsky, D., ve Pariza, M. W., 1994. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits, *Atherosclerosis*, **108**, 19-25.

Lee, S. O., Hong, G. W. ve Oh, D. K., 2003. Bioconversion of linoleic acid into conjugated linoleic acid by immobilized *Lactobacillus reuteri*. *Biotechnology Progress*, **19**, 1081-1084.

Levin, R. E., 2006. Food microbiology, in *Food Biotechnology Second Edition*, Eds. Shetty, K., Paliyath, G., Pometto, A. ve Levin, R. E., CRC Press, New York.

Li, K. Y., 2004. Fermentation: Principles and Microorganisms, in *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology*, Eds. Hui, Y. H., Goddik, L. M., Hansen, Å. S., Josephen, J., Nip, W. K., Stanfield, P.S. ve Toldrá, F., Marcel Dekker, Inc., New York.

Lin, T. Y., Hung, T. H. ve Cheng, T. S. J., 2005. Conjugated linoleic acid production by immobilized cells of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus*. *Food Chemistry*, **92**, 23-28.

Lin, T. Y., Lin, C. W. ve Lee, C. H., 1999. Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and added linoleic acid. *Food Chemistry*, **67**, 1-5.

Lin, T. Y., Lin, C. W. ve Wang, Y. J., 2003. Production of conjugated linoleic acid by enzyme extract of *Lactobacillus acidophilus* CCRC 14079. *Food Chemistry*, **83**, 27-31.

Lin, T., 2006. Conjugated linoleic acid production by cells and enzyme extract of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* with addition of different fatty acids. *Food Chemistry*, **94**, 437-441.

Lipkin, M. ve Wargovich, M. J., 2000. Dairy foods and colon cancer, in *Handbook of Foods and Nutrition Second Edition*, Eds. Miller, G. D., Larvis, J. K. and McBean, L. D., CRC Press, New York.

Lovegrove, J. ve Jackson, K., 2003. Coronary heart disease, in *Functional Dairy Products*, Eds. Sandholm, T. M. ve Saarela, M., Woodhead Publishing, Cambridge.

Mäkinen, A. M. ve Bigret, M., 2004. Industrial use and production of lactic acid bacteria, in *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects*, Eds. Salminen, S., Wright, A. ve Ouwehand, A., Marcel Dekker, Inc., New York.

Matsuzaki, T., 2003. Health properties of milk fermented with *Lactobacillus casei* strain shirota, in *Handbook of Fermented Functional Foods*, pp. 145-177, Ed. Farnworth, E. R., CRC Press, New York.

Mikelsaar, M., Mändar, R., Sepp, E. ve Annuk, H., 2004. Human lactic acid flora and its role in the welfare of the host, in *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects*, Eds. Salminen, S., Wright, A. ve Ouwehand, A., Marcel Dekker, Inc., New York.

Molin, G., 2003. The role of *Lactobacillus plantarum* in foods and in human health, in *Handbook of Fermented Functional Foods*, pp. 305-343, Ed. Farnworth, E. R., CRC Press.

Naidu, A. S. ve Clemens, R.A., 2000. Probiotics, in *Natural Food Antimicrobial Systems*, Ed. Naidu, A. S., CRC Press, New York.

O'Brien, R. D., 2004. Raw material, in *Fats and Oil Formulating and Processing for Applications Second Edition*, CRC Press, New York.

Özsan, E., 1999. *Diyetsel konjuge linoleik asidin erkek broillerde aşılama sonrası oluşan katabolik etkilerinin azaltılması ve bazı organ ağırlıkları üzerine etkisi*. MSc. Thesis, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi.

Partanen, L., Marttinen, N ve Alatossava, T., 2001. Fats and fatty acids as growth factors for *Lactobacillus delbrueckii*. *Systematic and Applied Microbiology*, **24**, 500-506.

Precht, D. ve Molkentin, J., 1998. Comparison of gas chromatographic methods for analysis of butyric acid in milk and fats containing milk fat. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A*, **206**, 213-216.

Precht, D. ve Molkentin, J., 2000. Recent trends in the fatty acid composition of German sunflower margarines, shortenings and cooking fats with emphasis on individual C16:1, C18:1, C18:2, C18:3 and C20:1 *trans* isomers. *Nahrung*, **44**, 4, 222-228.

Schillinger, U., Holzapfel, W., H., Björkroth, K. J., 2006. Lactic acid bacteria, in *Food Spoilage Microorganisms*, Ed. Blackburn, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge.

Senanayake, S. P. J. ve Shahidi, F., 1999. Enzymatic incorporation of docosahexaenoic acid into borage oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **76**, 1009-1015.

Siems, W. G., Grune, T., Hasselwander, O. ve Krämer, K., 2001. Conjugated linoleic acid, in *Nutraceuticals in Health and Disease Prevention*, Ed. Krämer, K., Hoppe, P. P. ve Packer, L., Marcel Dekker, Inc., New York.

Sijtsma, L. ve de Swaaf, M. E., 2004. Biotechnological production and application of ω -3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **64**, 146-153.

Stiles, M.E. ve Holzapfel, W. H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy, *International Journal of Food Microbiology*, **36**, 1-29.

Sybesma, W. F. ve Hugenholtz, J., 2004. Food fermentation by lactic acid bacteria for the prevention of cardiovascular disease, in *Functional Foods, Cardiovascular Disease and Diabets*, Ed. Arnoldi, A., Woodhead Publishing, Cambridge.

Turantaş, F., 1999. Fermente gıdalar, in *Gıda Mikrobiyolojisi*, pp. 447-473, Eds. Ünlütürk, A. ve Turantaş, F., Mengi Tan Basımevi, İzmir.

Ünlütürk, A. ve Turantaş, F., 1999. Mikroorganizma gıda ilişkileri, in *Gıda Mikrobiyolojisi*, pp. 4, Eds. Ünlütürk, A. ve Turantaş, F., Mengi Tan Basımevi, İzmir.

Ünlütürk, A., Karapınar, M. ve Turantaş, F., 1999. Gıdalarda önemli mikroorganizmalar, in *Gıda Mikrobiyolojisi*, pp. 12-42, Eds. Ünlütürk, A. ve Turantaş, F., Mengi Tan Basımevi, İzmir.

Watkins, B. A. ve Li, Y., 2001. Conjugated linoleic acid: the present state of knowledge, in *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*. Ed. Wildman, R. E. C., CRC Press, New York.

Watkins, B. A. ve Li, Y., 2002. Conjugated linoleic acids: nutrition and biology, in *Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology Second Edition*, Eds. Akoh, C.C. ve Min, D. B., Marcel Dekker, Inc., New York.

Whigham, L. D, Cook, M. E. ve Atkinson, R. L., 2000. Conjugated linoleic acid: implications for human health. *Pharmacological Research*, **42**, 6.

Yaqoob, P. Ve Tricon, S., 2006. Conjugated linoleic acids (CLAs) and health, in *Improving the Fat Content of Foods*, Eds. Williams, C. ve Buttriss, J., Woodhead Publishing, Cambridge.

EK A. İSTATİSTİKSEL HESAPLAMA TABLOLARI

Tablo A.1: Farklı Bakteri Suşlarının ve Farklı Yağ Asidi Miktarlarının CLA Üretimi Üzerinde Etkilerinin “ANOVA” İstatistiksel Yöntemiyle Değerlendirilme Sonuçları

VK	S.D.	KT	KO	F	P
Bakteri	2	0,27157	0,13579	3,12	0,094
Miktar	2	0,34041	0,17021	3,91	0,060
Bakteri*Miktar	4	0,48087	0,12022	2,76	0,095
Hata	9	0,39199	0,04355		
Toplam	17	1,48484			

0,05 olasılık düzeyinde farklı bakteriler ve farklı yağ asidi miktarları CLA üretimi üzerinde önemli bir fark oluşturmamaktadır.

Tablo A.2: Farklı Başlangıç pH’larının CLA Üretimi Üzerine Etkilerinin “ANOVA” İstatistiksel Yöntemiyle Değerlendirilme Sonuçları

VK	S.D.	KT	KO	F	P
pH	3	1,50299	0,50100	5,81	0,011
Hata	12	1,03451	0,08621		
Toplam	15	2,53750			

0,05 olasılık düzeyinde farklı başlangıç pH’larının CLA üretimi üzerinde önemli etkisi bulunmaktadır.

Tablo A.3: Tukey Testi ile Farklı Başlangıç pH’larının Karşılaştırılması

pH	N	Ortalama
5,5	3	0,69875 ± 0105979 a
7,1	3	0,49175 ± 0,577585 ab
8	3	0 b
9	3	0 b

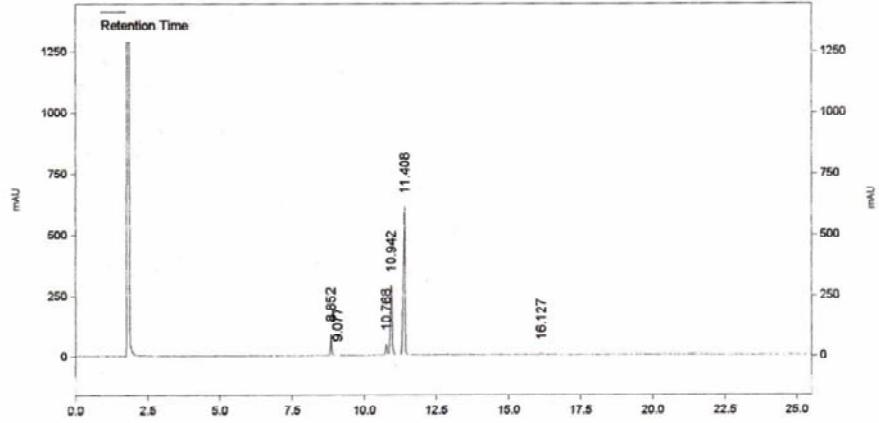
Önem Düzeyi: 0,05

Tablo A.4: pH Müdahalesinin CLA Üretimi Üzerine Etkilerinin “ANOVA” İstatistiksel Yöntemiyle Değerlendirilme Sonuçları

VK	S.D.	KT	KO	F	P
Süre	6	3,0193	0,5032	1,84	0,140
Hata	21	5,7488	0,2738		
Toplam	27				

0,05 olasılık düzeyinde pH müdahalesinin CLA üretimine önemli etkisi yoktur.

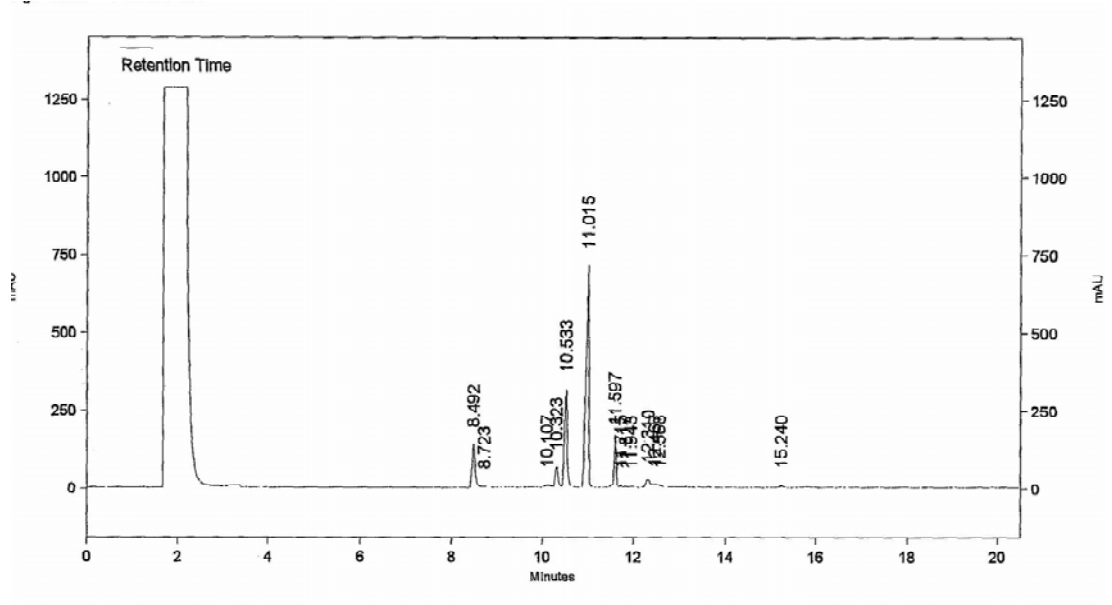
EK B. KROMATOĞRAFI SONUÇLARI



Şekil B.1: Ayçiçek Yağı Kromatogramı

Tablo B.1: Ayçiçek Yağı Yağ Asitleri

Yağ Asitleri	Alınma Süreleri	Yüzde Değerleri
Palmitik Asit (C16:0)	8.852	6,078
Palmitoleik Asit (C16:1n-7)	9.077	0,111
Stearik Asit (C18:0)	10.768	3,663
Oleik Asit (C18:1n-9)	10.942	30,253
Linoleik Asit (C18:2n-6)	11.408	59,391
Diğerleri	16,127	0,505

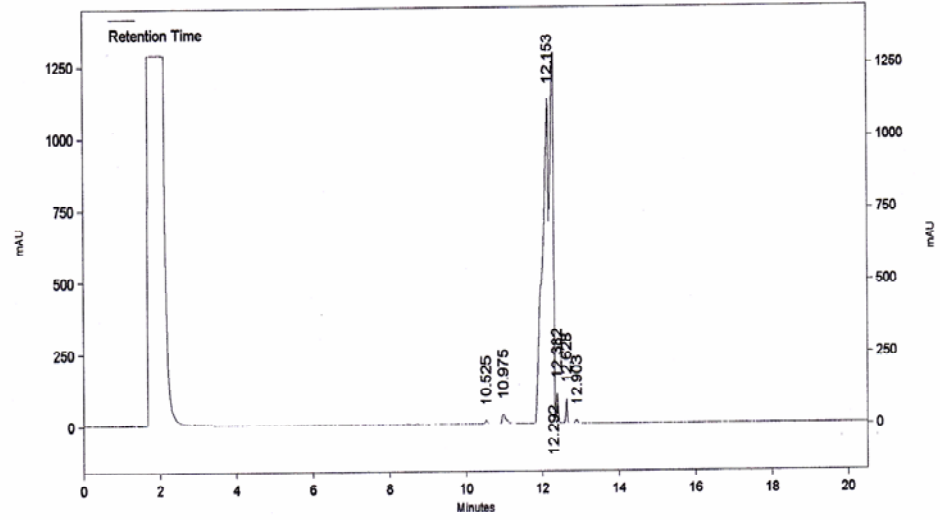


Şekil B.2: Soya Yağı Yağ Asitleri Kromatogramı

Tablo B.2: Soya Yağı Yağ Asitleri

Yağ Asitleri	Alınma Süreleri	Yüzde Değerleri
Palmitik Asit (C16:0)	8.492	10,76
Palmitoleik Asit (C16:1n-7)	8.723	0,16
Stearik Asit (C18:0)	10.323	4,58
Oleik Asit (C18:1n-9)	10.533	20,64
Linoleik Asit (C18:2n-6)	11.015	51,09
Linolenik Asit (C18:3n-3)	11.597	7,06
Diğerleri		5,71

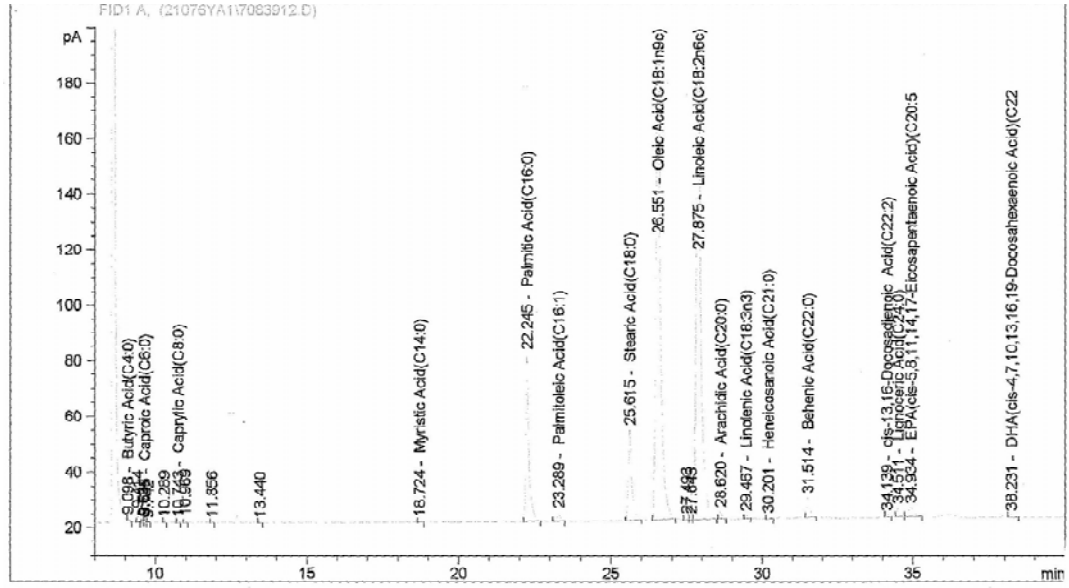
Injection Volume: 1ul



Şekil B.3: Konjuge Linoleik Asit Standardı

Tablo B.3: Konjuge Linoleik Asit Standardı

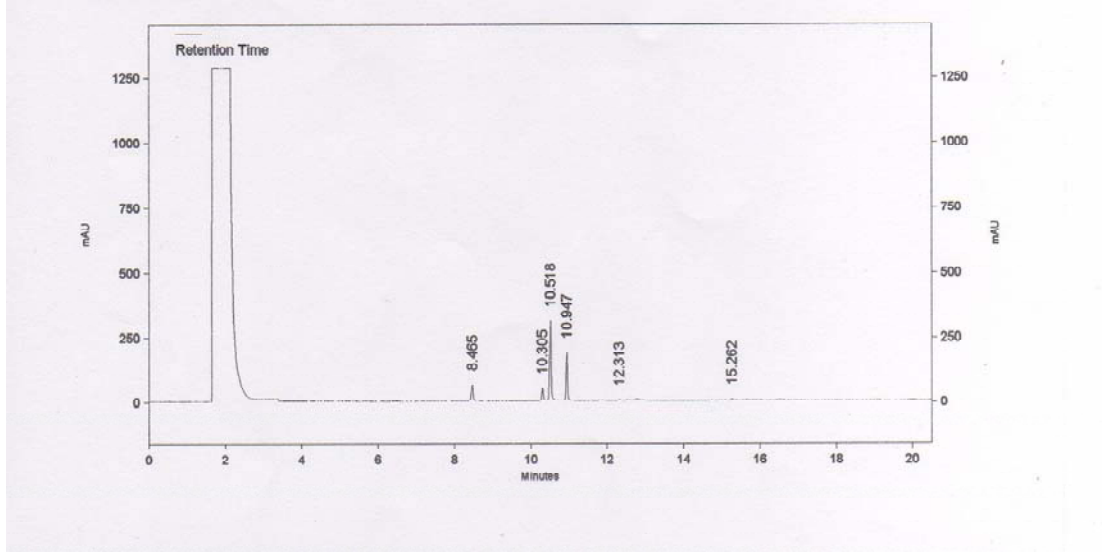
Yağ Asitleri	Alıkonma Süreleri	Yüzde Değerleri
Stearik Asit (C18:0)	10.525	0,193
Linoleik Asit (C18:2n-6)	10.975	1,053
CLA 1	12.153	56,821
CLA 2	12.292	39,001
CLA 3	12.382	1,613
CLA 4	12.628	1,094
CLA 5	12.903	0,224



Şekil B.4: *Lactobacillus* ssp. L5'in CLA Üretimi

Tablo B.4: *Lactobacillus* ssp. L5'in CLA Üretimi

Yağ Asitleri	Alınma Süreleri	Yüzde Değerleri
Palmitik Asit (C16:0)	22.245	8,56
Palmitoleik Asit (C16:1n-7)	23.289	0,44
Stearik Asit (C18:0)	25.615	5,36
Oleik Asit (C18:1n-9)	26.551	40,47
Linoleik Asit (C18:2n-6)	27,875	41,02
CLA		0,26
EPA	34.934	0,92
DHA	38.231	0,16
Diğerleri		2,9



Şekil B.5: *Lactobacillus* ssp. L1'in 100 µL Yağ Asidi İlavesiyle CLA Üretimi

Tablo B.5: *Lactobacillus* ssp. L1'in 100 µL Yağ Asidi İlavesiyle CLA Üretimi

Yağ Asitleri	Alınma Süreleri	Yüzde Değerleri
Palmitik Asit (C16:0)	8.465	12,266
Stearik Asit (C18:0)	10.518	49,695
Linoleik Asit (C18:2n-6)	10.947	28,109
CLA	12.313	0,505
Ω-3 Yağ Asitleri	15.262	1.092
Diğerleri		8,333

ÖZGEÇMİŞ

Seval BALLIKAYA, 1981 yılında Muş'ta doğdu. İlk ve orta okulu İstanbul'da tamamladı. Kadir Has Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi'nden mezun olduktan sonra 1999 yılında Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ne girmeye hak kazandı. Lisans eğitimini. 2003 yılında bitirdikten sonra İstanbul Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yüksek Lisans Programı'na kabul edildi. Halen aynı bölümde yüksek lisans eğitimini devam ettirmektedir