



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

***LACTOBACILLUS* SP. CİNSİNE AİT FARKLI PROBİYOTİK
TÜRLERİN OKSALAT (BÖBREK TAŞI) DEGREDASYONU VE
EKSOPOLİSAKKARİT ÜRETİMLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SERDAR AKÇA

DANIŞMAN

Doç. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ

AKSARAY, 2018

AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KABUL BELGESİ

Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 142330312 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi Serdar AKÇA, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “*LACTOBACILLUS* SP. CİNSİNE AİT FARKLI PROBİYOTİK TÜRLERİN OKSALAT (BÖBREK TAŞI) DEĞREDASYONU VE EKSPOLİSAKKARİT ÜRETİMLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN BELİRLENMESİ” başlıklı tezini, aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ

Aksaray Üniversitesi

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ

Gazi Üniversitesi

Jüri Üyeleri : Dr. Öğr. Üyesi Rukiye BORAN

Aksaray Üniversitesi

Tezin enstitüye teslim tarihi: 16.04.2018

Savunma tarihi: 11.05.2018

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ve bu eserleri her kullanışımında alıntı yaparak yararlandığımı belirtir; bunu şerefimle doğrularım.

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.

SERDAR AKÇA



TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi ve gerek deney aşamasında gerekse tez yazımı aşamasında bilgi, tecrübe ve anlayışlarıyla bana daima yol gösteren ve büyük katkıları olan danışman hocam Doç. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ' a ve yine önemli tecrübelerinden faydalandığım ikinci danışmanım Prof. Dr. Yavuz BEYATLI' ya 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 Şule SÖNMEZ, Orhan ÇETİN ve Orhan ORUÇ'a ve beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, desteklerini her zaman hissettiğim değerli eşim Ayşegül AKÇA ve kızım Mina AKÇA'ya şükranlarımı sunmayı bir borç bilirim.

Bu çalışma, Aksaray Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından 2015-011 kodlu ve '*LACTOBACILLUS* SP. CİNSİNE AİT PROBİYOTİK TÜRLERİ OKSALAT (BÖBREK TAŞI) DEGREASYONU VE EKSPOLİSAKKARİT ÜRETİMLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN BELİRLENMESİ' adlı araştırma projesi ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL BELGESİ.....	i
DOĞRULUK BEYANI.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ÖZET.....	vi
ABSTRACT	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER DİZİNİ.....	x
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Oksalik asitin yapısı ve gıdalarda bulunma durumu	3
2.2.Oksalatın Fazla Alınması Sonucu Oluşan Rahatsızlıklar.....	5
2.3. Böbrek Taşları (Nefrolitiazis) tedavi yöntemleri	6
2.3.1. Şok dalgaları ile taş kırma yöntemi (ESLW yöntemi)	6
2.3.2. Perkutan Nefrolithotomy (PNL)	7
2.3.3. Üretoroskopi (URS)	7
2.4.Oxalobacter formigenes ve oksalat degradasyon mekanizması.....	7
2.5. Probiyotikler.....	11
2.6. Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığı üzerine etkileri	12
2.7. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar	13
2.8. Laktik asit bakterilerinin genel özellikleri	15
2.8.1 Laktik asit bakterilerinin probiyotik özellikleri	17
2.8.2 Bağırsak sistemi rahatsızlıkları üzerindeki etkileri	18
2.8.3 Antimikrobiyal etki.....	18
2.8.4 Mide üzerindeki etkileri.....	18
2.8.5 İmmün sistemin düzenlenmesi ve Antikarsinojenik aktivite	19
2.8.6 Vitamin metabolizmasını artırıcı etkisi.....	19
2.8.7 Kolesterol düşürücü aktivite	20
2.8.8 Laktoz intoleransı.....	20
2.8.9 Hipertansiyon	21
2.8.10 Akut diyare (ishal).....	21
2.8.11. Antibiyotik kaynaklı diyare	21
2.9. Probiyotiklerin oksalat degradasyonundaki rolü.....	22
2.9.1 Probiyotiklerin oksalat degradasyonu üzerine yapılan çalışmalar	22
2.10. Eksopolisakkaritler (EPS)	25
3. MATERYAL VE METOT	27
3.1. Materyaller	27
3.1.1 Materyal örnekleri.....	27
3.1.2 Araştırmada kullanılan besiyerleri	28
3.1.3 Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları.....	30
3.1.4 Test bakterileri	30

	<u>sayfa</u>
3.2. Metot	31
3.2.1 Bakterilerin muhafazası	31
3.2.2 Laktobasillerin asit ve safraya toleransının belirlenmesi	31
3.2.3 Laktobasillerin eksopolisakkarit (EPS) üretimlerinin belirlenmesi	32
3.2.4 Protein Deneyi.....	34
3.2.5 Laktobasillerin sodyum oksalata dirençliliklerinin belirlenmesi	35
3.2.6 Laktobasillerin sodyum oksalatlı ortamdaki eksopolisakkarit (EPS) üretimlerinin belirlenmesi.....	35
3.2.7 Laktobasillerin 10mM sodyum oksalatı degradasyonunun belirlenmesi....	36
3.2.8 Laktobasillerin 20mM sodyum oksalatı degradasyonunun belirlenmesi....	40
3.2.9 İstatistiksel analizler.....	40
4.DENEYSEL BULGULAR	41
4.1. Laktobasillerin Asit ve Safraya Toleransları	41
4.2. Laktobasillerin Eksopolisakkarit (EPS) Üretimleri	46
4.3. Laktobasillerin Sodyum Oksalata Dirençlilikleri.....	49
4.4. Laktobasillerin Sodyum Oksalatlı Ortamdaki EPS Üretimleri	54
4.5. Laktobasillerin 10 mM Sodyum Oksalatı Degradasyon Sonuçları	58
4.6. Laktobasillerin 20 mM Sodyum Oksalatı Degradasyon Sonuçları.....	61
5. TARTIŞMA	65
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	74
KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ.....	83

ÖZET

LACTOBACILLUS SP. CİNSİNE AİT FARKLI PROBİYOTİK TÜRLERİN OKSALAT (BÖBREK TAŞI) DEGRADASYONU VE EKSOPLİSAKKARİT ÜRETİMLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN BELİRLENMESİ

Bu çalışmada, Türkiye'nin çeşitli yöresel peynirlerinden izole edilerek tanımlanan *Lactobacillus rhamnosus* (8), *Lactobacillus fermentum* (3), *Lactobacillus brevis* (3) ve *Lactobacillus helveticus* (2) olmak üzere toplam 16 bakteri kullanılmıştır. *Lactobacillus* suşlarının gastrointestinal sistem koşullarına dirençlilikleri ve ürettikleri eksopolisakkaritin (EPS) bu koşullardaki koruyucu etkileri araştırılmıştır. Ayrıca tüm suşların oksalata dirençlilikleri ile bu ortamda EPS üretimleri belirlenerek, oksalatlı ortama direnç gösteren ve bu ortamlarda yüksek EPS üretimi gösteren suşların oksalat degradasyonları oksalatın farklı konsantrasyonlarında (10 mM ve 20 mM) belirlenmiştir. Laktobasil türlerinin pH:2'deki gelişim sonuçlarını karşılaştırıldığında, *L. rhamnosus*'ların %50'si, *L. fermentum*'ların %34'ü ve *L. brevis*'lerin ise %67'si pH:2'de canlılıklarını sürdürmüştür. *L. helveticus* suşları ise pH:2'ye dirençli türler olarak belirlenmiştir. Genel olarak tüm suşların %0,3 safralı ortamda gelişim gösterdikleri saptanmıştır. Test edilen *Lactobacillus* sp. suşlarının ortalama EPS üretimlerinin ortalama sonuçlarının *L. rhamnosus*'larda 229,94 mg/L, *L. fermentum*'larda 260,02 mg/L, *L. brevis*'lerde 234,98 mg/L ve *L. helveticus*'larda 317,23 mg/L olduğu gözlemlenmiştir. *Lactobacillus* suşlarının 20 mM sodyum oksalat içeren MRS besi ortamında geliştikleri ancak kontrol grubuna göre MRS-ox'taki gelişimlerinin düşük oranda azaldığı belirlenmiştir. 20 mM oksalat içeren ortamda suşların ortalama EPS üretimleri 100,45 ile 149,13 mg/L aralığında bulunmuştur. Gastrointestinal sistem koşullarına dirençli, EPS üretimi yüksek, oksalatlı ortama direnç gösteren ve 10 mM oksalatı degrade edebilen *L. rhamnosus* ACS5, SMC5, *L. brevis* KMP1, BP8 ve *L. helveticus* KMP5, BT11 suşları ve karşılaştırmak için yine bu özellikler bakımından düşük performans gösteren *L. rhamnosus* BT8 suşunun oksalat degradasyonları oksalatın yüksek konsantrasyonun da (20 mM) araştırılmıştır. EPS üretimi yüksek olan *L. helveticus* BT11, *L. brevis* KMP1 ve *L. rhamnosus* SMC5 suşlarının sodyum oksalatı yüksek oranda degrade ettiği belirlenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda asit-safra direnci, EPS üretimi, sodyum oksalata direnci bakımından yüksek performans gösteren *L. brevis* KMP1 suşunun oksalat degradasyonunda probiyotik bakteri olarak kullanımı önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler : *Lactobacillus*, Probiyotik, Eksopolisakkarit, Oksalat

ABSTRACT

DETERMINATION RELATIONSHIP BETWEEN OXALATE (KIDNEY STONE) DEGRADATION AND EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCTION OF DIFFERENT PROBIOTIC STRAINS BELONGING TO *LACTOBACILLUS* SP.

In this study, *Lactobacillus rhamnosus* (8), *Lactobacillus fermentum* (3), *Lactobacillus brevis* (3), *Lactobacillus helveticus* (2); 16 strains in total those of which were evaluated after being isolated from several regional cheeses of Turkey have been used. The resistance of *Lactobacillus* strains to gastrointestinal system conditions and the protective effects of exopolysaccharide (EPS) that they produce have been investigated. Besides, oxalate tolerance of all strains and EPS productions in that condition have been determined and the strains which are resistive to oxalate conditions and produce high EPS have been evaluated with degradation in different oxalate concentrations (10 mM and 20 mM). As we compare the growing results of *Lactobacillus* species at pH:2, 50% *L. rhamnosus*, 34% *L. fermentum*, and 67% *L. brevis* have sustained vitality at pH:2. On the other hand, *L. helveticus* strains have been determined as resistant species to pH:2. All strains in general have been found to progress in 0.3% bile conditions. The average EPS production of the tested *Lactobacillus* sp. strains has been observed as 229,94 mg/L in *L. rhamnosus*, 260,02 mg/L in *L. fermentum*, and 234,98 mg/L in *L. brevis* and 317,23 mg/L in *L. helveticus*. The *Lactobacillus* strains have been found to grow in MRS medium containing 20 mM sodium oxalate, however, it has been determined that their growth at MRS-ox decreases at low rate in comparison with the control group. The EPS production of the strains in 20mM oxalate conditions has been observed between 100,45 and 149,13 mg/L. *L. rhamnosus* ACS5, SMC5, *L. brevis* KMP1, BP8 and *L. helveticus* KMP5, BT11 strains that are resistive to gastrointestinal tract conditions, have high EPS production, and resistive to oxalate conditions and the oxalate degradations of *L. rhamnosus* BT8 strain, with low performance in regards to these features to compare, have been investigated in varying concentrations of the oxalate (20 mM). *L. Helveticus* BT11, *L. brevis* KMP1 ve *L. rhamnosus* SMC5 strains with high EPS production have been observed to degrade sodium oxalate at a high level. As a result of the obtained data, acid-bile resistance, EPS production, and the use of *L. brevis* KMP1, with high performance in regard to its resistance to sodium oxalate, as a probiotic bacteria in oxalate degradation is recommended.

Key Words : *Lactobacillus*, Probiotic, Exopolysaccharide, Oxalate

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1: Oksalik asidin kimyasal yapısı	3
Şekil 2.2: <i>O.formigenes</i> 'in mikroskopik görüntüsü.....	8
Şekil 2.3: Oksalil - CoA, Formil - CoA enzimatik yolağı	10
Şekil 2.4: Oksalatın 3-phosphoglycerate'a yıkımının enzimatik yolağının gösterimi.....	10
Şekil 2.5: Probiyotik mikroorganizmaların kullanılabilmesi için gereken özellikler	15
Şekil 2.6: <i>L. fermentum</i> 'un morfolojik görüntüsü	16
Şekil 2.7: <i>L. rhamnosus</i> 'un mikroskopik görüntüsü.....	17
Şekil 2.8: <i>L. acidophilus</i> 'un morfolojik görüntüsü.....	17
Şekil 3.1: EPS yapının pellet içerisinde makro olarak gözlemlenmesi	33
Şekil 3.2: Trinity Biotech Oksalat Kiti	36
Şekil 3.3: Oksalat kit içeriği	37
Şekil 3.4: Trinity Biotech Sample Purifier Tüpleri	38
Şekil 3.5: Sample purifier tüpleri (içinde aktif karbon olan tüpler)	38
Şekil 3.6: A ve B reaktifleri eklenip OD'si ölçülen örnekler	39
Şekil 4.1: t=2 anında Lactobacillus suşlarının pH:2 ortamındaki OD değerlerinin ve canlılıklarının (log kob/ml) karşılaştırması	44
Şekil 4.2: t=2 anında Lactobacillus suşlarının %0,3 safralı ortamda OD değerlerinin ve canlılıklarının (log kob/ml) karşılaştırması	45
Şekil 4.3: t=2 anında Lactobacillus suşlarının pH:2 ve safralı ortamdaki canlılıklarının (log kob/ml) ve OD değerlerinin kontrol grubuyla kıyaslanması.....	45
Şekil 4.4: Lactobacillus suşlarının 24 saat süre sonundaki pH:2, % 0,3 safra ve kontrol ortamlarındaki Od değerleri karşılaştırılması	46
Şekil 4.5: Lactobacillus suşlarının MRS besi ortamında ürettikleri eps miktar tayini	48
Şekil 4.6: %0.3 safralı ortamda gelişme ve EPS üretimi arasındaki negatif korelasyon.....	49
Şekil 4.7: 20 mM sodyum oksalat içeren ortamdaki son kültür pH ve log kob/ml değerler arasındaki pozitif ilişki.....	51
Şekil 4.8: Lactobacillus suşlarının EPS üretimleri ile oksalat dirençlilikler arasındaki korelasyon grafiği.....	52
Şekil 4.9: Laktobasillerin MRS-ox ve MRS besi ortamlarındaki canlılıkları (log kob/ml).....	54
Şekil 4.10: Laktobasil suşlarının MRS-ox besi ortamındaki EPS üretimleri.....	57
Şekil 4.11: Laktobasil suşlarının MRS ve MRS-ox besi ortamlarındaki EPS üretimleri.....	57
Şekil 4.12: Laktobasillerin 10 mM sodyum oksalatlı ortamda % oksalat degradasyon değerleri.....	61
Şekil 4.13: Laktobasillerin 20 mM sodyum oksalat içeren ortamdaki %oksalat degradasyonları	64
Şekil 4.14: Laktobasillerden seçilen 7 suşun 10 mM ve 20 mM sodyum oksalatlı ortamdaki % degradasyon değerlerinin karşılaştırılması	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1: Oksalik asit içeren gıdalar.....	4
Çizelge 2.2: Probiyotiklerin potansiyel klinik amaçları ve etkileri	13
Çizelge 2.3: Probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmalar.....	14
Çizelge 2.4: Hiperoksalüri, idiyopatik hiperoksalüri ve sağlıklı bireylerde diyet kontrolü ve çeşitli probiyotik takviyeleriyle üriner oksalat atılımı arasındaki ilişki.....	24
Çizelge 3.1: <i>Lactobacillus</i> suşları ve izolasyon kaynakları.....	27
Çizelge 3.2: Man Rogosa ve Sharpe (MRS) sıvı ve katı besiyeri	28
Çizelge 3.3: MRS- ox sıvı besiyeri içeriği	29
Çizelge 3.4: Test bakterileri ve temin edildiği kaynak	30
Çizelge 3.5: EPS miktar tayini için oluşturulan glukoz standartı.....	36
Çizelge 4.1: <i>Lactobacillus</i> spp.suşlarının asit ve safra direnci (2 h lik anaerobik inkübasyon kob/mL)	42
Çizelge 4.2: Laktobasillerin MRS besi ortamında EPS üretimleri (mg/L).....	47
Çizelge 4.3: Laktobasillerin sodyum oksalata (20 mM) dirençlilikleri.....	53
Çizelge 4.4: <i>Lactobacillus</i> suşlarının MRS-ox besi ortamındaki EPS üretimleri.....	55
Çizelge 4.5: <i>Lactobacillus</i> suşlarının 10 mM sodyum oksalat degradasyon sonuçları.....	59
Çizelge 4.6: <i>Lactobacillus</i> suşlarının 20 mM sodyum oksalat degradasyonu sonuçları	63

SİMGELER DİZİNİ

α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
μl	Mikrolitre
g	Gram
Ig	İmmünoglobulin
kDa	Kilodalton
L	Litre
mg	Miligram
mg/L	Miligram/Litre
mg/g	Miligram/Gram
ml	Mililitre
mmol	Milimol
mM	Milimolar
N	Normal
pH	Asitlik bazlık birimi
rpm	Dakikada devir sayısı
sp	Species (Türleri)
subsp	Subspecies (Alt tür)
$\%$	Yüzde
vb.	Ve benzeri

KISALTMALAR DİZİNİ

ATCC	American Type Cultur Collection
ATP	Adenozintrifosfat
Bkz.	Bakınız
CO₂	Karbondioksit
dk.	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EPS	Eksopolisakkarit
FEF	Fen Edebiyat Fakültesi
HCl	Hidrojen klorür
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
kob	Koloni oluşturan birim
LAB	Laktik asit bakterileri
MRS	Man Rogosa Sharpe
MRS-ox	Oksalat içeren Man Rogosa Sharpe
NaOH	Sodyum hidroksit
NCFM	National Centre for Food Manufacturing
OD	Optical density (optik yoğunluk)
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonükleik asit
TBAG	Temel Bilimler Araştırma Grubu
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu

1. GİRİŞ

Böbrek taşları tıbbi adıyla nefrolitiazis, çeşitli sebeplerle idrarın içeriğinde bulunan ürik asit ve kalsiyum gibi maddelerin kristalleşerek üreter ve üretra boyunca oluşan yapılardır. Böbrek taşlarının %80'ini kalsiyum oksalat oluştururken, ürik asit taşları (%5-23), enfeksiyon taşları (%20) ve sistin taşları (%1-2) da sıklıkla karşılaşılan oluşumlardır. Oksalik asit güçlü bir dikarboksilik asittir ve dokuları tahrip eden toksik bir bileşiktir. Vücutta iyonlarla birleşerek tuz oluşturur. Kalsiyum oksalat en çok karşılaşılan şeklidir. Oluşan bu çözünmeyen tuzlar birçok canlı için toksik bir bileşiktir. İnsanlarda oksalat; hiperoksalüri, ürolitiazis, böbrek yetmezliği, kardiyomiyopati gibi çeşitli patolojik bozukluklara neden olmaktadır (Jiang vd., 2011, James 1972). Oksalik asit'in, normal diyetle günlük sağlıklı bir bireyin gıdalardan alımı 70- 920 mg'dır. Vejeteryan beslenen bireylerde bu miktar daha fazla olabilmektedir (Holmes vd., 2000). Oksalik asit aynı zamanda nonenzimatik bozulmayla ya da bağırsak mikrobiotası tarafından metabolik ön maddelerden (askorbik asit) de üretilebilirler (Jiang vd., 2011).

Oksalat çoğunluk olarak, besin kaynakları veya askorbat, glioksilat ve glisin endojen metabolizmasının bir son ürünü olarak çıkar; yaklaşık %10-15 oranında besinlerden dışardan alınır. Bunların da yaklaşık %3-5' i bağırsaktan emilir. Sağlıklı bir bireyde diyetle alınan oksalatın, üriner oksalatın atılımına katkısı en fazla %10- 20 arasında olmasına rağmen gastrointestinal mikrobiota eksikliğinde diyet oksalatın lümendeki emiliminin üriner oksalat seviyesini önemli ölçüde etkilemektedir (Williams ve Wandzilak, 1989).

İnsanların gastrointestinal sisteminde kolonize olan bakteri türleri geniş bir çeşitlilik gösterir, bunlardan bazıları oksalatı degrade etme yeteneğine sahiptir. Oksalat degradasyonu, oksalat emilimini azaltır ve böylece üriner oksalat (oksalüri) miktarını da düşürür. Oksalatı en iyi degrade eden tür olan *Oxalobacter formigenes*, kolonda yaşayan anaerobik bir bakteridir ve enerji kaynağı olarak sadece oksalatı kullanır. Gastrointestinal sistemde *O. formigenes*'in yokluğu ile oksalat taşı hastalığının tekrarlaması arasında bir ilişki olduğu belirlenmiştir (Sidhu vd., 1997).

İnsanların gastrointestinal sisteminde bakteriyel kolonizasyon bebeklikten itibaren başlayıp, bireylerde farklılık göstermektedir. *Oxalobacter formigenes*'in bağırsak florasındaki kolonizasyonunun stabil ve kalıcı olmamasından dolayı, çalışmaların alternatif oksalat degradasyonu sağlayan laktik asit bakterilerinin üzerinde yapılmasına yöneltmiştir (Hokama vd., 2000).

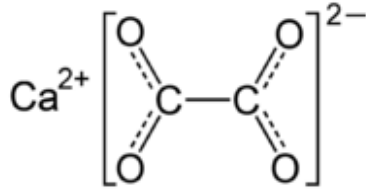
Günümüzde birçok sektörde kullanılan laktik asit bakterilerinin probiyotik olarak da kullanımının yaygınlaşması sonucu bilimsel çalışmalarda da önemli bir yer tutmasını sağlamıştır. *Lactobacillus* cinsine ait bakterilerin oksalat degradasyon yetenekleri üzerine yapılan çalışmalar ve oral yolla alınan probiyotik ürünlerin insan ve bazı deney hayvanlarında tüketiminin üriner oksalat salgısını azalttığı tespit edilmiştir (Hokama vd., 2005).

Bu çalışmada, Türkiye'nin çeşitli yöresel peynirlerinden izole edilerek Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür stoklarından temin edilmiştir *Lactobacillus rhamnosus* (8), *Lactobacillus fermentum* (3), *Lactobacillus helveticus* (2), *Lactobacillus brevis* (3) olmak üzere 16 suş kullanılmıştır. Bu suşların bazı probiyotik özellikleri (asit üretimi, antimikrobiyal aktivite, antikolesteromik aktivite, otoagregasyon, koagregasyon ve antibiyotiklere direnç aktiviteleri) daha önceki çalışmalarla belirlenmiştir. Bu çalışmada suşların intestinal sistem koşullarına (pH, safra) dirençlilikleri, eksopolisakkarit (EPS) üretimleri, başta böbrek taşı olmak üzere birçok hastalığa neden olan oksalata karşı dirençliliklerinin belirlenmesi hedeflenilmiştir. Gastrointestinal koşullarına direnç gösteren, EPS üreten ve oksalata dirençli suşların farklı konsantrasyonlardaki (10 mM ve 20 mM) oksalat degradasyonları belirlenerek, oksalat degradasyonu ile EPS üretimi arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Oksalik asitin yapısı ve gıdalarda bulunma durumu

Oksalik asit güçlü bir dikarboksilik asittir ve dokuları tahrip eden toksik bir bileşiktir (Şekil 2.1). Vücutta iyonlarla birleşerek tuz oluşturur. Kalsiyum oksalat en çok karşılaşılan şeklidir (Park vd., 1997). Oksalik asitin kimyasal formülü: CaC_2O_4 , yoğunluğu: 128.097 g/mol ve erime noktası: 200 °C'dir.



Şekil 2.1: Oksalik asidin kimyasal yapısı

Bağırsak içinde oksalik asit çözünür olmayan tuzlarını oluşturmak üzere kalsiyum dışında, sodyum (Na), magnezyum (Mg), potasyum (K) ve demir (Fe) ile de bir araya gelebilmektedir. Na ve K ile oluşturduğu tuzlar suda bir miktar çözünebilirken, Ca ve Mg tuzları çözünmemektedir. (Turroni vd., 2007). Oksalat doğada ve birçok gıdada yaygın olarak bulunur. Bunlardan bazıları: haşlanmış havuç (1,88 mg/g), domates (0,04 mg/g), kereviz (0,17 mg/g), patates (0,02 mg/g), mısır (0,03 mg/g), çay (0,11 mg/mL), kahve (0,05 mg/mL) ve çikolata (1,17 mg/g)'dır (Troxel vd., 2004, Noonan ve Savage 1999). Oksalik asit içeren bazı gıdalar ve bu gıdaların içerdikleri ortalama oksalat miktarları Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1: Oksalik asit içeren gıdalar (Noonan ve Savage 1999, Gontzea ve Sutzescu 1968, Meena vd., 1987)

Gıda	Ortalama oksalat miktarı (mg/100 g)
Semizotu	1294
Çay	1150
Ispanak	970
Kakao	700
Kuzukulağı	500
Kırmızı pancar	275
Ravent	260
Kaju	231
Maydanoz	170
Kahve	100
Patates	80
Bamya	62
Lahana	60
Sütlü çikolata	58
Tatlı patates	29
Siyah zeytin	27
Tam buğday ekmeği	27
Domates	20
Elma	15
Marul	12

Oksalik asit aynı zamanda nonenzimatik bozulmayla ya da bağırsak mikroflorası tarafından metabolik ön maddelerden (askorbik asit) de üretilebilirler. Zarembski ve Hodgkinson (1962) tarafından yapılan bir çalışmada intravenöz askorbik asit infüzyonu sonrası total oksalik asit atılımı arasındaki ilişki incelemiştir. İnfüzyonda farklı askorbik asit dozlarında sırasıyla 0,2 g/kg, 0,6 g/kg, 0,9 g/kg, 1,5 g/kg uygulaması sonrasında gözlemlenen total oksalik asit atılımı sırasıyla 6,5±3,4 mg,

8,7±2,9 mg, 10,7±2,8 mg, 24,1±8,2 mg olurken infuzyondan 6 saat sonraki total oksalik asit atılımı 27,2±9,3 mg, 39,3±9,6 mg, 56,5±16,0 mg, 81,3±18,8 mg olmuştur. Bu deney ışığında uygulanan askorbik asit miktarına doğru orantılı olarak oksalik asit atılımı da artış göstermiştir.

2.2 Oksalatın Fazla Alınması Sonucu Oluşan Rahatsızlıklar

Günlük oksalat alınımları 70 ile 920 mg arasında olup vejetaryenlerde bu miktar daha yüksektir. Oksalik asit en okside bileşiklerdendir ve Ca^{2+} gibi katyonların güçlü bir şelatlayıcısıdır. Bu özellikler oksalik asitin yıkılmasını ve enerji üretilmesini kısıtlar, ayrıca memeliler başta olmak üzere yaşam formlarının çoğu için oksalik asidi toksik yapar. Oksalatın yüksek konsantrasyonları, insanlarda ölüme, hiperoksalüri (idrarda oksalat seviyesinin normalin üstünde olması), pirioksidin eksikliği ve ürelitiazis (taş ya da urolit oluşumu), böbrek yetmezliği gibi patolojik hastalıklara ve diğer hastalıklara neden olabilir. Böbrek taşlarının yaklaşık %75'i kalsiyum oksalat kaynaklıdır ve hiperoksalüri de bu tip taşların oluşumundan sorumlu birincil faktörlerdendir. Kolon bağırsağın en fazla oksalat absorpsiyonu yapılan bölgesidir ve normal koşullarda günlük besinle alınan oksalatın %3-5' nin absorpsiyonu kolonda gerçekleşir. İntraluminal oksalat yıkımındaki artış absorpsiyonun azalmasına, idrarda ve plazmadaki oksalat seviyesinin düşmesine neden olur. (Turrone vd., 2007).

Oksalat çoğunluk olarak besin kaynakları, askorbat, glioksilat ve glisin endojen metabolizmasının bir son ürünü olarak çıkar. Yaklaşık %10-15 oranında besinlerle dışardan alınır. Vücuda alınan oksalatın da yaklaşık %3-5'i bağırsaktan emilir. Oksalat önemli ölçüde insan vücudunda metabolize olmadığından, atılım alımından hemen sonra başlar ve 2 ila 6 saat arasında en yüksek seviyeye ulaşır (Hoffer vd., 2008). Böbrekler tarafından süzülerek idrar ile atılır. *Oxalobacter formigenes* ve bağırsak florasındaki probiyotiklerin yokluğunda, oksalik asit içeriği yüksek gıdaların fazla alımı sonucu; oksalik asit pozitif yüklü iyonlarla birleşerek çözünmez tuzlarını oluşturarak üreter ve nefronlarda tıkanıklara yol açar. Böbreklerden atılamayarak çeşitli büyüklüklerde taşlar oluşturur (Morozumi vd., 1987). Bu nedenle son zamanlarda oksalatla ilgili hastalıklar için kolonda bulunan oksalatı degriden anaerobik bakteriler ilgi çekmektedir.

Üriner oksalat, kalsiyum oksalat doygunluk seviyesinin anahtar belirleyicisidir. Normal koşullarda idrarda bulunan besin kaynaklı oksalatın %10-20' den fazla

olmadığı bildirilmesine rağmen, son çalışmalar, gastrointestinal hastalıkların bulunmadığı durumlarda besin kaynaklı oksalatın bağırsaktaki emilimi idrar ile oksalatın atılımına önemli ölçüde katkıda bulunur. Çünkü hiperoksalüri, ürelitiyazis için önemli bir risk faktörüdür, bu nedenle de hangi koşullar altında ne tip besinlerin idrardaki oksalat seviyesini artırdığını bilmek önemlidir. Gıdaların idrarda oksalat seviyesini yükseltme eğilimi, oksalat içeriğine ve absorpsiyon etkinliğine bağlıdır. Çünkü absorpsiyondan sonra çok düşük oksalat katabolizması gerçekleşir ve absorbe edilen oksalatın %90'dan fazlası 24-36 saat içinde idrardan geri kazanılabilir (Liebman ve Al-Wahsh, 2011).

2.3. Böbrek Taşları (Nefrolitiazis) tedavi yöntemleri

5 mm'ye kadar olan taşların büyük çoğunluğu verilen ağrı kesici, antispazmodik ilaç tedavisi ve bol sıvı alımı ile düşürülebilir. Taşın boyutu büyüdükçe müdahalesiz düşürme olasılığı azalır. En çok kullanılan teknikler şok dalga litotripsi (ESLW yöntemi), Perkutan Nefrolithotomy (PNL) ve Üretoroskopi (URS)'dir.

2.3.1 Şok dalgaları ile taş kırma yöntemi (ESLW yöntemi)

ESWL (Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy) şok dalga litotripsi ile yüksek frekanslı ses dalgalarını dış bir kaynaktan (vücudun dışından) göndererek böbrek taşı küçük parçalara ayırıp idrar yollarından düşmesini sağlamayan yöntemdir. ESWL yöntemi, taşları şok dalgaları ile küçük parçalar haline getirmektedir, idrar kanalından geçebilecek boyuta gelen taşlar kolayca dışarı atılabilmektedir. Bu yöntemin avantajı en güvenilir ve girişim gerektirmeyen taş tedavi şekli olmasıdır. Ancak taş kırma işleminde taş üzerine olan bu yıkıcı ve parçalayıcı kuvvet taşı parçalarken böbrekler ve komşu organlardaki ince duvarlı damarsal yapılarda yaralanmaya yol açarak kanamaya sebep olabilir. Aynı şekilde bu işlemin çok miktarda yapılması skar oluşumuna ve organ kayıplarına da sebebiyet verebilir. Ayrıca hastaya uygulanan her seansta hastada nefron kaybı yaşanmaktadır

2.3.2 Perkutan Nefrolithotomy (PNL)

Böbrek içindeki taş 2 cm'den büyük olduğunda veya ESWL ile kırılmadığında uygulanan güncel bir yöntemdir. Genel anestezi altında bel bölgesinde 1 cm'lik kesiden oluşturulan bir yoldan böbreğin içerisine girilerek taşlar bir bütün halinde veya kırılarak aynı yoldan dışarı çıkartılır. Endoskopik yani kapalı bir ameliyat yöntemi olan perkutan nefrolithotomy ameliyatında görüntüler endokamera ile bir televizyon ekranına büyütülmüş olarak taşınır. Taşlar genelde pnömatik, ultrasonik veya lazer taş kırıcılar ile parçalanırlar. Fakat tüm anestezi uygulamaların olduğu gibi, sonrasında yan etkiler gözlenmektedir (Sidhu vd., 1999).

2.3.3 Üreteroskopi (URS)

Üreter kanalı içerisindeki taşlar düşmezse veya ESWL ile kırılmazsa idrar yolundan üreteroskop denilen aletler yardımıyla girilerek tedavi edilebilirler. Üreteroskoplar 2.5-3 mm çapında, uzunlukları boyunca bir çalışma kanalı ve görüntüyü sağlayan bir mercek bulunan cihazlardır. Rijid yani sert üreteroskoplar ile dış idrar yolu ve mesane geçilip üreter içine girilerek taşlar lazer veya pnömatik taş kırıcı ile kırılarak tedavi edilir. Bu üreteroskoplar ile alt ve orta üreterdeki taşlar tedavi edilebilirler. Fleksibl yani kıvrılabilen üreteroskoplar ise uçları çeşitli yönlerde ve açılarda döndürülebildiğinden hem üst üreterdeki, hem de böbrek içinde havuzcuk ve kalıs adı verilen ceplerdeki taşların tedavisinde kullanılırlar. Üreteroskopik taş tedavisi sonrası hastalar aynı gün veya bir gün sonra evlerine taburcu edilirler.

Böbrek taşı tedavisi için kullanılan bu yöntemlere maruz kalınması yerine; probiyotik içeriği yüksek gıdalar ve kullanılacak gıda takviyelerinin yanısıra, kalsiyum, kırmızı et, beyaz et, vitamin alımı (C, D, A) ile diyet kontrol altında tutulursa; tekrarlayan nefrolitiazisin azaldığı, sağlıklı bağırsak florası sağlandığı, bağışıklık sistemi ve biyoyararlanımın maksimum seviyeye ulaşabileceği bildirilmiştir. (Alenezi ve vd., 2015).

2.4 *Oxalobacter formigenes* ve oksalat degradasyon mekanizması

O. formigenes, zorunlu anaerob ve gram negatif bir bakteridir. Şekil 2.2'de mikroskopik görüntüsü verilen bakteri karbon ve enerji kaynağı olarak sadece oksalatı

kullanır (Ong vd., 2006). Spor oluşturmeyen 0,4-0,6×1,0-2,5 µm uzunluğunda basillerdir. Kemoorganotrofturlar. *Oxalobacter* şu anda *Betaproteobacteria* sınıfında, *Burkholderiales* takımında ve *Oxalobacteraceae* familyasında sınıflandırılmaktadır (Cummings ve Macfarlane 1997).



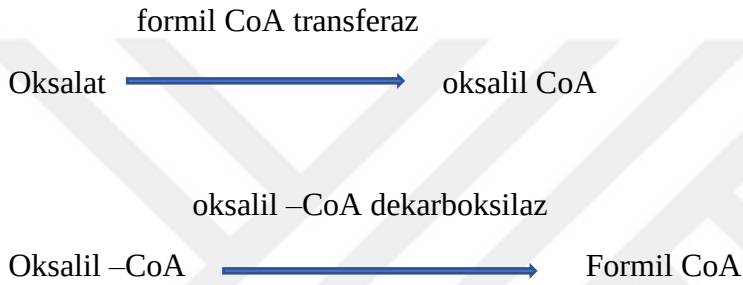
Şekil2.2: *O.formigenes*'in mikroskopik görüntüsü (<http://neboley.com.ua/ukraine/2012/01/11/36655/>)

O. formigenes'in normal bağırsak sisteminde kolonize olan sağlıklı populasyondaki oranı %70-80'dir. Doğada yaygın olarak herbivorların rumeninde, kuşların çekumunda ve denizel tortullarda bulunur. *O. formigenes*'in dışkıdaki normal kolonizasyon oranı yaklaşık $7,6 \times 10^6$ - $2,3 \times 10^8$ kob/g'dır ve bu miktardaki bakteri saatte 5-8 mmol/g oksalat degradasyonu gerçekleştirir (Allison vd.,2015). Son klinik çalışmalar *O. formigenes* gibi oksalatı degrade eden bakterilerin bağırsaktaki kolonizasyonunun azalması ile hiperoksalüri riskinin artması arasında bir korelasyon olduğunu göstermektedir (Troxel vd., 2004).

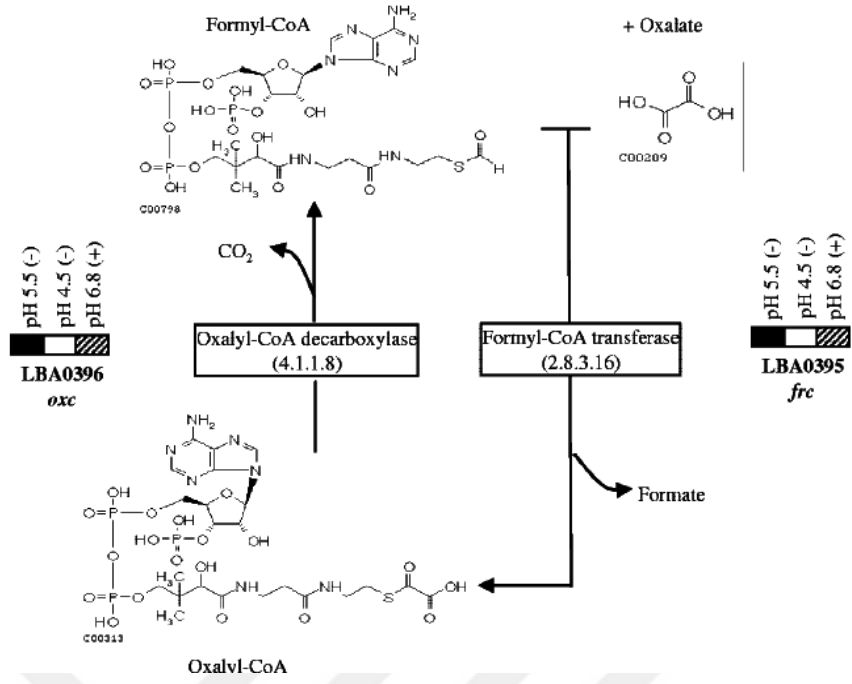
Bazı bakterilerin konakta gıdalardan alınan ve vücutta metabolit olarak oluşan oksalat dengesini düzenlemek için oksalatı parçalayarak plasma ve idrardaki konsantrasyonunu düşürdüğü ve böylece adsorpsiyonu önlediği önerilmiştir. Bağırsaktaki oksalatın degradasyonu, ilk kez 1985 yılında Dawson ve ark. tarafından ineklerin rumeni ve bazı otçulların kalın bağırsağındaki karma bakteriyel florası tarafından gerçekleştiği; sonrasında 1985 yılında, Allison ve ark, *O. formigenes*' in insanlar ve diğer hayvanlarda, spesifik oksalat indirgeyici etkisini rapor etmiştir (Allison vd., 1985). Oksalatı en iyi degrade eden tür olan *O. formigenes*, kolonda yaşayan anaerobik bakteri türüdür ve metabolik döngüyü kullanarak oksalat

dekarboksilasyonu ile metabolik enerji kazanır (Şekil 2.3, Şekil 2.4). Son klinik çalışmalar *O. formigenes* gibi oksalatı degrede eden bakterilerin bağırsaktaki kolonizasyonunun azalması ile hiperoksalüri riskinin artması arasında bir korelasyon olduğunu göstermiştir (Azcarate-Peril vd., 2006).

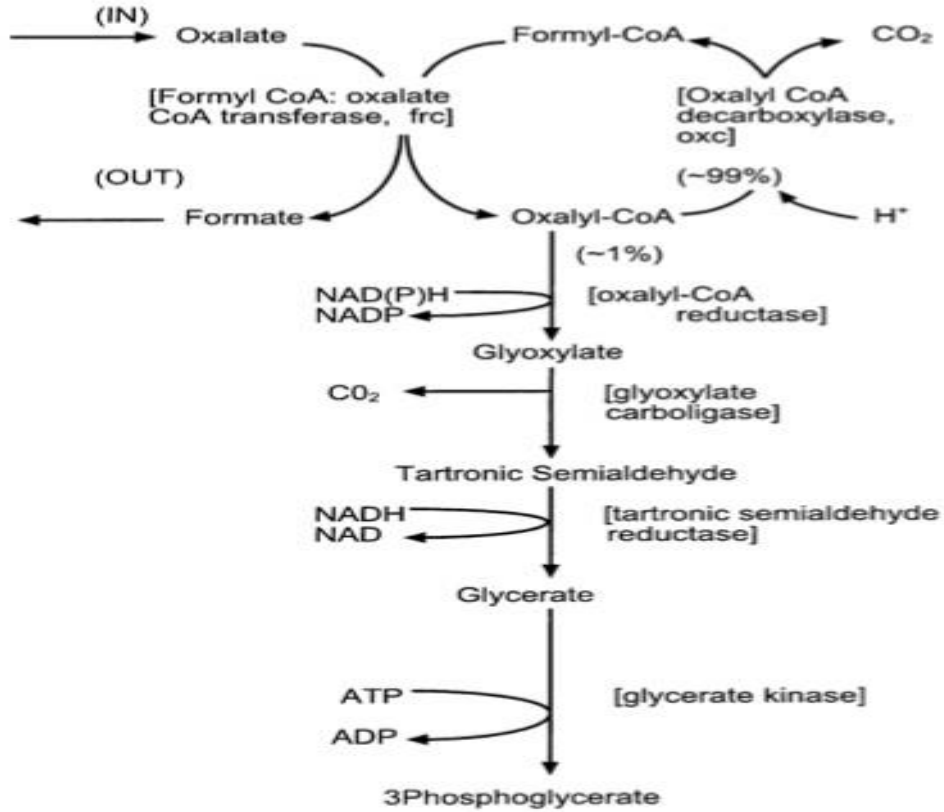
O. formigenes omurgalıların gastrointestinal sisteminin (GİS) normal florasında bulunan zorunlu anaerobik bir bakteri olup oksalatı en iyi degrede edebilen bakteri türüdür. Bu bakterideki oksalat degradasyon mekanizmasında, oksalatın dekarboksilasyona uğraması ile formik asit ve CO₂ oluşur. Bu reaksiyonda oksalat/format transportu ile oluşan proton gradientinden 1 molekül ATP üretimi gerçekleşir (Salminen vd., 2004).



O. formigenes de oksalatın yıkımında üç enzim rol alır. Formil koenzim A (CoA) transferaz (*frc*), oksalat molekülünü oksalil-CoA'ya dönüştürerek aktifleştirir, oksalil-CoA dekarboksilaz enzimi (*oxc*), oksalil-CoA molekülünü dekarboksilasyona uğratarak formil CoA'ya çevirir, oksalat:format antiportırı (*oxIT*) ekstraselüler oksalat ve intraselüler format değişimini katalizler (Turrone vd., 2010).



Şekil 2.3: Oksalil - CoA , Formil - CoA enzimatik yolağı (Azcarate-Peril vd.,2006)



Şekil 2.4: Oksalatın 3 -phosphoglycerate'a yıkımının enzimatik yolağının gösterimi (Azcarate-Peril vd.,2006)

O. formigenes, insan vücudundaki kolonizasyonu bağırsakta bebeklikte başlar ve 6-8 yaşlarında maximum olur (Sidhu vd.,1997).Ancak günümüz tıp tedavilerinde reçetelerin olmazsa olmazı antibiyotikler yüzünden bağırsak florasındaki yararlı mikroorganizmaların kolonizasyonu da ciddi oranda zarar görmektedir. Bu yüzden *O. formigenes*’in yetişkinlerin bağırsak florasındaki kolonizasyon oranını çocuklar ile karşılaştırdığımızda, yetişkinlerde bu oranda %60 -80 azalma olduğu tespit edilmiştir. Ampirik tedavi şekli ile sık kullanılan antibiyotikler faydadan çok zarar teşkil etmektedir (Sidhu vd., 1997).

2.5. Probiyotikler

Probiyotik kelimesi Yunanca kökenli olup ‘‘ yaşam için ‘‘ anlamına gelen ve uzun yıllardan beri çeşitli şekillerde kullanılan bir kelimedir (Gomes ve Malcata 1999). Probiyotik kavramı, ilk olarak Bulgar köylülerinin uzun ve sağlıklı yaşamlarının kaynağının fermente süt ürünleriyle beslenmeleri olduğunu öne sürerek Nobel Ödülü kazanan Rus bilim adamı Elie Metchnikoff tarafından 1900’lü yıllarda ortaya konulmuştur. Elie Metchnikoff, fermantasyon yeteneğine sahip basiller ile (*Lactobacillus*) beslenmenin toksik mikrobiyal aktiviteleri azaltarak, kolon mikroflorasını olumlu yönde etkilediğini öne sürmüştür. Metchnikoff’un teorisi ile ‘‘probiyotik’’ kavramı bu şekilde doğmuştur (Parvez vd., 2006, Sanders 1999). Bu gelişmeyi takiben, 1930’larda probiyotiklerin beslenme üzerine etkileri konusunda ilk klinik denemeler gerçekleştirilmiş; 1950’lerin sonlarında ise domuzlarda görülen *Escherichia coli* enfeksiyonunun tedavisinde ilaç olarak kullanılmak üzere Amerika Birleşik Devletleri Tarım Departmanı tarafından probiyotik bir ürüne lisans verilmiş ve böylece probiyotik kavramı 20. yüzyılın başlarında hipotez olmaktan çıkmaya başlamıştır. Ancak, ‘‘pro-biyotik’’ teriminin kullanımı, çok daha sonra, ‘‘bağırsağın mikrobiyal dengesine katkıda bulunan organizma ve maddeler’’i ifade etmek üzere Parker tarafından önerilmiştir (Parvez vd., 2006). Probiyotiklerin, probiyotiği tüketen kişinin intestinal florası üzerindeki olumlu etkisi, Fuller tarafından 1989 yılında yapılan tanımda da bulunmaktadır. Bu yazara göre, ‘‘probiyotik, tüketicinin intestinal mikrobiyal dengesini düzenlemek ya da desteklemek suretiyle, sağlık üzerinde yararlı etkisi olan, canlı mikrobiyal gıda katkısı’’dır (Sanders 1999 , Garssen vd., 2004 , Saarela vd., 2000).Bu tanım Salminen ve ark. (1998) tarafından ‘‘insan ve hayvanların

sağlığını geliştirmek için tasarlanan gıda, yem ya da besinsel katkılardaki canlı mikrobiyal preparatlar '' olarak geliştirilmiştir.

“Probiyotik ürün” ise; içerisinde konakçı sağlığı üzerine olumlu etkileri olan mikroorganizmaları içeren, çeşitli enzim, vitamin ve aroma bileşenleri ile desteklenerek doğrudan kapsül veya tablet haline getirilmiş diyet takviyeleri (farmasötikaller) olarak tanımlanmaktadır (Çakır 2003, Yücesan 2002, Bozkurt 2004). Geleneksel olarak probiyotikler yoğurtla birleştirilmiştir ancak son yıllarda süt, dondurma, peynir ve peynirden elde edilen ürünler ve süt ürünlerinin yanı sıra mayonez, et, sos, salam, meyve suları ve yulafli ürünler gibi birçok gıda maddesine eklenmiştir (Ong vd., 2006).

Probiyotik olarak isimlendirilen bakterilerin selektif olarak büyüme ve gelişmesini sağlayan, aktivitelerini arttıran sindirilemeyen karbonhidrat bileşenlerine prebiyotik denilmektedir. Bir disakkarit olan laktuloz, inulin, oligosakkaritler (maltoz, soya, ksiloz), oligofruktoz ve galaktoz içeren galaktooligosakkaritler (kurubaklagiller) prebiyotikler sınıfına girmektedirler (Cummings vd., 1997).

2.6. Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığı üzerine etkileri

Probiyotiklerin bağırsak fizyolojisi üzerine dolaylı veya doğrudan etkide bulunarak immünsistemi uyardığı ve konakçının ağız ve sindirim sistemi dahil, üst solunum yolu ve ürogenital sistem mukozal yüzeyini etkileyerek iyi hal ve sağlığı geliştirici, hastalık riskini azaltıcı potansiyel etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Karahan ve Güvener 1999).

Probiyotiklerin etki mekanizmasına yönelik çalışmalar, bağırsak florasının düzensizliğiyle ortaya çıkan mide-bağırsak sistemindeki bozukluklara dayanarak yapılmaya başlanmıştır (Klaenhammer ve Kullen 1999). Probiyotik bakteriler, patojen bakterilerin üremesini engelleyen inhibitör antimikrobiyal peptid (mikrosin, bakteriyosin) üreterek patojen mikroorganizmalar üzerine antagonistik etki yaparlar (Şekil 2.5). Yapılan çalışmalarda probiyotik bakterilerin, *Saccharomyces boulardii*, *Candida albicans*, *Salmonella typhi*, *Shigella* ve *E.coli*'nin üremesini baskıladığı gösterilmiştir. Patojenlerin adezyonunu önlerler; sayı ve hacim avantajları ile bağırsak ve ürogenital sistem epitel hücrelerinde, patojenlerin girmesini zorlaştırırlar. Epitelyal bariyeri güçlendirerek, patojenlerin translokasyonunu önlerler. Patojenlerin üremek için gereksinim duydukları besin maddelerini tüketerek, üremelerini inhibe ederler; S.

boulardii, *Clostridium difficile*'nin gereksinim duyduğu monosakkaridleri tüketerek bu türün üremesini önler (Klaenhammer ve Kullen 1999, Donohue ve Salminen 1996). (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2: Probiyotiklerin potansiyel klinik amaçları ve etkileri (Salminen ve Ouwehand 2004)

Probiyotiklerin Etkisi	Probiyotiklerin Mekanizması
Akut diyarenin besinsel olarak düzenlenebilmesi	Bağırsak mikrobiyal florasının düzenlenmesi, rotavirüs yayılım süresinin kısaltılması
Alerjik ve inflamatuvar bağırsak hastalıklarının besinsel düzenlenmesi	Musin sentezinde artış, lokal ve sistemik inflamatuvar cevabın, gut bariyer fonksiyonun ve mikrobiyal floranın özelliklerinin iyileştirilmesi
Enfeksiyon hastalıkları riskini azaltma	Rotavirüse karşı IgA salgısının ve musin sentezinin artışı
Alerjik ve inflamatuvar hastalıkları riskini azaltma	Bağırsak bariyer fonksiyonu, antiinflamatuvar etki, inflamatuvar moleküllerinin düzenlenmesi immün sistemin gelişiminin teşvik edilmesi

2.7. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar

Farklı cinslere ait birçok mikroorganizma probiyotik olarak kullanılmaktadır. En yaygın olarak kullanılan suşlar ise laktik asit bakterilerine ait; enterokoklar, laktobasiller ve bifidobakterileri kapsayan heterojen bir gruptan oluşmaktadır. Özellikle laktobasiller probiyotik olarak kullanılan bakterilerin başında gelmektedir. Ancak, günümüzde diğer mikroorganizmalar da probiyotikler arasında yer almaktadır (Saarela vd.,2000). Laktik asit bakterileri dışında probiyotik olarak kullanılan diğer organizmalar içinde *Bacillus* spp., mayalar (*Saccharomyces cerevisiae* ve *S. boulardii*) ve filamentöz fungusler (*Aspergillus oryzae*) yer almaktadır (Parvez vd., 2006). Probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmalar Çizelge 2.3'te gösterilmiştir (Ouwehand vd., 2002, Jan vd., 2002).

Çizelge 2.3: Probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmalar (Kaur vd.,2002).

İnsanlar için kullanılanlar		Hayvan beslemede kullanılanlar
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>Bacillus mesentericus</i>
<i>L. casei</i> Shirota	<i>L. casei</i>	<i>B. licheniformis</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. subtilis</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>B. natto</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>B. toyoi</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>L. brevis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>B. bifidum</i>	<i>L. helveticus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
	<i>B. bifidum</i>	<i>Candida pintolopesii</i>
<i>B. longum</i>	<i>B. brevis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>B. infantis</i>	<i>B. pseudolongum</i>	
<i>Str. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	<i>B. thermophilus</i>	
<i>Saccharaomyces boulardii</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	



Şekil 2.5: Probiyotik mikroorganizmaların kullanılabilmesi için gereken özellikler (Saarela vd.,2000).

2.8. Laktik asit bakterilerinin genel özellikleri

Düz veya kıvrımlı uzun çubuk şeklinde, katalaz negatif, spor oluşturmayan ve gram pozitif olarak gruplandırılan *Lactobacillaceae* familyasına ait olan bakterilerdir. Mikroskopik incelemelerde genellikle uzun zincirler halinde görülmekte olup, tek tek de bulunabilirler. Genellikle hareketsiz, çoğu mikroaerofilik veya anaerobik olup homo veya heterofermentatif türleri mevcuttur. Genellikle 5- 53 °C aralığında üreme gözlenirken, pH uygunlukları ise 5.5–5.8 arasında değişmektedir (Rasic ve Kurmarin., 1978).

Lactobacillaceae familyasındaki *Lactobacillus* türleri ile *Streptococcaceae* familyasına ait *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* ve *Pediococcus* cinsleri, laktik asit bakterileri (LAB) sınıfına dahildir.

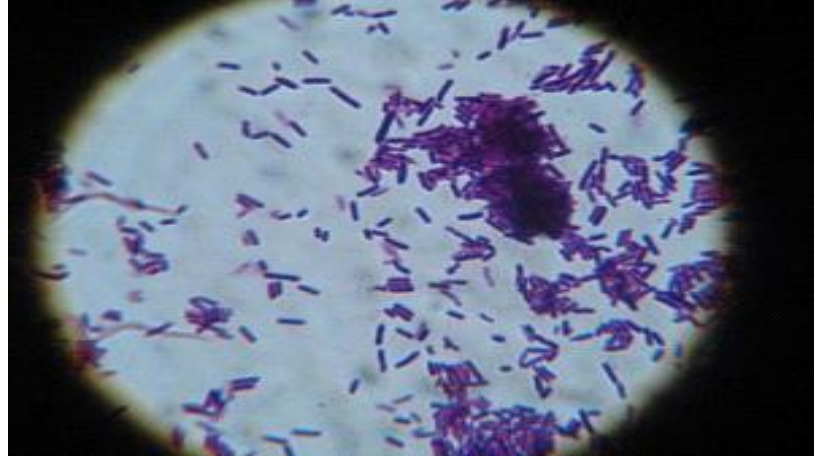
Yapılan elektron mikroskobu incelemelerinde *Lactobacillus*'ların 5 ana kısımdan oluştuğu gösterilmiştir. Bu kısımlar hücre çeperi, sitoplazmik membran, ribozomlar ve nükleer elementler olan kromozomlar ve plazmidlerdir (Sneath vd., 1986).

Hücre içerisinde peptidazlar, peptitleri aminoasitlere kadar yıkımını gerçekleştirerek mikroorganizmaya gelişiminde gerekli enerjiyi sağlarlar. Bu bakteriler patojen özellikte olmayıp aksine oluşturdukları antibakteriyel özellikteki maddeler sayesinde saprotif ve patojen bakterilerin ortamdaki gelişimini engellerler.

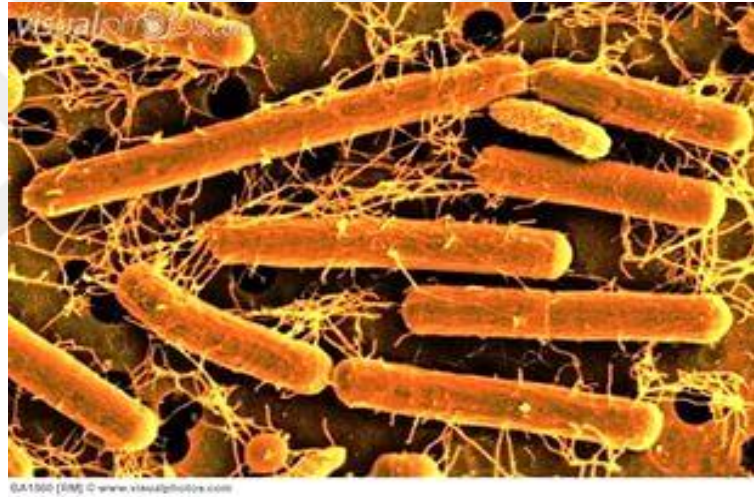
Laktik asit bakterileri süt bakterileri olarak anılmalarına rağmen, et ürünlerinde, bitki özünde hatta memelilerin ağız, bağırsak ve vajina mikroflorasında bulunabilmektedir. Laktobasiller normal sağlıklı bağırsak florasında diğer flora üyelerinin içerisinde %20–25 yoğunluğunda bulunmaktadır (Ayhan 2000). Laktobasillerin probiyotik gıda takviyesi olarak kullanılması ve bağırsaktaki yararlı ve potansiyel zararlı mikrofloranın sağlıklı bir şekilde dengelendiği öngörülmektedir (Kos vd., 2003).



Şekil 2.6: *L. fermentum*' un morfolojik görüntüsü (<http://zenkefir.blogspot.com.tr/2011/02/so-what-is-milk-kefir.html>)



Şekil 2.7 : *L. rhamnosus*' un mikroskopik görüntüsü (<https://im3tubtr.yandex.net/i?id=8e25d61df2e770d96c598bf89e7df8f2&>)



Şekil 2.8: *L. acidophilus*' un morfolojik görüntüsü ((<https://www.detoxtransforms.com/v/vspfiles/assets/images/Lactobacillus%20acidophilus%20Lactobacillus%20detoxtransforms%20ba1860.jpg>)

2.8.1 Laktik asit bakterilerinin probiyotik özellikleri

Laktobasillerin probiyotik gıda takviyesi olarak kullanılması ile bağırsaktaki yararlı ve potansiyel zararlı mikrobiyotanın sağlıklı bir şekilde dengelendiği öngörülmektedir (Kos vd.,2003).

LAB'ler, probiyotik olarak konak canlıda birçok fonksiyonuyla yarar sağlamaktadır. Son zamanlarda yapılan araştırmaların ışığında intestinal floradaki bakterilerin sağlık

açısından önemi vurgulanmış olup, aşağıda sıralanan olumlu etkiler probiyotik ürün tüketime yönlenimi artırmıştır.

2.8.2 Bağırsak sistemi rahatsızlıkları üzerindeki etkileri

Probiyotiklerin günümüzde en sık kullanıldığı alanlardan biri antibiyotik tedavisinden kaynaklı diyaredir. Özellikle ocuklarda görülen diyarelerde, *C. difficile* ile alakalı enfeksiyonların ve bağırsaklarda *Candida*'nın aşırı geliştiğı durumların tedavisinde de probiyotiklerden faydalanılmaktadır. *Saccharomyces*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* cinslerine ait bakteriler tedavilerde kullanılan probiyotiklerden bazılarıdır (Yücesan, 2002).

2.8.3. Antimikrobiyal etki

Probiyotiklerin bağırsak patojenlerine karşı antagonistik etki oluşturan laktik asit, H₂O₂ ve antibiyotik benzeri maddeler üretmelerinden dolayı antimikrobiyal etki gösterdiğinden söz edilmektedir. (Flickinger ve Fahey, 2002)

2.8.4. Mide zerindeki etkileri

Laktik asit bakterilerinin, mide, onikiparmak bağırsağı ülseri, gastrit, mide kanserinin etmenlerinden biri olan *Helicobacter pylori* enfeksiyonlarına karşı antagonist etkisi, yapılan *in vivo* ve *in vitro* alışmalarca ortaya konulmuştur. Gram pozitif, mikroaerofilik bir mikroorganizma olan *H. pylori*, midede mukus tabakası veya hemen altında gastrik epitele yapışık halde bulunur. *H. pylori* salgıladığı üreaz enzimi ile çevresinde alkali bir ortam yaratarak mide asidinden, katalaz enzimiyle de nötrofillerden salınan reaktif metabolitlerin toksik etkisinden korunmaktadır. Özellikle *Lactobacillus* cinsi türlerinde üretilen bakteriosin ve laktik asit gibi metabolik ürünlere bağılı olarak *H. pylori*'nin üreaz aktivitesinin anlamlı derecede azaldığı belirlenmiştir (Flickinger ve Fahey, 2002).

2.8.5. İmmün sistemin düzenlenmesi ve Antikarsinojenik aktivite

Probiyotik bakterilerin endojen savunma mekanizmasını arttırdığı gözlemlenmiştir. Probiyotiklerin barsaklarda özgül olmayan savunma bariyerini uyarıcı etkisi, artan intestinal permeabiliteyi normale dönüştürmesi ve barsak mikroflorasını değiştirmesi ile açıklanmaktadır. Ayrıca bu etkinin intestinal immünoglobulin A (IgA) yanıtını arttırması ve intestinal inflamatuvar yanıtı hafifletmesi ile ilgili olabileceği belirtilmektedir. Probiyotiklerin bu etkinliklerini fagositik aktivite, sitokin salınımı, doğal öldürücü hücre aktivitesi, immünoglobulin aktivitesi (IgA, IgG, IgM), T ve B hücre fonksiyonunu arttırarak gösterdiği ileri sürülmektedir. Sağlıklı bireylerde immün sistemi uyarıcı etki, alerjik bireylerde inflamatuvar yanıtı azaltıcı etki yapmaktadır. Bu veriler gastroenterit, besin alerjisi ve inflamatuvar barsak hastalıkları gibi barsak mukoza bariyerindeki bozukluklarda probiyotiklerin kullanılabileceğini göstermektedir (Çakır 2003, Rolfe 2000, Isolauri vd., 2001, Marteu vd., 2001).

Karsinojen maddeler vücut dışında üretilmekte ve ön karsinojen maddeler olarak alındıktan sonra kanser etmeni bileşiklere dönüşmektedir. Bağırsak sisteminde bulunan karsinojenlerin inaktivasyonunda, yayılmasında ve özellikle nitrozaminlerin ve safra sterollerin kanser etmeni maddelere dönüşmesinde önemli rol oynarlar.

Probiyotiklerin kanser oluşumunu riskini azalttığı birçok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur. Örneğin Aso ve Akanzan, (1992) çalışmalarında 10^{10} kob/g düzeyinde *Lactobacillus casei* toz preparatından bir yıl boyunca günde üç defa tüketen insanlarda mesane kanseri tedavisi sürecinin hızlandırıldığını tespit etmişlerdir. Bir başka çalışmada ise *L. acidophilus* tüketiminin kalınbağırsak kanserini önlediği tespit edilmiştir. Bu çalışmaya 21 adet sağlıklı bireylerden gönüllüler katılmış ve *L. acidophilus* kültürü süt veya yoğurda katılarak deneklere verilmiştir. Araştırmacılar bir aylık uygulama periyodundan sonra dışkıdaki prokarsinojenleri karsinojene dönüştüren bakteriyel enzim yoğunluğunda önemli azalmalar olduğunu bildirmişlerdir (Yücesan 2002, Çakır 2003, Rolfe 2000, Marteu vd., 2001, Wollowski vd., 2001, Aso ve Akazan 1992).

2.8.6. Vitamin metabolizmasını artırıcı etkisi

Sağlıklı intestinal florada probiyotik yoğunluğuna bağlı olarak, bu bakterilerin vitamin sentezledikleri gözlemlenmiştir. Bu bakterilerin ürettiği vitaminlerin, tiamin

(B₁), riboflavin (B₂), pridoksin (B₆) ve naftokin (K)'dır (Böke, 2005).

2.8.7. Kolesterol düşürücü aktivite

Günümüzde artan kalp-damar hastalıkları ve diyabet rahatsızlığı bulunan hastalarda, hastalığı olumsuz etkileyen bir diğer etmende hiperkolesterolemi rahatsızlığıdır. Bağırsaktaki *L. acidophilus*, *B. bifidum* ve *L. bulgaricus* gibi türlerin varlığı, henüz mekanizması tespit edilememesine rağmen, total kolesterol değerini anlamlı derecede düşürdüğü gözlemlenmiştir (Ma, 2004). 1974'den bugüne fermente süt ürünleri tüketiminin kan lipidleri üzerindeki etkisini değerlendiren ve toplam 534 denek ile yapılan çalışmalar sonucunda, kolesterol düşürücü etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuş, toplam kolesterolda %2,4-23,2 ve düşük dansiteli lipoprotein (LDL) kolesterolünde ise %9.0-9.8 oranlarında azalma olduğu tespit edilmiştir. Probiyotik bakterilerin serum kolesterolünü düşürücü etkileri ve mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. (Yücesan 2002, Çakır 2003, Ma 2004, Tahri vd., 1996, Charteris vd., 2000).

Bu olumlu etkilerin yanı sıra probiyotik özelliğe sahip bakterilerin iltihabi ve alerjik reaksiyonlar, ürogenital enfeksiyonlar, böbrek rahatsızlıkları, karaciğer rahatsızlıkları, idrar yolu enfeksiyonları, zehirlenme bağışıklık sistemine ve deri sağlığı üzerine de faydalı etkilerinin olduğu bildirilmiştir. (Hofvendahl ve Hahn-Hagerdal, 2000).

2.8.8. Laktoz intoleransı

Laktoz intoleransı, dünya nüfusunun %70'inde bağırsaktaki β -galaktosidaz aktivitesinin eksikliğinden kaynaklanan bir durumdur. Glikoz ve galaktoz olarak bilinen iki monosakkaritten oluşan laktoz sütün karbonhidratı olup kolayca metabolize edilemez. Laktoz, β - D-galaktosidaz tarafından monosakkaritlere parçalandığı için, bu enzimin eksikliğinde laktoz parçalanamaz. Fermente olmayan süt ve süt ürünlerini tüketiminden sonra laktozun iyi metabolize edilmemesi sonucu sindirim bozuklukları meydana gelir. Yoğurt yapımında kullanılan *L. bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* 'dan oluşan geleneksel kültürler önemli miktarda β - D-galaktosidaz enzimi içerdikleri için, yoğurt tüketimi laktozun metabolize edilememesine bağlı bağırsak hastalıklarını azaltmaktadır. Yoğurt ve probiyotik yoğurtla yapılan çalışmalarda laktoz emilimi iyi tolere edilmiştir. Sütteki laktozun bir

kısmı yoğurt bakterileri tarafından fermentasyon sırasında parçalanmaktadır (Yücesan 2002, Çakır 2003).

2.8.9. Hipertansiyon

Yaşlı hipertansif bireyler üzerinde yapılan çalışmalarda 8 hafta süreyle fermente edilmiş süt tüketiminin, sistolik ve diastolik kan basıncını önemli derecede azalttığı bildirilmiştir. Bunun gibi çalışmalar sonucunda probiyotik bakterilerin hipertansiyonu düşürmek için alternatif bir yaklaşım olabileceği belirlenmiştir (Çakır, 2003).

2.8.10. Akut diyare (ishal)

Çevresel etmenlerin yetersiz olduğu gelişmekte olan ülkelerde bebek ve çocuklarda diyare ataklarına rastlanır. Bu diyare vakalarının bazıları yaşamı tehdit edecek kadar ağırdır. Diyare ile seyreden hastalıkların büyük çoğunluğundan enterotoksijenik *E. coli* ve Rotavirüs birlikte sorumludur. Endüstrileşmiş ülkelerde ise bebekler ve çocuklarda diyare ataklarına daha az rastlanmaktadır. Ancak en sık görülen sorumlu etken yine Rotavirüs'dür. Fermente süt ürünlerinin Rotavirüs diyareli çocuklarda diyarenin süresini yarı yarıya azalttığı bildirilmiştir (Çakır 2003, Yücesan 2002, Hove vd., 1999, Marteu ve Cellier 2001).

2.8.11. Antibiyotik kaynaklı diyare

Antibiyotiğe bağlı diyarede; bağırsak mikroflorasındaki faydalı mikroorganizmaların kolonizasyonunun azalması sonucu zararlı mikroorganizmalar baskın hale gelir. Bu nedenle antibiyotik tedavisinin genellikle sindirim sisteminde bazı yan etkilere neden olduğu, antibiyotik alan hastaların %20'sinde diyare oluştuğu bildirilmektedir. Bu tip antibiyotik kaynaklı diyare endikasyonlarında probiyotikler tedavide yer almaktadır. Bunlardan bazıları *Saccharomyces*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Streptococcus*'dur. Bu uygulamalar sonucunda diyare süresinin kısaldığı ve hatta bazı suşların kullanılmasıyla önlendiği belirlenmiştir (Çakır 2003, Yücesan 2002, Marteu ve Cellier 2001).

2.9.Probiyotiklerin oksalat degradesyonundaki rolü

Oksalat indirgeyen bakteriyel katabolik enzimler formil-CoA transferaz (*frc*) ve okzalil-CoA dekarboksilaz (*oxc*) i, *O. Formigenes* dışında önemli probiyotik türler olan *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türleri de barındırmaktadır. Yapılan genetik çalışmalarda oksalat degradesyonunda görev alan *frc*, *oxIT* ve *oxc* enzimlerini kodlayan genler, bazı probiyotiklerin genomik DNA'sı üzerinden araştırılmıştır. Kontrol olarak da bu genleri taşıyan *O. formigenes* bakterisi kullanılmıştır (Campieri vd., 2001). Dekarboksilaz ve formil-CoA transferaz enzimlerini kodlayan genler *Lactobacillus* 'larda belirlenmiştir (Turroni vd., 2007, Federici vd., 2004).

2.9.1 Probiyotiklerin oksalat degradesyonu üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmalar

Murphy vd., (2009) tarafından, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerinin Oksalat degradesyonu üzerine yaptığı *in vitro* bir çalışmada; köpek ve kedi kadavralarından alınan bağırsaklar çıkarılarak, dokular alınmış ve bu dokulardan *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* bakterileri izole edilmiştir. Bu araştırmacılar izole ettikleri tüm suşları besi yerleri ve diğer koşullar sabit kalmak şartıyla amonyum oksalat ilave edilen ortamda geliştirerek, türlere göre oksalat katabolizması mili molar(mM) cinsinden değerlendirilmiştir. Seçilen tüm izolatlar, 20 mM amonyum oksalat varlığında gelişebilmiş ve bunlarda laktik asit bakterileri için amonyum oksalatın toksik etki göstermediği belirlenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *Bifidobacterium* türlerinin hiçbirinde oksalat degradesyonu tespit edilemezken test edilen 16 *Lactobacillus* suşunun 11'nin *in vitro* ortamda oksalatı degrades edebildiği gözlenmiştir. Aynı araştırmacılar oksalat degradesyonunu *in vivo* olarak ratlarda test etmek için *Lactobacillus animalis* 223C, *Lactobacillus murinus* 1222, *L. animalis* 5323 ve *L. murinus* 3133 suşlarını seçmişlerdir. Seçilen bu probiyotiklerle ratlar 4 hafta boyunca beslenmiştir. Ratların 0, 2 ve 4. haftalarda idrarlarındaki oksalat seviyeleri yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile belirlenmiştir. *L. animalis* suşları ile beslenen hayvanların idrar oksalat düzeyleri azalmış; ancak *L. murinus* suşları ile beslenenlerde değişim gözlenmemiştir. Sonuçta bu araştırmacılar probiyotik organizmaların oksalat degradesyon yeteneklerinin büyük farklılıklar

gösterdiğini ve oksalatın *in vitro* ve *in vivo* degradasyon etkilerinin eşit olmadığını bildirmişlerdir (Murphy vd., 2009).

Ayrıca *in vivo* olarak liyofilize haldeki probiyotik suşlardan verilen deneklerin, 4 hafta boyunca idrardaki oksalat seviyesi ölçülmüştür. Bu deneyler sonucunda probiyotikler türlerine (*B. lactis*, *L. animalis*, *Lactobacillus mirinus* gibi) göre kapasiteleri oranında oksalat degradasyonu yaptığı kanıtlanmıştır (Murphy vd., 2009).

Sidhu vd., (2001) tarafından yapılan çalışmada ise erkek Sprague-Dowley sıçanları şiddetli hiperoksalüri durumu yaratan amonyum oksalat ile takviye edilmiş bir diyetle yetiştirilmiştir. Bu sıçanlar 4 alt gruplara ayrılmış her bir gruba sırayla 1×10^3 , 10^5 , 10^7 ve 10^9 kob/mL dozda *O. formigenes* (probiyotik takviyesi) özofagal gavaj ile 2 hafta boyunca verilmiştir. Her bir grubun genel sağlık durumu ve üriner oksalat değişiklikleri takip edilmiştir. Yüksek oksalat içerikli diyetten kaynaklanan kronik hiperoksalüri sıçanların idrarındaki oksalat seviyesi probiyotik takviyesi başlatılmasından sonraki 2 gün içinde azalmıştır. Araştırmacılar iki haftalık sürede oksalat seviyesindeki azalma miktarını, bakteri doz artışı ile orantılı olarak arttığını gözlemlemişlerdir. *O. formigenes*' in yüksek seviyede uygulandığı rat gruplarının idrarındaki oksalat seviyesinin tamamen normale döndüğünü belirlemişlerdir. Diğer deney gruplarında *O. formigenes* miktarına göre idrar ile oksalat atılımı ters orantılı olarak azalmıştır. Ayrıca bu çalışma süresince sıçanlarda toksisite, antikor geliştirme ve histopatolojik durumun bulguları da stabil ve sağlıklı kalmıştır (Sidhu vd., 2001).

Turroni vd., (2006) eczacılık ve süt edüstrisinde kullanılan 60 adet *Lactobacillus* suşunun oksalat degradasyon yeteneklerini belirlemişlerdir. Bu araştırmacılara yaptıkları çalışmada *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius* ve pozitif kontrol *O. formigenes* DSM 4420 suşlarında %20-100 arasında oksalat degradasyonu gözlemlerken, *L. johnsonii*, *L. paraceti*, *L. delbrueckii subsp. lactis*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. brevis*, *L. reuteri*, *L. helveticus* ve negatif kontrol *E. coli* ATCC 11105 suşlarında oksalat degradasyonu gözlemlenmemiştir (Turroni vd., 2007).

Çizelge 2.4: Hiperoksalüri, idiyopatik hiperoksalüri ve sağlıklı bireylerde diyet kontrolü ve çeşitli probiyotik takviyelerle üriner oksalat atılımı arasındaki ilişki

ÇALIŞMA TOPLULUĞU	PROBİYOTİK BİLEŞİMİ	UYGULAMA YÖNTEMİ	ÇALIŞMA UZUNLUĞU	ÜRİNER OKSALAT ATILIMI %
6 taş yapıcı ya bağlı hiperoksalüri endikasyonu ve kontrolsüz diyet	4×10^{11} kob 5 suş karışımı 1:1:1:1 <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Lactobacillus brevis</i>	Soğuk su içinde süspanse edilmiş, günde 2 defa yemeklerden önce	4 hafta	-40 (Campieri vd., 2001)
10 taş yapıcı ile enterik hiperoksalüri endikasyonu ve kontrolsüz fakat idrar toplama günlerinde benzer diyet	8×10^{11} ve 16×10^{11} ve 24×10^{11} 1:1:4:4 4 suş karışımı <i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>B. Infantis</i>	Soğuk içecek içinde (süt hariç) süspanse edilmiş, günde bir kez akşam yemeğinden 1 -2 saat sonra veya ana öğünden sonra	4 hafta Her bir doz ile	-19 -24 -2 (Lieske vd., 2005)
20 Taş yapıcı idiyopatik hiperoksalüri endikasyonu ve kontrolsüz fakat düşük oksalat içerikli ve idrar toplama günlerinde benzer diyet	$10,8 \times 10^{11}$ kob 4 suş karışımı 1:1:4:4 <i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>B. infantis</i>	Soğuk içecek içinde (süt hariç) süspanse edilmiş, günde bir kez akşam yemeğinden 1 -2 saat sonra veya günün büyük yemeğinden sonra	4 hafta	-6 (Goldfarb vd., 2007)
36 taş yapıcı Kontrollü ve yüksek oksalat içerikli diyet	2×10^7 den $\times 10^9$ <i>Lactobacillus casei</i> ve 5×10^7 den $\times 10^9$ kob <i>Bifidobacterium breve</i>	Günün büyük yemeğinden sonra	2 hafta	-6 (Ferraz vd., 2009)
50 taş yapıcı olmayan sağlıklı, kontrollü ve düşük oksalatlı diyet	8×10^{11} kob 8 suş karışımı <i>B. infantis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> , ve <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	Günde bir kez günün son yemeğinden sonra, su içinde çözdürülmüş şekilde	4 hafta	-33 (Okombo ve Liebman 2010)

Federici vd., (2004) sütçülükte ve ilaç ürünlerinde yaygın olarak kullanılan insan kaynaklı 12 bakteri suşunun (*B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. lactis* ve *B. animalis*) oksalat degradesyon aktivitelerini belirlemiştir. Bu türlerin oksalat degradesyon oranlarının %1-60 arasında yüksek bir değişkenlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu araştırmacılar *B. lactis* DSM 10140 'ı oksalat degradesyonunda en aktif tür olarak belirlemişler ve beş günlük inkübasyon sonunda bu suşun oksalatın %60' ını degrades ettiğini rapor etmişlerdir (Federici vd., 2004).

2.10. Eksopolisakkaritler (EPS)

Laktik asit bakterileri de diğer birçok bakteri gibi farklı özelliklerde polisakkarit üretme yeteneğine sahiptirler. Bu polisakkaritler hücresel konumlarına göre sınıflandırılırlar. Hücre duvarının dışına salgılanan polisakkaritlere eksopolisakkarit ya da kısaca “EPS” adı verilir (Ruas-Madiedo vd.,2002). Hücresel lokasyonları, kimyasal ve fiziksel yapı özellikleri ile fonksiyonları esas alınarak mikrobiyal ekzopolisakkaritleri üç ana grup altında toplamak mümkündür. Bunlar; hücre yüzeyine kovalent bağlarla bağlı olan kapsüller polisakkaritler (CPS), hücre duvarının bir bileşeni olan polisakkaritler (LPS) ve dış çevreye salınan ya da hücre yüzeyi ile kovalent olmayan, gevşek bağlarla ilişkilendirilmiş polisakkaritlerdir (LAM) (Leigh ve Walker 1994). Kapsüller ve lipo polisakkaritler genellikle üretici bakterilerin patojenitesini belirleyen yapılar olduğundan, tıbbi açıdan büyük önem taşımaktadırlar. LAM ise gıda endüstrisinde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bakteri hücresinin yapısal özelliği dikkate alındığında bu polimerlerin tümü yapışkan (slime) kapsüller ya da mikrokapsüller polisakkaritler olarak adlandırılmıştır. Bakteri hücre duvarının üzerinde bulunan bakteriyel polisakkaritlerin tümünü ifade eden eksopolisakkarit (EPS) genel bir ad olarak önerilmiştir (Cerning, 1995).

EPS yapısında, şeker veya şeker türevlerinin dallı, tekrar eden birimlerinden oluşan uzun zincirli polisakkaritler bulunur. Bu şeker birimleri temel olarak farklı oranlardaki glikoz, galaktoz ve ramnoz'dur. Mikrobiyal kültürlerden elde edilen EPS'ler homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler olmak üzere iki grupta sınıflandırılabilir. Homopolisakkaritler yalnızca tek tip monosakkaritin (D-glukoz veya D-galaktoz) tekrar eden birimlerinden meydana gelirken, laktik asit bakterilerinden elde edilen heteropolisakkaritlerin tekrar eden birimleri arasında farklılıklar barındırmaktadır. (Welman ve Maddox, 2003)

Leukonostok ve oral streptokoklar tek bir şeker içeren (dekstran, α -glukanlar, fruktanlar) homopolisakkaritler üretirken, mandıra laktik asit bakterileri ve propiyonik asit bakterileri disakkaritten heptasakkarite kadar değişen ve farklı büyüklüklerdeki tekrarlayan birimleri içeren heteropolisakkaritler üretirler. Üretilen EPS'nin yüzlerce polimerizasyondan sonra moleküler ağırlığının $1-2 \times 10^6$ olduğu bildirilmiştir (Cerning, 1995). Laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS'ler düşük yağ oranına sahip, kaymaklı ve düşük süt oranlı yoğun yoğurtlar gibi yeni ve değeri artan ürünlerin gelişimi için teknolojik bakımdan önemli polimerlerdir. Fermentasyon koşulları (inkübasyon süresi ve sıcaklığı), besiyerinin bileşimi, üretilen polimeri ve şeker bileşimini etkilemektedir (Cerning, 1995).

Bakteriyel EPS'ler mikroorganizma tarafından enerji kaynağı olarak kullanılmayıp, hücrenin doğal çevresindeki kötü şartlar, fagositler ve protozoalar tarafından sindirim, faj saldırıları, antibiyotikler veya toksik bileşikler ve osmotik stres gibi faktörlere karşı koruyucu bir fonksiyonu olduğu öne sürülmektedir. EPS'ler ayrıca hücrenin tanınmasını sağlama, yüzeylere yapışma ve çeşitli ekosistemlerde kolonizasyonu kolaylaştıran biyofilmlerin oluşturulmasında da aktif rol oynar. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS'lerin oldukça karmaşık olan ekolojik fonksiyonları tam olarak belirlenememiştir ancak işlevlerinin farklı ortamlardaki hücre yapışması ve hücre koruması ile alakalı olduğu düşünülmektedir. Bu ekolojik fonksiyonlarının dışında laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS'ler çeşitli fermente süt ürünlerinin üretiminde de teknolojik öneme sahiplerdir (Ruas-Madiedo vd., 2002). EPS üreten laktik asit bakterisi suşları yoğurt, peynir, tereyağı, kefir ve geleneksel fermente süt ürünlerinin üretiminde starter kültür suşları olarak kullanılmaktadırlar (Huang vd., 2004). Starter kültürlerin EPS oluşturma yetenekleri, üretimde kullanıldıkları fermente süt ürünlerinin yapısal, aromatik ve reolojik özellikleri üzerinde belirgin bir şekilde etki etmektedir (Suomalainen vd., 2008). Ayrıca laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS'lerin antitümoral, bağışıklık sistemini düzenleyici ve kandaki kolesterol seviyelerini düşürücü etkilerinin olduğu da gösterilmiştir (Welman ve Maddox, 2003).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyaller

3.1.1 Materyal örnekleri

Çalışmada kullanılan sekiz *L. rhamnosus*, üç *L. fermentum*, üç *L. brevis* ve iki *L. helveticus* suşları Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür stoklarından temin edilmiştir. *Lactobacillus* sp. cinsine ait 16 bakteri suşu, TÜBİTAK/TBAG 107T486 kodlu ve “Türkiye’nin Geleneksel Peynirlerinde Bulunan Propiyonik Asit Bakteri Türlerinin Belirlenerek, Bazı Probiyotik ve Starter Özelliklerinin Araştırılması” isimli projede kullanılan Türkiye’nin geleneksel ev yapımı peynirlerinden izole edilmiş ve Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri fonu tarafından desteklenen FEF 05/2012-57 kodlu proje kapsamında 16S rRNA dizi analizlerine göre tanımlanmıştır. Çalışmada kullanılacak olan bu suşlar probiyotik bakteride olması gereken; asit üretimi, antimikrobiyal aktivite, antikolesteromik aktivite, otoagregasyon, koagregasyon ve antibiyotiklere direnç aktiviteleri çalışılmış olan 38 suş arasından en dirençli olanları seçilmiştir. Kullanılan toplam 16 adet stoğun temin edildikleri izolasyon kaynakları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1: *Lactobacillus* suşları ve izolasyon kaynakları

Suşlar	İzolasyon kaynağı
<i>L. rhamnosus</i> ACS5	Ayvalık Cunda Sepet Peyniri
<i>L. rhamnosus</i> BT2	Balıkesir Tulum Peyniri
<i>L. rhamnosus</i> BT8	Balıkesir Tulum Peyniri
<i>L. rhamnosus</i> BTM1	Balıkesir Tulum Peyniri
<i>L.rhamnosus</i> SMC2	Sepet Mihaliç Peyniri
<i>L. rhamnosus</i> SMC5	Sepet Mihaliç Peyniri
<i>L. rhamnosus</i> SOP1	Siirt Otlı Peyniri
<i>L. rhamnosus</i> KMP2	Balıkesir Kelle Mihaliç Peyniri

Çizelge 3.1 (devam): *Lactobacillus* suşları ve izolasyon kaynakları

Suşlar	İzolasyon kaynağı
<i>L. fermentum</i> SFP6	Sakarya Füme Peyniri
<i>L. fermentum</i> ECP22	Erzurum Çeçil peyniri
<i>L. fermentum</i> FKK2	Kırşehir Peyniri
<i>L. helveticus</i> KMP5	Balıkesir Kelle Mihaliç Peyniri
<i>L. helveticus</i> BT11	Balıkesir Tulum Peyniri
<i>L. brevis</i> KMP1	Balıkesir Kelle Mihaliç Peyniri
<i>L. brevis</i> BP8	Bursa Dil Peyniri

3.1.2. Araştırmada kullanılan besiyerleri

Araştırmada kullanılan *Lactobacillus* türlerinin aktifleştirilmesinde ve diğer deneylerin gerçekleştirilmesinde Man Rogosa ve Sharpe (MRS) sıvı ve katı besiyeri kullanılmıştır. Bu besiyerinin içeriği Çizelge 3.2’ de verilmiştir.

Çizelge 3.2: Man Rogosa ve Sharpe (MRS) sıvı ve katı besiyeri

Maddeler	g/L
Pepton	10,0
Beef Ekstrakt	8 ,0
Yeast 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*	15,0

*: Katı besiyeri için kullanılmıştır.

Besi ortamı bileşimi yukarıdaki miktarlarda tartılıp bir miktar distile suda eritilip, 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Deneyin amacına göre besiyerine %1,5 oranında agar ilave edilerek katı besiyeri hazırlanmıştır. Besi ortamının pH'sı 0,01 M HCl ve/veya 0,01 M NaOH kullanılarak $6,8 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmış ve 121°C'de 15 dk. otoklavda sterilize edilmiştir.

Çalışmada laktobasillerin sodyum oksalat dirençliliğini belirlemek için kullanılan MRS-ox sıvı besiyerinin içeriği Çizelge 3.3' te verilmiştir.

Çizelge 3.3: MRS- ox sıvı besiyeri içeriği

Maddeler	g/L veya mL/L
Trypton	20,0
Yeast Ekstrakt	10,0
Tween 80	2,0 mL
KH ₂ PO ₄	4,0
Sodyum asetat	10,0
Diamonyum hidrojen sitrat	4,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1
MnSO ₄	0,1
Glukoz*	40,0
Sodyum oksalat* (10 mM)	1,34

*: Sodyum oksalat çözeltisi için ayrıca hazırlanır.

Sodyum oksalat çözeltisi için kullanılacaklar haricindeki maddeler tartılıp bir miktar distile suda eritilip 1000 ml' ye tamamlanmıştır. 0,01 N HCl ve / veya 0,01 N NaOH ile pH $6,8 \pm 0,2$ ' ye ayarlanmıştır. Sonrasında 121 °C'de 15 dk. otoklavda steril edilmiştir.

Sodyum oksalat çözeltisi için gerekli olan sodyum oksalat ve glukoz ayrıca tartılıp distile su ile 1000 mL' ye tamamlanmıştır. 0,01 M HCl ve/ veya 0,01 M NaOH ile pH $6,8 \pm 0,2$ ' ye ayarlanmıştır. 0,45 µm' lik filtre kullanılarak sterilize edilmiştir. Otoklavda steril edilen sıvı besiyerinin içerisine bek alevi yanında 5' er mL sodyum oksalat çözeltisi ilave edilerek MRS-ox sıvı besiyeri hazırlanmıştır.

Araştırmada dilüsyon için kullanılan serum fizyolojik çözeltisi için 0,875 g sodyum

klorit tartılıp 100 mL' ye distile su ile tamamlanmıştır. Dilüsyon çözeltisi 121 °C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir.

3.1.3. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları

Laktik asit bakterilerinin geliştirilmesi ve aktifleştirilmesinde MRS besiyeri kullanılmıştır. Genellikle deneysel çalışmalar bakterilerin $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ' de 24 saatlik aerobik inkübasyonu ile geliştirilmiştir. Bazı deneylerde iki kere bazılarında üç kere aktifleştirilmiş kültürler kullanılmıştır. Deneysel çalışmalar boyunca her bir aktifleştirme sonrasında, bir diğer aktifleştirmeye geçmeden önce gram boyama tekniğiyle mikroskopik incelemeyle kontaminasyon riski değerlendirilmiş ve kontrolleri sağlanmıştır. Laktik asit bakterilerinin sodyum oksalat direnci ve sodyum oksalatlı ortamdaki EPS'sinin ölçüldüğü deneylerde kültürler anaerobik jar içerisinde $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ' de 72 saat, ortama %10 CO₂ salınımını sağlayan anaerobik kit kullanılarak (Oxoid, Anaerobic gas generating kit) geliştirilmiştir. Laktik asit bakterilerinin sodyum oksalat degradasyonunun belirlendiği deneylerde ise kültürler anaerobik jar içerisinde $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ' de 48 saat inkübe edilmiştir.

3.1.4. Test bakterileri

L.delbrueckii DSM 20074, *L. acidophilus* NCFM test bakterisi olarak kullanılmıştır. *L. delbrueckii* DSM 20074 ve *L. acidophilus* NCFM ise MRS sıvı besi ortamında 24 saat inkübe edilerek 37°C ' de aktifleştirilmiştir. Test bakterilerinin temin edildiği kaynak Çizelge 3.4' de verilmiştir. Çalışmada *L. acidophilus* NCFM suşu oksalat degradasyon deneylerinde pozitif kontrol (Azcarate-Peril vd., 2006), *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* DSM 20074 suşu ise negatif kontrol (Turroni vd., 2007) olarak kullanılmıştır.

Çizelge 3.4: Test bakterileri ve temin edildiği kaynak

Bakteri	Oksalat Degradasyonu
<i>L. delbrueckii</i> DSM 20074*	Negatif kontrol
<i>L. acidophilus</i> NCFM*	Pozitif kontrol

*: Dr. Silvia Turroni, Department of Pharmaceutical Sciences, CIRB-Center of Biotechnology, University of Bologna, Bologna, Italy.

3.2. Metot

3.2.1. Bakterilerin muhafazası

400 µL gliserol, kapaklı cryo tüplerine ilave edilerek, 121 °C’de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir. Bakteriler uygun sıvı besiyerinde iki kez ard arda aktifleştirilip, aktif kültürlerden 600 µL gliserol içeren steril tüplere paralelli olarak aktarılmıştır. Suşlar derin dondurucuda -80 °C’ de depolanarak muhafaza edilmiştir. Muhafazaya alınan stoklar altı ayda bir yenilenmiştir.

3.2.2. Laktobasillerin asit ve safraya toleransının belirlenmesi

Bakterilerin bağırsağa ulaşarak oksalat degradasyon aktivitelerini gösterebilmeleri için midenin asitli ortamına ve bağırsaktaki safraya dirençli olmaları gerekmektedir. *Lactobacillus* sp. suşlarının asit ve safraya dirençliliklerini belirlemek için, 0,1 ve 1 M HCl kullanılarak pH 2 ve 6,8 (kontrol)’e ayarlanan MRS sıvı besi ortamları ve %0,3 safra (Bile bovine, Sigma-Aldrich) içeren MRS sıvı besi ortamları kullanılmıştır. Suşların üç kez ard arda MRS besi ortamında (pH:6,8) aktifleştirilmiş kültürleri 4000 rpm’de 10 dk. santrifüj (Nettich Mikro 200) işlemine tabi tutulup serum fizyolojik (%0,875) ile 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Laktobasil suşlarından pH:2 ve 6,8 ile %0,3 safralı MRS besi ortamlarına %2 oranında ekilmiş ve ekimden sonra t=0 anındaki canlılıklarını belirlemek için spektrofotometrede (Thermo Grenesys uv-vs) 600 nm’de OD ölçümü yapılmıştır. Ayrıca, MRS agar besi ortamına ekimi yapılarak 37±1 °C’de 24 saat inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. pH: 2 ve 6,8 ile %0,3 safralı MRS besi ortamlarına ekimi yapılan kültürlerin t=2 anındaki canlılıklarını belirlemek için 37±1 °C’de 2 saat anaerobik inkübasyonu (Oxoid, Anaerobic gas generating kit) gerçekleştirilmiştir. Inkübasyon sonunda hücre konsantrasyonu spektrofotometrede 600 nm’de ölçülmüş, canlılık sayımı için MRS agara yayma ekimleri gerçekleştirilmiş ve plaklar 37±1 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmış, son kültür OD’leri spektrofotometrede 600 nm’de ölçülmüştür (Huang ve Adams 2004, Suomalainen vd., 2008).

Ana stok: 0,5 gram safra 10 mL distile suda çözülerek 0,45 µm’ lik filtre ile sterilize edilmiştir.

İzolatların üç kez ard arda aktifleştirilmiş kültürleri 4000 rpm de 10 dk santrifüj işlemine tabi tutulup, serum fizyolojik ile 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Laktobasil izolatlarından safra eklenmiş ve safra eklenmemiş (kontrol) MRS besiyerine %2 oranında ekilmiş ve ekimden sonra spektrofotometrede 600 nm’ de OD ölçümü yapılmış ayrıca canlılık sayımı için MRS agar besiortamına ekimi yapıp $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ’ de 24 saat aerobik inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Safralı ve safrasız MRS sıvı besiortamına ekimi yapılan kültürler anaerobik kitle beraber jara yerleştirilmiş ve $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ’ de 2 saat inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Inkübasyon sonunda hücre konsantrasyonu spektrofotometrede 600 nm’ de ölçülmüş ve canlılık sayımı için MRS agara yayma ekimleri gerçekleştirilmiştir. İzolatların ayrıca $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ’ de 24 saat aerobik inkübasyonu sonucunda da hücre konsantrasyonları spektrofotometrede 600 nm’ de ölçülmüştür.

Elde edilen OD değerleri ve hücre sayımı kontrol grubu pH 6,8 ayarlı olan MRS besiyerinde gelişen kültürün yoğunluğu ve hücre sayısı ile karşılaştırılarak pH:2 ve %0,3 lük safralı besiyerinin laktobasil suşları üzerindeki inhibisyon değeri hesaplanmıştır (Huang ve Adams, 2004).

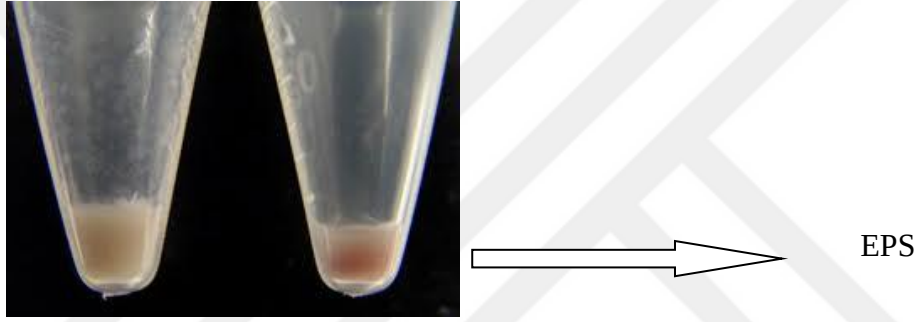
3.2.3. Laktobasillerin eksopolisakkarit (EPS) üretimlerinin belirlenmesi

Lactobacillus suşlarının EPS üretimleri; asit, safra ve oksalata direnç sağlayıcı ve probiyotik önemi nedeniyle araştırılmıştır. EPS izolasyonunda, izole edilen EPS’deki protein kalıntısını en alt seviye indirmek için birçok metot denenmiş, *Lactobacillus* suşlarından EPS izolasyonunda Li vd., (2012, 2014) ve Kšoňzeková vd., (2016)’den modifiye edilen metot kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan laktobasiller $37\pm 1^\circ\text{C}$ ’de iki kez art arda MRS sıvı besi ortamında aktifleştirilmiştir. Aktif kültürlerin optikal yoğunlukları spektrofotometrede 600 nm’de $0,6\pm 0,2$ ’ye ayarlanmıştır. OD değerleri ayarlanan kültürlerden 5 mL’lik MRS besi ortamına üçer paralelli olarak %2 oranında inoküle edilerek, $37\pm 1^\circ\text{C}$ ’de aerobik koşullarda 24 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyonu tamamlayan tüm suşlardan EPS izolasyonu ve izole edilen EPS’deki protein miktarını tespit etmek için örnekler alınmıştır.

EPS izolasyonu için inkübasyon sonunda örneklerden 1 mL’lik miktarlar eppendorf tüplerine (Isolab) alınarak, 100°C ’de 10-15 dk. kaynatıldıktan sonra oda sıcaklığına gelinceye kadar soğutulmuştur. Bu aşamada EPS’yi hidrolize eden enzimleri inaktivasyonu ve hücreye bağlı bulunan EPS ‘nin ayrılması sağlanmıştır. Oda sıcaklığına gelen kültürlerle 12000 rpm ‘de 15 dk süre ile santrifüj uygulanmıştır. Santrifüj sonunda süpernatantlar temiz eppendorfa alınarak üzerine 1,7 µl TCA

(Trikloroasetik asit) (%85 w / v) eklenip, 4 ° C' de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda protein ve peptidler çöktürülmesi için örnekler 12000 rpm' de 30 dk. 4 ° C' de santrifüjlenmiştir. Santrifüjlenen yaklaşık 1 ml olan örnekler bu aşamadan sonra 500 µl şeklinde 2 paralele ayrılarak, üzerine 1 örnek / 3 alkol olacak şekilde soğutulmuş saf (absolute) alkol eklendikten sonra güçlü bir şekilde vortekslenir ve 4 ° C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonrasında 12000 rpm' de 30 dk santrifüjlenen örneklerin EPS –protein kompleksi şeklinde çöktürülmesi sağlanır. Elde edilen pellet üzerindeki alkol dikkatli bir şekilde döküldükten sonra 500 µl soğutulmuş alkol ilave edilip vortekslenmeden yıkama işlemi yapıp alkol dökülür. Alkol döküldükten sonra şekil 3.1. deki gibi pelletin tam olarak kurumasi sağlanır.



Şekil 3.1: EPS yapının pellet içerisinde makro olarak gözlemlenmesi

İki paralele ayrılan örnekler 500 µl ultra saf su ilave edilerek vorteksledikten ve pellet tam olarak çözündükten sonra steril bir ependorfa tekrar toplanarak – 40 ° C' de kaldırılır. İzole edilen EPS'nin fenol sülfirik asit ile belirlenmesi için örnekler oda sıcaklığına geldikten sonra kullanılır.

Fenol-sülfirik asit metodu;

Oda sıcaklığına gelen örneklerin üzerine 0,5 mL fenol (Sigma) ve 5 mL saf sülfirik asit eklenerek, 10 dk. oda sıcaklığında bekletildikten sonra iyice karıştırılmıştır. Karıştırılan örnekler 30 ° C' de 15-20 dk. bekletildikten sonra, optik yoğunlukları 490 nm' de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

EPS üretim miktarlarını belirlemek için 5–100 mg/L arasında değişen oranlarda glukoz kullanılarak standart bir eğri çıkarılmıştır. Standart 1 ml steril saf suda çözülerek hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki glukoz esas alınarak, fenol sülfirik asit metodu ile çıkarılmıştır (Dubois vd, 1956). Bu standarda göre örneklerin EPS miktarları mg/l olarak belirlenmiştir (Campieri vd., 2001).

3.2.4 Protein Deneyi

Lactobacillus sp.'lerin EPS üretiminin belirlenmesi çalışmasında EPS' ye protein bulaşmasını en aza indirmek için izolasyon metodu Li vd., (2012, 2014, 2016) ve Kšoňzeková vd., (2016)'ye göre modifiye edilmiştir. *Lactobacillus* sp. suşlarından izole edilen EPS'deki protein miktarı (Bradford, 1976) metoduna göre Protein Assay Bradford kiti kullanılarak belirlenmiştir. Ölçülen protein miktarı izole edilen EPS'den çıkarılarak *Lactobacillus* sp. suşlarının net EPS üretimleri mg/L olarak tespit edilmiştir.

Standart hazırlaması

- a) Dört farklı ependrof tüplerine sırasıyla 5 µL, 10 µL, 15 µL ve 20 µL 0.5 M NaCl mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin) solüsyonundan ilave edilir ardından 0.15 N NaCl ile her biri 100 µL' ye tamamlanır (Blank: 100 µL 0.15 M NaCl + 1 mL Bradford reagent).
- b) Her bir ependrof tüpüne 1 ml Bradford reagent ilave edildikten sonra 2dk. vortekslenir ve oda sıcaklığında bekletilir.
- c) 595 nm dalga boyunda örneklerin optikal yoğunlukları (OD) değerleri ölçülür. Elde edilen OD değerleri ile standart grafiği oluşturulur.

Örneklerin toplam hücre proteinlerinin belirlenmesi

- a) İzole edilen EPS örneklerinden 100 µL alınmış ve üzerine 100 µL 0,15 N NaCl ilave edilmiştir.
- b) Örneklerin üzerine 1 ml Bradford reagent ilave edildikten sonra, iyice karıştırılmıştır.
- c) Örnekler 10 dk. oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletilmiştir.
- d) Örneklerin optikal yoğunlukları 595 nm dalga boyundaki spektrofotometrede ölçülmüştür. Elde edilen OD değerleri standart grafik ile karşılaştırılarak protein miktarları tespit edilmiştir.

Lactobacillus ssp. suşlarının farklı sodyum benzoat konsantrasyonu içeren ortamlarda toplam hücre protein miktarını belirlemek amacıyla; aynı test 0.5- 90 mg/ml konsantrasyonlarında sodyum benzoatlı ortamda geliştirilmiş laktobasil suşlarına uygulanmıştır.

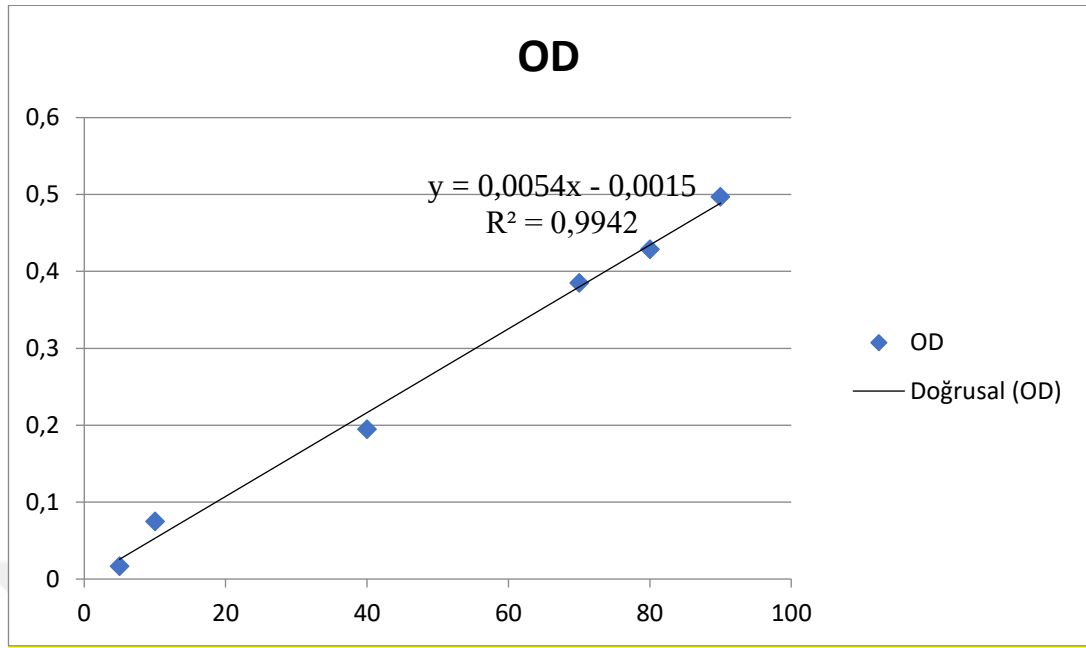
3.2.5 Laktobasillerin sodyum oksalata dirençliliklerinin belirlenmesi

Lactobacillus suşlarının oksalat degradasyon çalışmalarından önce oksalatın toksik etkisinin olup olmadığını veya karbon kaynağı olarak kullanılabilirliklerini test etmek üzere 20 mM sodyum oksalat içeren MRS besi ortamında canlılıkları log kob/ml olarak araştırılmıştır. *Lactobacillus* suşları $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de iki kez ard arda MRS sıvı besi ortamında aktifleştirilmiştir. Aktif kültürlerden 20 mM MRS-ox sıvı besi ortamına üçer paralelli olarak %2 oranında inoküle edilerek, $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 72 saat inkübe edilmiştir. Son kültürlerin pH değeri belirlenerek OD'si de spektrofotometrede 600 nm'de ölçülmüş, aktif kültürlerin seri dilüsyonları hazırlanmış ve sodyum oksalatın laktobasiller üzerindeki inhibitörük etkisini belirlemek üzere MRS agar ortamlarına ekimi gerçekleştirilmiştir. Ekim yapılan plaklar $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası koloniler sayılıp laktobasillerin canlılıkları log kob/mL olarak tespit edilmiş ve kontrol grubu (sodyum oksalatsız MRS besiyerinde gelişen kültürlerin OD değeri ve hücre sayısı) ile karşılaştırılmıştır (Murphy vd., 2009).

3.2.6. Laktobasillerin sodyum oksalatlı ortamdaki eksopolisakkarit (EPS) üretimlerinin belirlenmesi

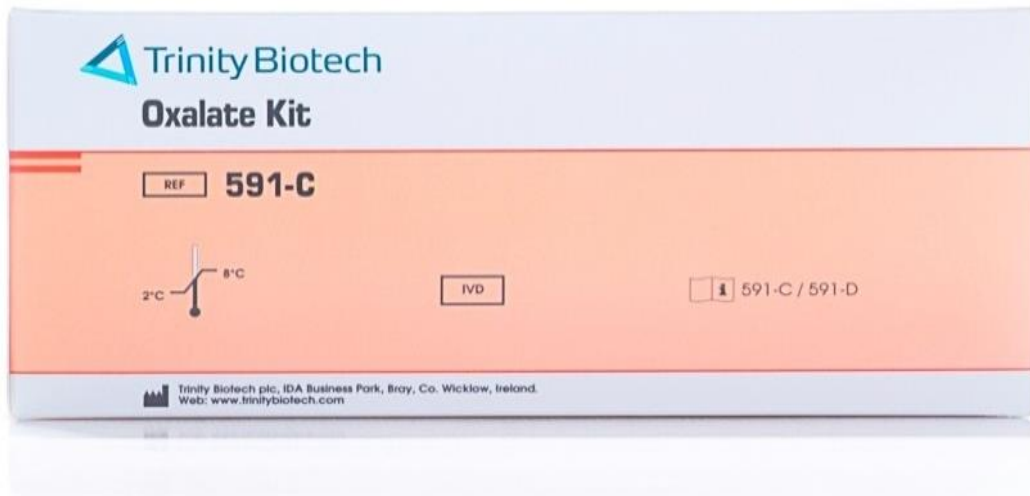
Lactobacillus sp. suşlarının oksalat degradasyon çalışmalarından önce oksalatın EPS üretimi üzerindeki etkisini belirlemek için 20 mM sodyum oksalat içeren MRS besi ortamı kullanılmıştır. Laktobasil suşları $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ' de iki kez ard arda MRS sıvı besi ortamında aktifleştirilmiştir. Aktif kültürlerden 20 mM sodyum oksalat içeren MRS sıvı besi ortamına (MRS-ox) üçer paralelli olarak %5 oranında inoküle edilerek $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ' de 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında son kültürün optik yoğunluğu spektrofotometrede 600 nm' de ölçülmüştür ve son kültürün pH değeri de belirlenmiştir. İnkübasyondan sonra 20 mM MRS-ox ortamında üretilen kültürlerin EPS izolasyonu 3.2.3.' te anlatıldığı gibi Li vd., (2012, 2014) ve Kšoňzeková vd., (2016)'den modifiye edilen metoda göre yapılmıştır. 20 mM MRS-ox ortamındaki EPS üretim miktarları da glukoz standardı kullanılarak fenol sülfürik asit metodu ile mg/L olarak belirlenmiştir. İzole edilen EPS'deki protein kalıntısı 3.2.4 'de anlatılan metoda göre belirlenmiş izole edilen EPS miktarından çıkarılarak net EPS miktarı mg/L olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.5: EPS miktar tayini için oluşturulan glukoz standartı

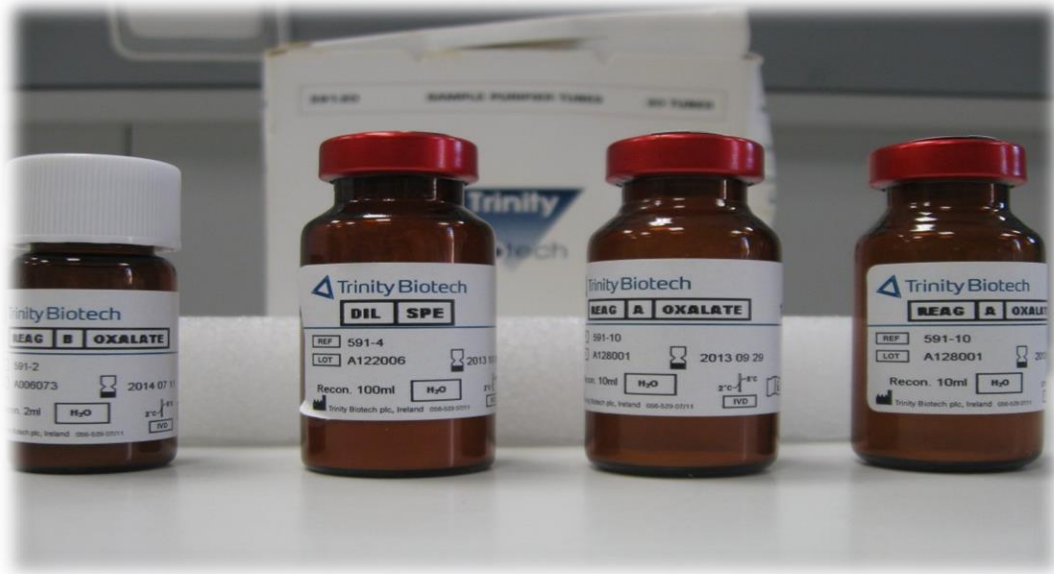


3.2.7. Laktobasillerin 10 mM sodyum oksalatı degradesyonunun belirlenmesi

Trinity Biotech Oksalat Kiti (591-C ve D) (Şekil 3.2 ve Şekil 3.3) ile enzimatik olarak belirlenmiştir. Deneyler sırasında Prof. Dr. Silvia Turrone (Department of Pharmaceutical Sciences University of Bologna, Italy)' den temin edilen oksalat degradesyonu pozitif *L. acidophilus* NCFM (Azcarate-Peril vd., 2006) ve oksalat degradesyonu negatif *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20074 (Turrone vd.,2007) kontrol grubu olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.2: Trinity Biotech Oksalat Kiti



Şekil 3.3: Oksalat kit içeriği (Reagent A, Reagent B, Sample dilüent stok durumları)

2 mM MRS-ox'ta gelişme

Oksalat degradasyonu deneyi için *Lactobacillus* suşlarının oksalatlı ortama adaptasyonlarını ve aktivasyonlarını sağlamak amacıyla, aktif kültürlerden 2 mM MRS-ox besiyerine %2 oranında 48 saat arayla art arda iki kez inokülasyon yapılarak $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de anaerobik olarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kültürlerden seri dilüsyonlar hazırlanmış ve MRS katı besiyerine ekimleri yapılarak 2 mM MRS-ox ortamının laktobasillerin canlılıklarına etkisi belirlenmiştir. 2 mM MRS-ox ortamında geliştirilen kültürlerin son kültür pH değeri belirlenerek OD'si de spektrofotometrede 600 nm'de ölçülmüştür. İnkübasyon sonrası koloniler sayılarak suşların canlılıkları log kob/mL olarak tespit edilmiştir.

10 mM MRS-ox'ta gelişme

2 mM MRS-ox ortamında aktifleştirilen kültürlerden 10 mM sodyum oksalat içeren MRS sıvı besi ortamına %2 oranında inoküle edilerek $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 48 saat anaerobik olarak inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında kültürlerin seri dilüsyonları hazırlanıp, MRS katı besiyerine ekimleri yapılarak 10 mM MRS-ox ortamının laktobasillerin canlılıklarına etkisi belirlenmiştir. 10 mM MRS-ox ortamında geliştirilen kültürlerin son kültür OD'leri spektrofotometrede 600 nm'de ölçülmüş ve pH değerleri de belirlenmiştir. İnkübasyon sonrası koloniler sayılarak suşların canlılıkları log kob/mL olarak tespit edilmiştir.

10 mM sodyum oksalat degradasyonu

1. 10 mM sodyum oksalatlı ortamda gelişen kültürler 4000 rpm’de 10 dk. santrifüj edilerek supernatant ve pelletin ayrımı sağlanmıştır.
2. Aktifleştirme için, supernatant oksalat kitinde bulunan sample purifier (içinde aktif karbon olan) tüplerine (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5) aktarılmıştır (kontrol grubu olarak ekim yapılmamış MRS-ox sample purifier tüpe aktarılmıştır). Vorteks ile purifier tüpteki charcoal tamamen supernatant ile karışana kadar vortekslenmiştir.



Şekil 3.4: Trinity Biotech Sample Purifier Tüpleri



Şekil 3.5: Sample purifier tüpleri (içinde aktif karbon olan tüpler)

3. Sample purifier tüpleri vorteksleme işleminden sonra 5 dk. oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyondan sonra örnekler 4000 rpm’de 10 dk. santrifüj edilmiş, supernatanttan

500 µL eppendorfa alınmış, üzerine 500 µL sample dilüent eklenerek sample supernatant elde edilmiştir.

5. Sample supernatantın pH değeri ölçülerek kaydedilmiştir.

6. Spektrofotometre küvetlerine 900 µL saf su + 100 µL Reagent A + 5 µL sample supernatant + 10 µL Reagent B eklenmiş ve 5 dk. karanlıkta bekletilmiştir, körv ise sample supernatant yerine 5 µL saf su eklenerek örnek gibi hazırlanmıştır (Şekil 3.6).

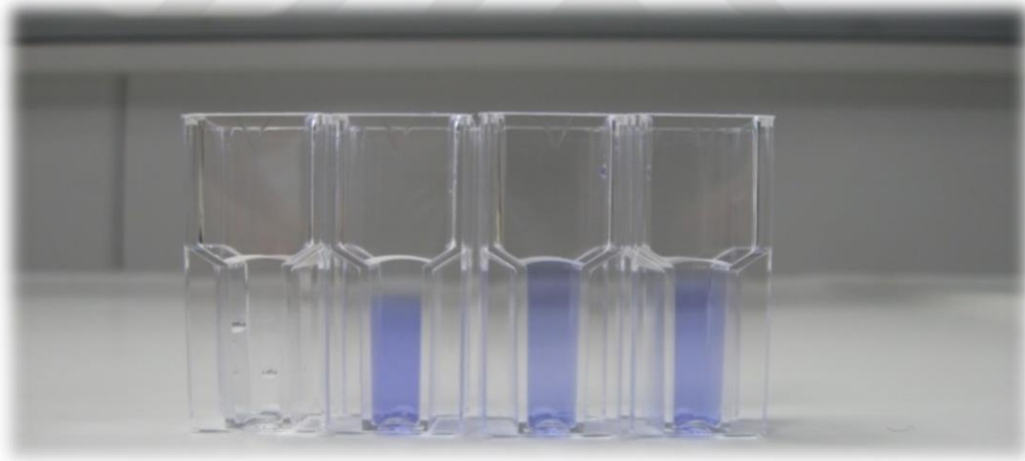
7. Karanlıkta gerçekleşen 5 dk. inkübasyonun sonunda 590 nm’de örneklerin OD ölçümü yapılmıştır. OD değerleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak suşların oksalat degradasyonları yüzde degradasyon olarak tespit edilmiştir (Turrone vd., 2010).

Reagent A: MBTH; 3-metil-2-benzothiazolinone hydrazone ve DMAB; 3-(dimetilamino) benzoik asit.

Reagent B: Oksalat oksidaz ve peroksidaz enzimleri

Sample dilüent: 10 mmol/L ve tampon pH 7,6

Sample purifier: Aktif karbon

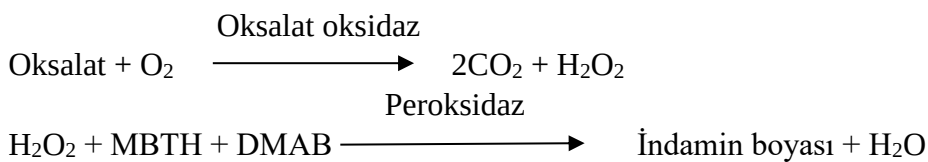


Şekil 3.6: A ve B reaktifleri eklenip OD’si ölçülen örnekler

$$\% \text{ Oksalat Degradasyonu} = \left[\frac{OD1 - OD2}{OD1} \right] \times 100$$

OD1: Kontrol (boş 10 mM MRS-ox)

OD2: Suşların 10 mM MRS-ox degradasyonları



3.2.8. Laktobasillerin 20 mM sodyum oksalatı degradasyonunun belirlenmesi

Gastrointestinal sistem koşullarına dirençli, EPS üretimi yüksek, oksalatlı ortama direnç gösteren ve 10 mM sodyum oksalatı degrade eden suşlar (*L. rhamnosus* ACS5, SMC5, *L. brevis* KMP1, BP8 ve *L. helveticus* KMP5, BT11) ile gastrointestinal sistem koşullarına dirençsiz ve diğer özellikler bakımından düşük performans gösteren bir suş (*L. rhamnosus* BT8) 10 mM sodyum oksalat yerine 20 mM sodyum oksalat içeren besi ortamlarına uygulanarak suşların yüksek oksalatlı ortamdaki degradasyonları bölüm 3.2.8’de anlatıldığı gibi test edilerek suşların yüksek oksalatlı ortamdaki degradasyonları belirlenmiştir.

3.2.9. İstatistiksel analizler

1. Tüm çalışmalarda 2 ya da 3 tekerrür sonucunda elde edilen 3 farklı paralelin ortalaması verilmiştir. İstatistiksel analizlerde SPSS 22,0 WindowsTM programı kullanılmıştır.
2. One-Way Anova programı ile deneylerden elde edilen ortalama sonuçlar arasındaki farkın önemli olup olmadığı araştırılmıştır. Ayrıca Pearson korelasyonu ile farklı deney sonuçları arasındaki ilişkinin derecesi ölçülmüştür.
3. EPS üretim kapasitesi ile oksalat dirençliliği ve oksalat degradasyonu arasındaki ilişkinin önemi ve EPS üretimi ile gastrointestinal sistem koşullarına direnç arasındaki ilişkiler belirlenmiştir.

4.DENEYSEL BULGULAR

4.1. Laktobasillerin Asit ve Safraya Toleransları

Çalışmada *L. rhamnosus* (8), *L. fermentum* (3), *L. brevis* (3) ve *L. helveticus* (2) türlerine ait 16 laktobasil suşu ile 2 test bakterisinin (*L. delbrueckii* DSM 20074, *L. acidophilus* NCFM) pH 2 değerine ve %0,3 konsantrasyonundaki safraya dirençliliği Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir. pH 2’ye inokülasyon yapıldıktan sonra iki saat sonraki (t=2) hücre yoğunlukları (OD), inokülasyon yapıldığı andaki (t=0) hücre yoğunluğuna göre SOP1, ECP22, KMP5 ve BP8 suşlarında değişim gözlenmezken; ACS5, BT2, BT8, BTM1, SMC2, SMC5, KMP2, SFP6, FKK2, BT11, KMP1, suşlarında ise artış göstermiştir. Test bakterilerinden olan DSM 20074 ve NCFM suşlarının hücre yoğunluklarında bir değişiklik tespit edilmemiştir.

pH: 2’ ye inokülasyon yapıldıktan iki saat sonraki (t=2) canlılık sayımı, inokülasyon yapıldığı andaki (t=0) canlılık sayımına göre bütün suşlarda azalma göstermiştir. İkinci saatte yapılan canlılık sayımı deneyinde BT2, SMC2, SOP1, KMP, SFP6, FKK2, KIR2 ve DSM suşlarında hiçbir kolonizasyon saptanmamıştır.

pH: 2’ye en yüksek direnç gösteren suşlar *L. rhamnosus* ACS5 ve *L. fermentum* ECP22 olarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan 16 *Lactobacillus* suşunun %44’ü pH 2 ortamında 2 saatlik inkübasyondan sonra canlılığını kaybederken, %56’sında 2,59-5,21 log kob/ml oranında canlılık belirlenmiştir. Laktobasil türleri arasında karşılaştırma yapıldığında *L. rhamnosus* suşlarının %50’si, *L. fermentum* suşlarının %33’ü ve *L. brevis* suşlarının ise %67’si pH:2’de canlılıklarını sürdürmüştür. *L.helveticus* suşları ise bu çalışmada pH:2’ye dirençli suşlar olarak belirlenmiştir.

%0,3 oranında safra içeren besi ortamına inokülasyon yapıldıktan iki saat sonraki (t=2) hücre yoğunlukları, inokülasyon yapıldığı andaki (t=0) hücre yoğunluğuna göre genel olarak artış göstermiştir. Sadece KMP5 suşunun hücre yoğunluğunda azalma gözlenmiştir.

%0,3 oranında safra içeren besi ortamına inokülasyon yapıldıktan iki saat sonraki (t=2) canlılık sayımı, inokülasyon yapıldığı andaki (t=0) canlılık sayımına göre BT8, BTM1, SMC2, FKK2, BP8 ve KIR2 suşlarında azalma gözlenirken, ACS5, BT2, SMC5,

SOP1, KMP2, SFP6, ECP22, KMP5, BT11, KMP1, DSM 20074 ve NCFM suşlarında ise artış gözlenmiştir. %0,3 oranında safra içeren besi ortamına inokülasyon yapıldıktan iki saat sonraki (t=2) canlılık sayımı, inokülasyon yapıldığı andaki (t=0) canlılık sayımına göre BT8, BTM1, SMC2, FKK2, BP8 ve KIR2 suşlarında azalma gözlenirken, ACS5, BT2, SMC5, SOP1, KMP2, SFP6, ECP22, KMP5, BT11, KMP1, DSM 20074 ve NCFM suşlarında ise artış gözlenmiştir.

%0,3 safralı ortama en yüksek direnç *L. helveticus* KMP5 suşunda belirlenirken, en düşük direnç *L. brevis* BP8 suşunda tespit edilmiştir. Genel olarak tüm suşların safralı besi ortamında iki saat boyunca canlılıklarını koruyabildikleri ve direnç gösterdikleri belirlenmiştir.

Çizelge 4.1: *Lactobacillus* spp. suşlarının asit ve safra direnci (2 h' lik anaerobik inkübasyon kob/ml)

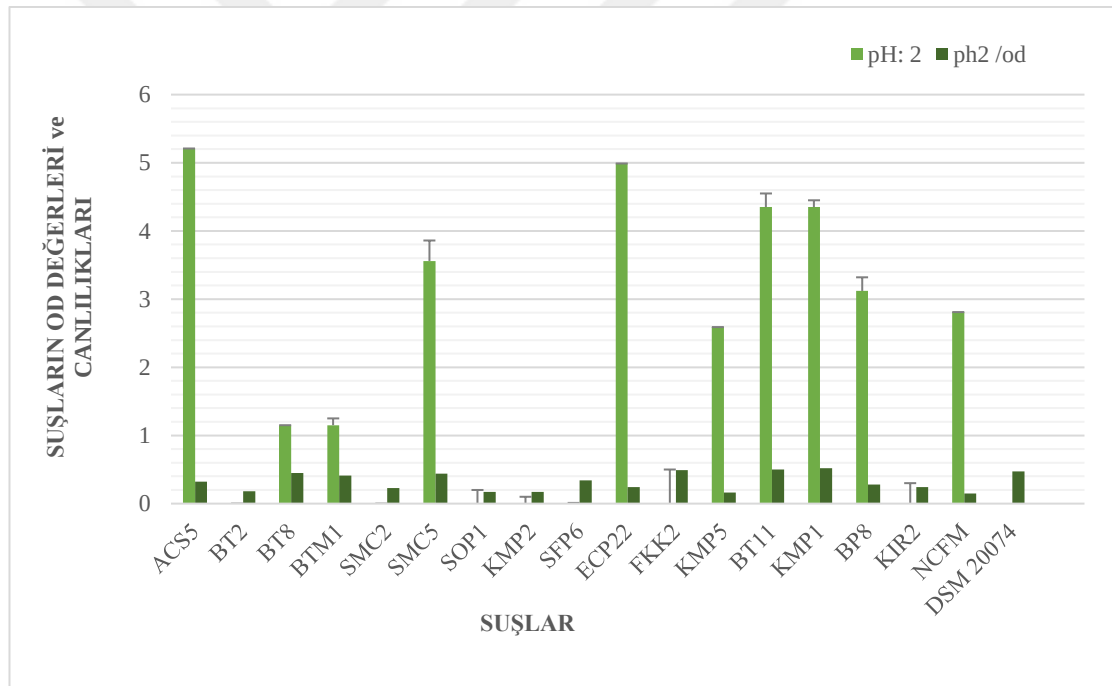
Suşlar		t=0		t=2	
		OD	Kob/mL	OD	Kob/ml
<i>L. rhamnosus</i> ACS5	pH2	0,22±0,02	6,62±0,06	0,32±0,10	5,21±0,16
	Safra %0.3	0,22±0,02	7,94±0,15	0,29±0,02	7,79±0,25
	pH 6.8	0,32±0,10	7,90±0,03	1,19±0,06	7,83±0,23
<i>L. rhamnosus</i> BT2	pH2	0,14±0,01	8,21±0,02	0,18±0,02	0
	Safra %0.3	0,50±0,08	7,91±0,11	0,93±0,19	8,04±0,18
	pH 6.8	1,81±0,05	7,88±0,13	2,11±0,00	8,42±0,07
<i>L. rhamnosus</i> BT8	pH2	0,43±0,02	5,03±0,01	0,45±0,02	1,15±1,6
	Safra %0.3	0,49±0,01	8,25±0,10	0,66±0,03	8,12±0,07
	pH 6.8	0,40±0,05	8,23±0,15	0,73±0,09	8,36±0,09
<i>L. rhamnosus</i> BTM1	pH2	0,39±0,00	4,99±0,02	0,41±0,00	1,15±1,6
	Safra %0.3	0,47±0,01	8,16±0,04	0,64±0,01	8,05±0,13
	pH 6.8	0,26±0,12	8,15±0,09	0,70±0,04	7,98±0,06
<i>L. rhamnosus</i> SMÇ2	pH2	0,21±0,01	0,21±0,01	0,23±0,03	0
	Safra %0.3	0,16±0,00	8,00±0,01	0,25±0,02	7,90±0,03
	pH 6.8	0,19±0,01	8,04±0,02	0,46±0,06	8,09±0,07
<i>L. rhamnosus</i> SMÇ5	pH2	0,38±0,06	7,39±0,24	0,44±0,02	3,56±0,22
	Safra %0.3	0,39±0,01	8,10±0,01	0,71±0,05	8,50±0,20
	pH 6.8	0,41±0,01	7,63±0,74	1,30±0,01	8,65±0,08
<i>L. rhamnosus</i> SOP1	pH2	0,16±0,02	6,95±0,20	0,17±0,02	0
	Safra %0.3	0,20±0,00	8,05±0,10	0,30±0,06	8,15±0,04
	pH 6.8	0,20±0,01	8,07±0,19	0,35±0,09	8,12±0,13

Çizelge 4.1 (devam): *Lactobacillus* spp. suşlarının asit ve safra direnci (2 h' lik anaerobik inkübasyon kob/ml)

<i>L. rhamnosus</i> KMP2	pH2	0,13±0,02	5,09±0,95	0,17±0,01	0
	Safra %0.3	0,14±0,01	8,24±0,15	0,23±0,06	8,52±0,15
	pH 6.8	0,11±0,00	8,22±0,18	0,68±0,00	8,50±0,23
<i>L. fermentum</i> SFP6	pH2	0,32±0,07	4,16±0,09	0,34±0,07	0
	Safra %0.3	0,35±0,04	6,57±0,07	0,43±0,05	7,07±0,01
	pH 6.8	0,49±0,20	6,01±0,09	0,55±0,16	7,01±0,03
<i>L. fermentum</i> ECP22	pH2	0,24±0,06	6,83±0,30	0,24±0,04	4,99±0,32
	Safra %0.3	0,19±0,08	7,87±0,18	0,36±0,11	8,16±0,06
	pH 6.8	0,17±0,02	8,17±0,08	1,13±0,32	8,44±0,34
<i>L. fermentum</i> FKK2	pH2	0,45±0,06	6,53±0,02	0,49±0,06	0
	Safra %0.3	0,33±0,05	8,45±0,14	0,39±0,07	8,42±0,16
	pH 6.8	0,40±0,04	8,38±0,10	0,43±0,06	8,31±0,04
<i>L. helveticus</i> KMP5	pH2	0,16±0,03	6,54±0,02	0,16±0,02	2,59±0,16
	Safra %0.3	0,93±0,03	8,55±0,01	0,23±0,02	8,57±0,03
	pH 6.8	0,16±0,02	8,44±0,13	0,26±0,04	8,48±0,01
<i>L. helveticus</i> BT11	pH2	0,46±0,08	6,37±0,23	0,50±0,06	4,35±0,04
	Safra %0.3	0,39±0,06	8,26±0,16	0,63±0,06	8,43±0,02
	pH 6.8	0,37±0,10	8,57±0,08	0,84±0,08	8,55±0,08
<i>L. brevis</i> KMP1	pH2	0,38±0,12	5,90±0,06	0,52±0,05	4,35±0,11
	Safra %0.3	0,44±0,05	8,23±0,13	0,65±0,05	8,39±0,05
	pH 6.8	0,37±0,10	8,57±0,08	0,84±0,08	8,55±0,08
<i>L. brevis</i> BP8	pH2	0,27±0,14	6,2±0,07	0,28±0,13	3,12±0,11
	Safra %0.3	0,27±0,13	6,14±0,34	0,53±0,23	5,99±0,12
	pH 6.8	0,38±0,21	6,12±0,39	0,82±0,26	6,31±0,15
<i>L. brevis</i> KIR2	pH2	0,25±0,03	4,17±0,13	0,24±0,04	0
	Safra %0.3	0,24±0,17	6,67±0,06	0,49±0,00	6,43±0,09
	pH 6.8	0,36±0,05	6,3±0,21	0,50±0,09	6,98±0,08
<i>L. delbrueckii</i> DSM 20074	pH2	0,15±0,00	6,98±0,01	0,15±0,00	0
	Safra %0.3	0,57±0,06	7,95±0,06	0,95±0,02	8,04±0,18
	pH 6.8	1,84±0,02	7,93±0,01	2,13±0,00	8,37±0,06
<i>L. acidophilus</i> NCFM	pH2	0,46±0,09	4,11±0,49	0,47±0,08	2,81±0,72
	Safra %0.3	0,27±0,13	4,91±0,18	0,57±0,08	5,94±0,14
	pH 6.8	0,41±0,01	6,05±0,38	0,83±0,02	6,67±0,21

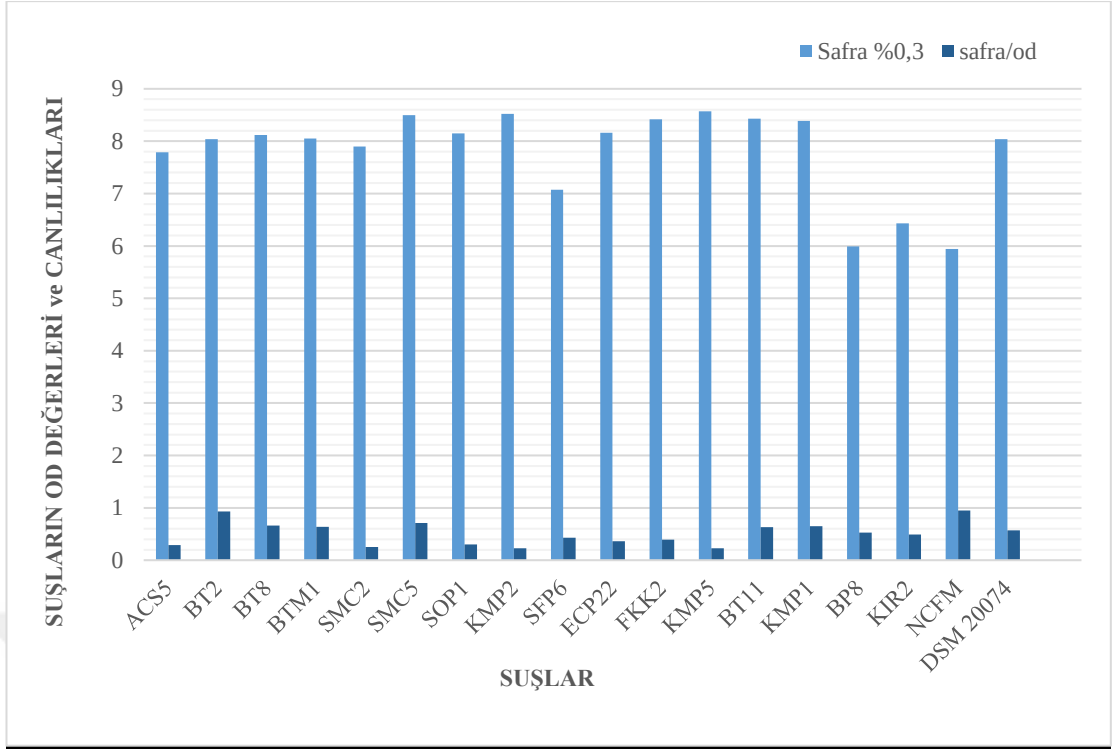
Lactobacillus suşlarının t=2 süresinde asit (pH: 2) ve safra (%0,3) ortamındaki son kültür OD'leri ile log kob/ml değerleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; pH: 2 ortamındaki son kültür OD'leri ile log kob/ml değerleri arasında bir korelasyon belirlenmemiştir. Safra (%0,3) ortamındaki son kültür OD'leri ile log kob/ml değerleri Pearson korelasyonuna göre ($r=0,399$, $P=0,884>0,05$) ilişki tespit edilmemiştir. Ancak BT2, SMC5, SOP1, KMP2, SFP6, ECP22, BT11, KMP1, DSM, NCFM suşlarının son kültür OD'lerinin artmasına paralel olarak koloni sayılarında da artış belirlenmiştir (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).

Farklı türlerin pH 2, %0,3 safra ve pH 6,8 (kontrol) ortamlarındaki canlılık sonuçlarının ortalamaları arasında One Way Anova programına göre önemli bir fark yoktur. Bu analizden elde edilen verilere göre *L. helveticus*'lar pH 2 ve %0,3 safraya dirençli ve kontrol grubunda da en iyi üreyen türler olarak belirlenmiştir.

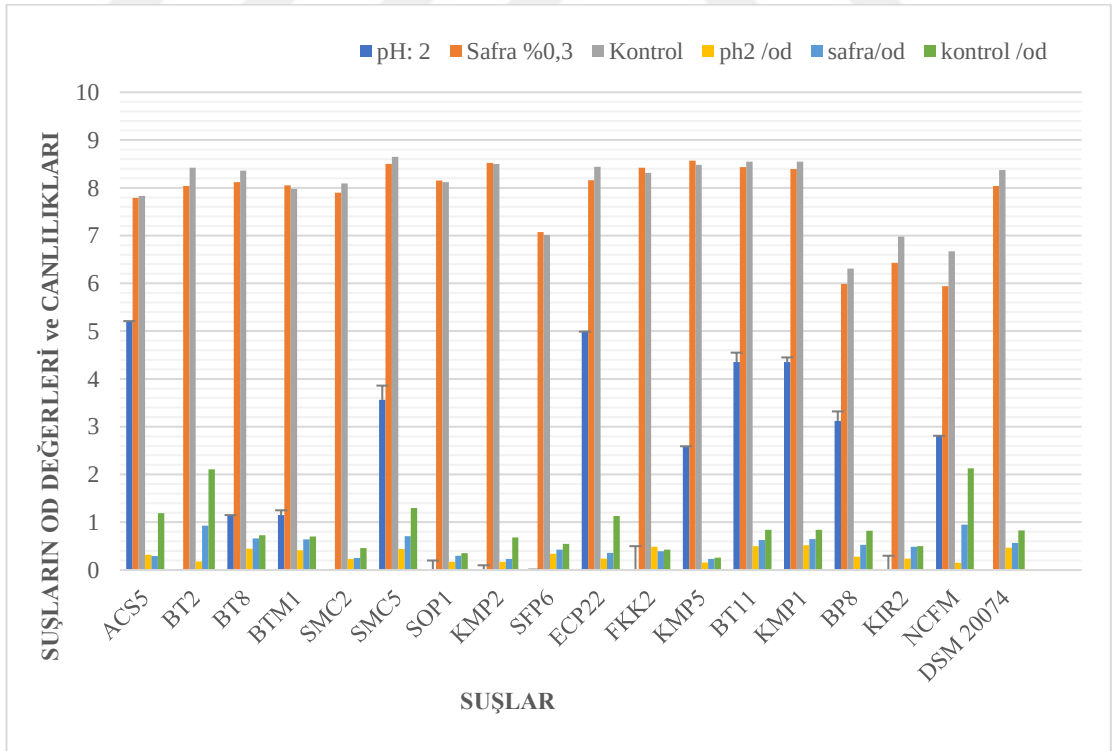


Şekil 4.1: t=2 anında *Lactobacillus* suşlarının pH: 2 ortamındaki OD değerlerinin ve canlılıklarının (log kob/mL) karşılaştırması

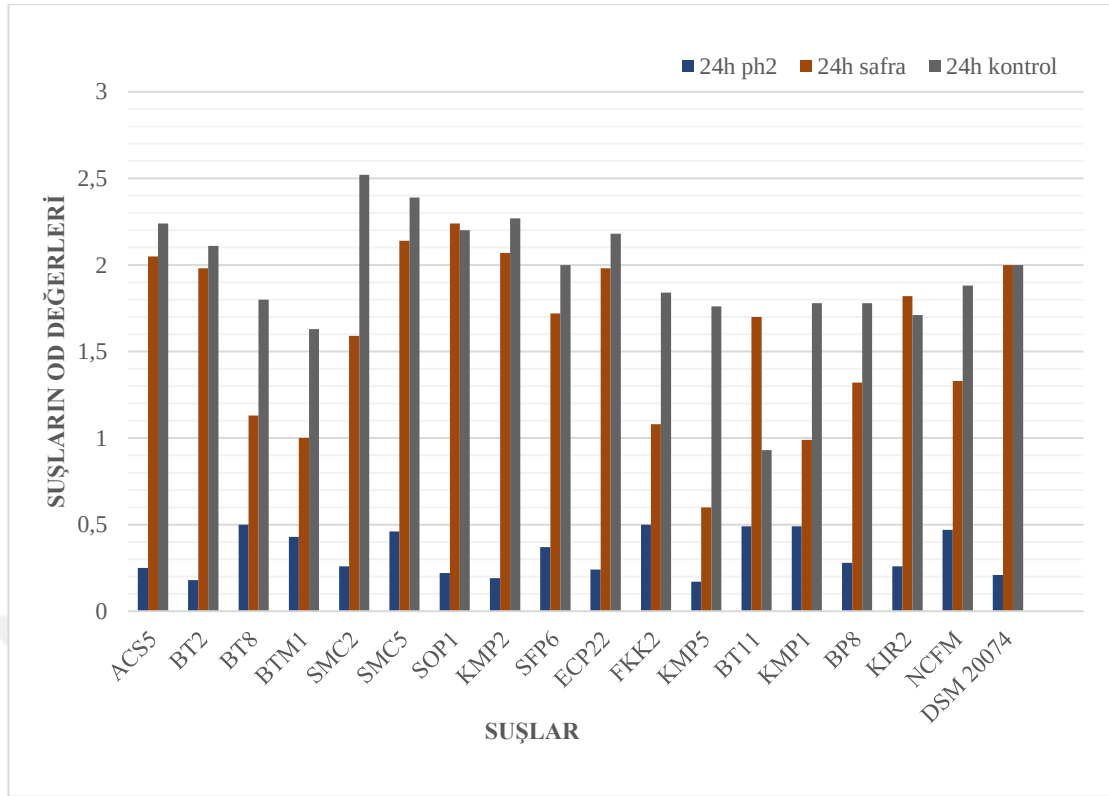
pH 2 ortamında son kültür OD'leri ile log kob/ml değerlerinin istatistiksel olarak ilişkilendirilememiş olmasına karşın, *L. helveticus* BT11 ve *L. brevis* KMP1 suşu hem OD hem de log kob/mL cinsinden diğer suşlara nazaran yüksek bulunmuştur. *L. rhamnosus* SOP1 ve KMP2 suşları ise diğer suşlara göre hem OD hem de log kob/mL değerleri düşük bulunmuştur.



Şekil 4.2: t=2 anında *Lactobacillus* suşlarının %0,3 safralı ortamda OD değerlerinin ve canlılıklarının (log kob/mL) karşılaştırması



Şekil 4.3: t=2 anında *Lactobacillus* suşlarının pH: 2 ve safralı ortamdaki canlılıklarının (log kob/mL) ve OD değerlerinin kontrol grubuyla kıyaslanması



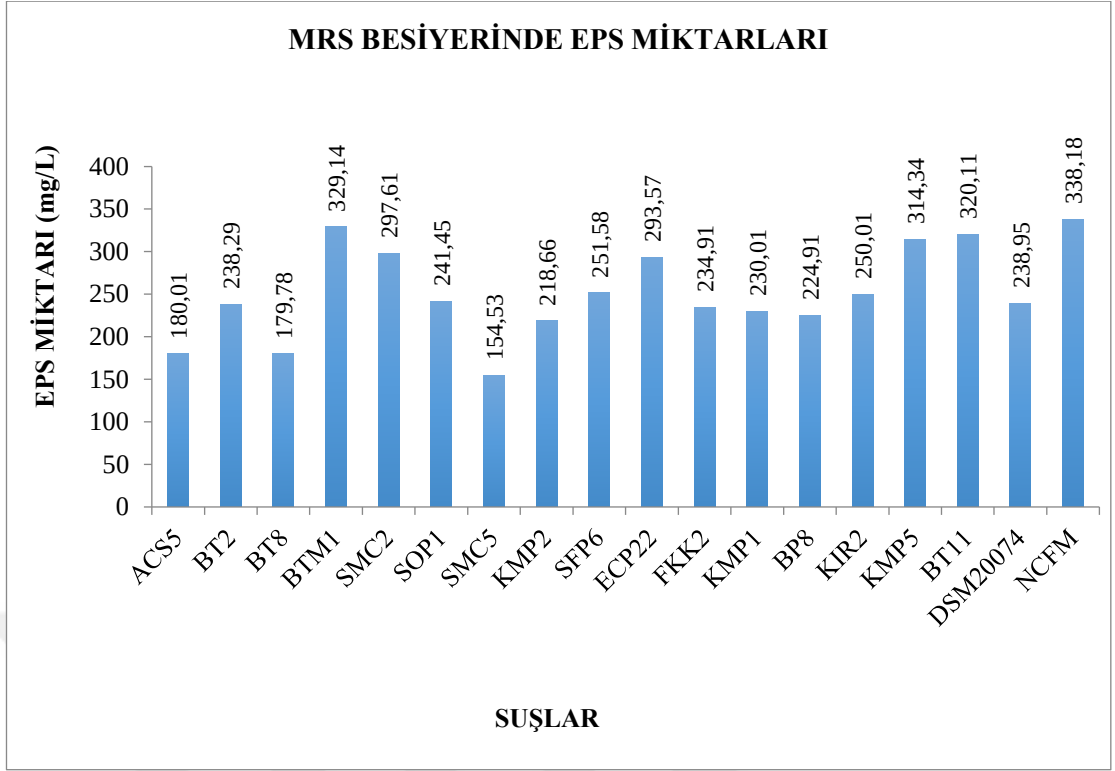
Şekil 4.4: *Lactobacillus* suşlarının 24 saat süre sonundaki pH:2, %0,3 safra ve kontrol ortamlarındaki OD değerleri karşılaştırılması

4.2. Laktobasillerin Eksopolisakkarit (EPS) Üretimleri

Çalışmada *L. rhamnosus* (8), *L. fermentum* (3), *L. brevis* (3) ve *L. helveticus* (2) türlerine ait 16 laktobasil suşu ile 2 test bakterisinin (*L. delbrueckii* DSM 20074, *L. acidophilus* NCFM) MRS besi ortamındaki eksopolisakkarit üretim ve protein miktarları belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.2 ve Şekil 4.5’de verilmiştir. En yüksek EPS üretimi *L. rhamnosus* BTM1 suşunda 329,14 mg/L olarak, en düşük EPS üretimi ise *L. rhamnosus* SMC5 suşunda 154, 53 mg/L olarak gözlenmiştir. *L. acidophilus* NCFM referans suşunda da yüksek EPS (338,18 mg/L) üretimi belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan 16 *Lactobacillus* suşunun son kültür pH değerleri 3,75-5,04 arasında belirlenirken, son kültür OD’lerinin de 1,35-2,17 arasında olduğu tespit edilmiştir. Çalışma kapsamında EPS izolasyonunda kullanılan metot ile protein bulaşının çok düşük olduğu gözlenmiştir.

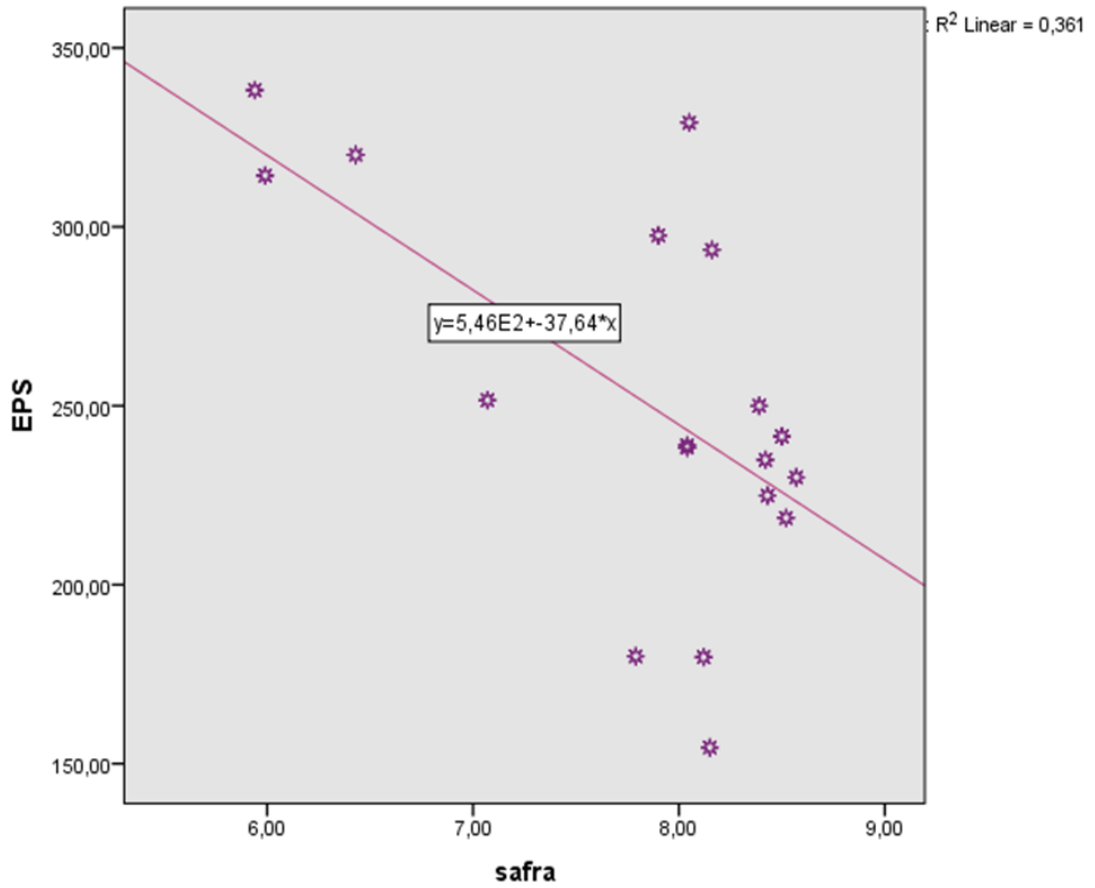
Çizelge 4.2: Laktobasillerin MRS besi ortamında EPS üretimleri (mg/L)

Suşlar	Son Kültür OD	Son Kültür pH	EPS mg/L ^a	Protein mg/ml	Net EPS mg/L ^a
<i>L. rahmnosus</i> ACS5	2,09±0,01	4,24±0,01	180,02±5,30	0,0011	180,01
<i>L. rahmnosus</i> BT2	1,77±0,01	4,40±0,05	238,29±1,77	0,0011	238,29
<i>L. rahmnosus</i> BT8	1,83±0,02	4,45±0,04	189,63±18,90	9,85	179,78
<i>L. rahmnosus</i> BTM1	1,84±0,00	4,35±0,06	329,15±0,14	0,0011	329,14
<i>L. rahmnosus</i> SMÇ2	2,17±0,02	3,75±0,01	297,62±10,61	0,0016	297,61
<i>L. rahmnosus</i> SOP1	1,76±0,01	4,96±0,02	241,46±25,83	0,0019	241,45
<i>L. rahmnosus</i> SMÇ5	2,17±0,03	3,94±0,06	154,54±1,09	0,0015	154,53
<i>L. rahmnosus</i> KMP2	1,68±0,002	4,51±0,04	218,67±14,28	0,0011	218,66
<i>L. fermentum</i> SFP6	1,84±0,00	4,81±0,00	258,96±23,39	7,38	251,58
<i>L. fermentum</i> ECP22	1,82±0,01	4,76±0,01	293,58±4,34	0,0012	293,57
<i>L. fermentum</i> FKK2	1,67±0,00	4,52±0,04	234,92±13,05	0,0015	234,91
<i>L. brevis</i> KMP1	1,77±0,01	4,35±0,02	230,02±8,02	0,0014	230,01
<i>L. brevis</i> BP8	1,78±0,00	4,43±0,00	231,94±14,82	7,032	224,91
<i>L. brevis</i> KIR2	1,66±0,04	5,04±0,01	256,08±4,35	5,98	250,01
<i>L. helveticus</i> KMP5	1,35±0,01	4,84±0,04	314,35±20,40	0,0012	314,34
<i>L. helveticus</i> BT11	1,86±0,03	4,69±0,03	320,12±5,44	0,0017	320,11
<i>L. delbrueckii</i> DSM 20074	1,76±0,02	4,46±0,01	238,96±13,87	0,0016	238,95
<i>L. acidophilus</i> NCFM	1,67±0,02	4,54±0,02	338,19±12,78	0,0019	338,18



Şekil 4.5: *Lactobacillus* suşlarının MRS besi ortamında ürettikleri Eps miktar tayini

EPS üretiminin asit ve safra ortamındaki koruyucu rolünü belirlemek için asit ve safra ortamından elde edilen log kob/mL değerleri ile EPS üretimi arasındaki ilişki Pearson korelasyonuna göre değerlendirilmiştir. Asit direnç ile EPS üretimi arasında istatistiksel bir ilişki belirlenmemiştir ($r = 0,029$, $P = 0,598 > 0,05$). %0,3 safralı ortamdaki canlılık ile EPS üretimi arasındaki ilişki Pearson Korelasyonuna göre ($r = -0,601$, $P = 0,008 > 0,05$) anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.6). Asit ve safraya dirençli olarak belirlenen *L. fermentum* ECP22, *L. helveticus* KMP5, BT11, *L. brevis* KMP1 ve BP8 suşlarının EPS üretimlerinin de yüksek olduğu gözlenmiştir. Asit ve safraya duyarlı olarak belirlenen *L. rhamnosus* BT8 suşunun EPS üretiminin de düşük olduğu (179,78 mg/L) tespit edilmiştir.



Şekil 4.6: %0,3 safralı ortamda gelişme ve EPS üretimi arasındaki negatif korelasyon

Çizelge 4.2’de verilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; *Lactobacillus* suşlarının son kültür OD’leri ile EPS üretimleri arasında ($r=-0,365$ ve $P=0,137>0,05$ olduğu için) ve son kültür pH değerleri ile EPS üretimleri arasında ($r=0,268$ ve $P=0,283>0,05$) istatistiksel olarak korelasyon belirlenememiştir. Ayrıca çalışmada kullanılan *Lactobacillus* cinsine ait *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. brevis*, ve *L. helveticus* suşlarının son kültür pH ve OD’leri ile EPS üretimlerinin ortalamaları arasında One-Way Anova programında herhangi bir farklılık bulunmamıştır ($P>0,05$). One-Way Anova programından elde edilen veriler değerlendirildiğinde *L. helveticus* suşlarının EPS üretiminin diğer türlerden yüksek olduğu tespit edilmiştir.

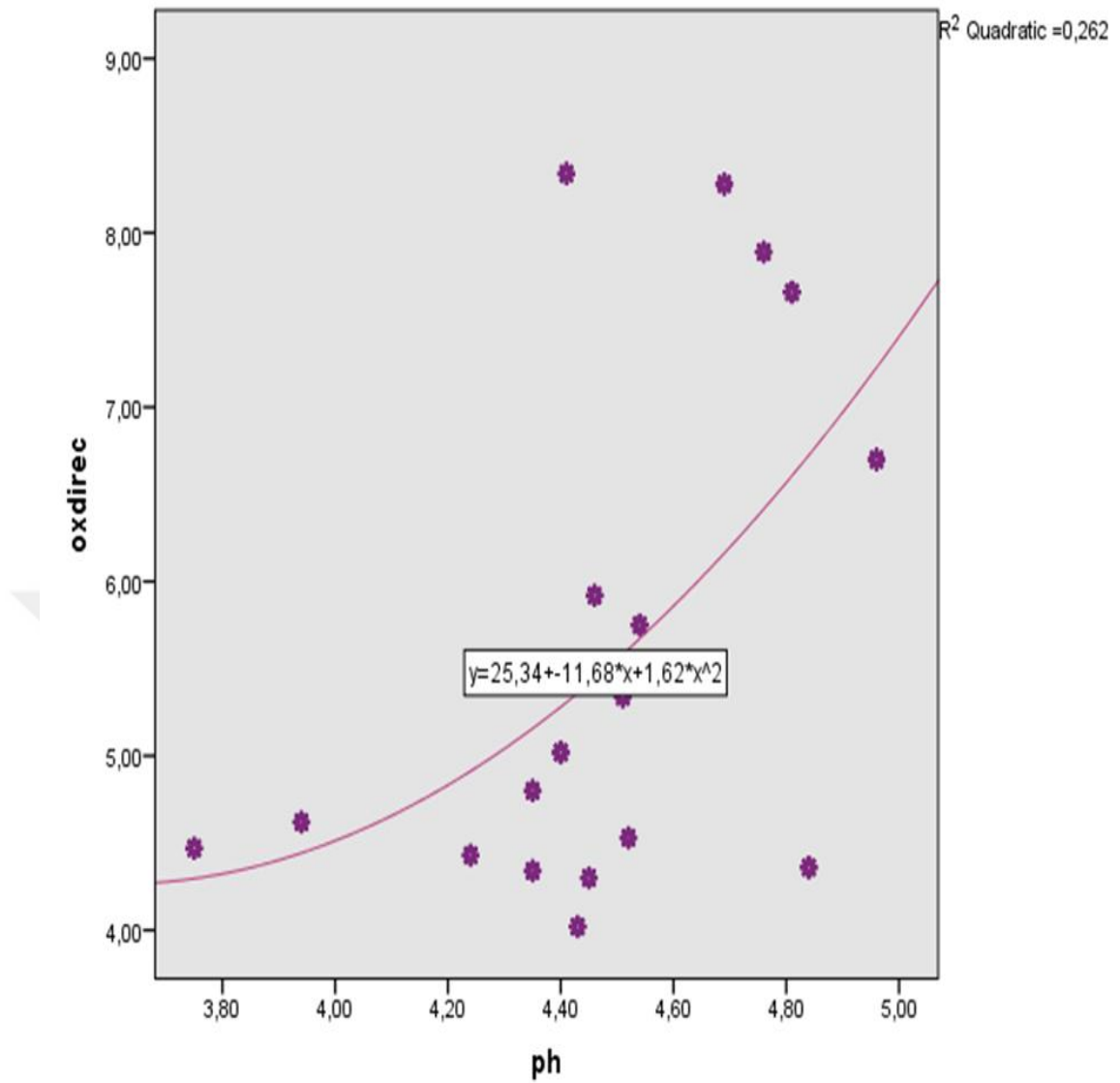
4.3. Laktobasillerin Sodyum Oksalata Dirençlilikleri

Çalışmamızda *L. rhamnosus* (8 adet), *L. fermentum* (3 adet), *L. brevis* (3 adet) ve *L. helveticus* (2 adet) türlerine ait 16 adet laktobasil suşu ile iki test bakterisinin (*L. delbrueckii* DSM 20074, *L. acidophilus* NCFM) 20 mM sodyum oksalat içerecek

şekilde hazırlanan MRS-ox besi ortamındaki sodyum oksalata dirençlilikleri bölüm 3.2.5 'te anlatıldığı gibi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3'te verilmiştir. Test bakterileri de dahil tüm suşların 20 mM sodyum oksalat içeren MRS besi ortamında geliştikleri gözlenmiştir. Genel olarak suşların MRS-ox ortamda geliştikleri belirlenmiştir. BT2, BT8, SMC2, ECP22, KMP1 ve KMP5 suşlarının MRS-ox'taki gelişimlerinin kontrol grubuna göre artış göstererek oksalata yüksek direnç gösteren suşlar olduğu belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan 16 *Lactobacillus* suşu arasında 20 mM sodyum oksalata en yüksek direnç gösteren suş *L. brevis* KIR2 olarak belirlenmiştir. Oksalat degradasyonunun negatif olduğu bilinen *L. delbrueckii* DSM 20074'ün oksalata direncinin de düşük olduğu tespit edilmiştir. Oksalat degradasyonu pozitif olan *L. acidophilus* NCFM suşunun ise oksalata dirençli olduğu ancak bu direncin kullanılan 16 laktobasil suşu ile karşılaştırıldığında düşük olduğu belirlenmiştir.

Suşların son kültür pH değerlerinin 4,07 ile 5,66 arasında olduğu saptanmıştır. Suşların son kültür OD değerlerinin ise 1,14 ile 1,92 arasında olduğu saptanmıştır.

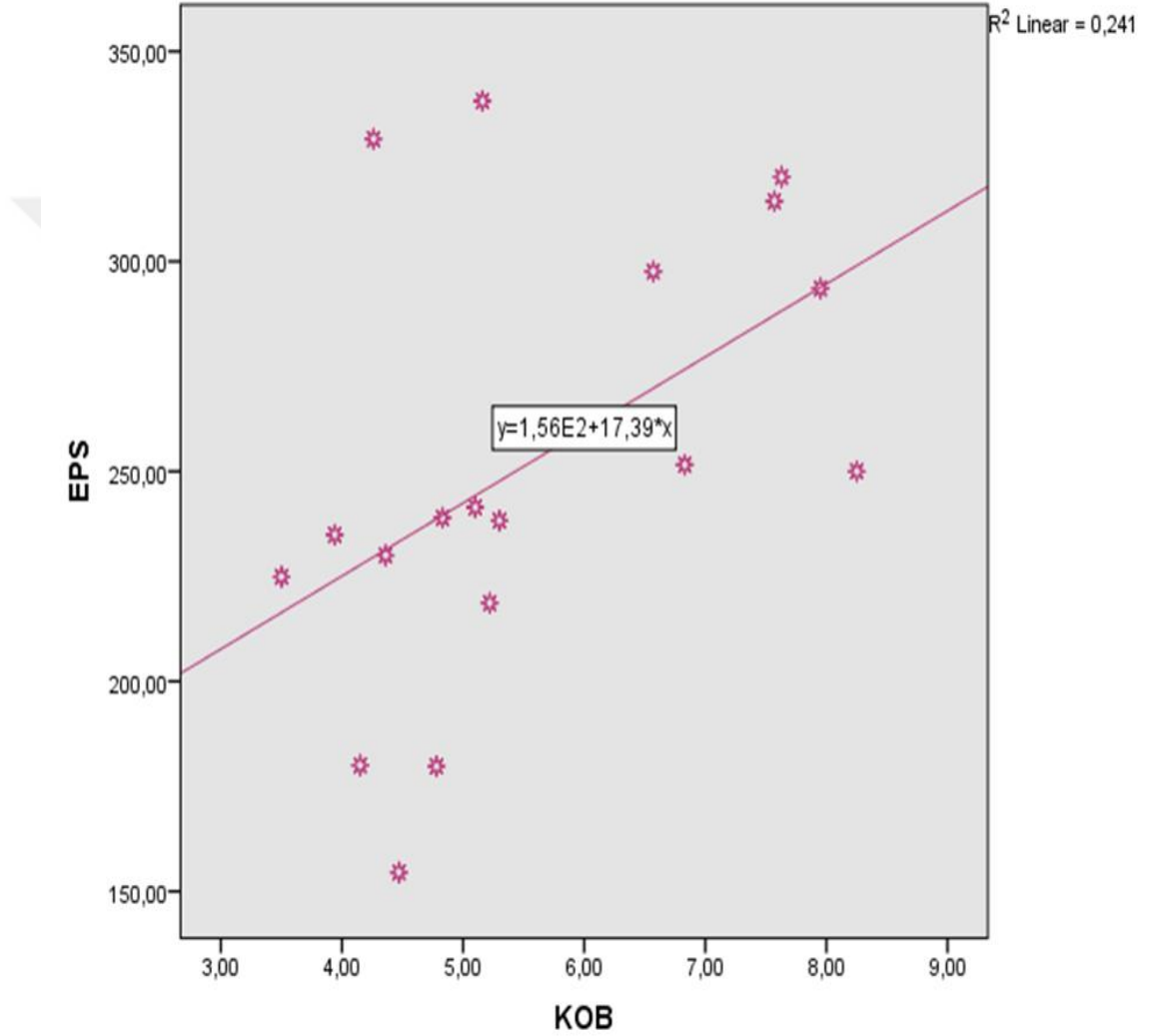
Lactobacillus suşlarının 20 mM sodyum oksalat içeren MRS ortamında geliştirildikten sonra kültür ortamının pH ve OD değerleri ile log kob/ml sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; *Lactobacillus* suşlarının son kültür OD'leri ile log kob/ml değerleri arasında bir korelasyon belirlenememiştir ($r=0,182$ ve $P=0,469>0,05$). 20 mM sodyum oksalatlı ortamın son kültür pH değerleri ile log kob/ml değerleri arasındaki ilişki $P<0,05$ düzeyinde olup Pearson korelasyonuna göre anlamlı bulunmuştur. Son kültür pH değerleri ile log kob/ml değerleri arasında ($r=0,491$) pozitif yönde zayıf bir ilişki tespit edilmiştir (Şekil 4.7). Yani ortamın pH değerinin artmasına bağlı olarak bazı suşların canlılığı artmıştır.



Şekil 4.7: 20 mM sodyum oksalat içeren ortamdaki son kültür pH ve log kob/mL değerler arasındaki pozitif ilişki

20 mM sodyum oksalat içeren MRS ortamında geliştirilen *Lactobacillus* cinsine ait *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. brevis* ve *L. helveticus* suşlarının son kültür pH, OD ve canlılıklarının log kob/mL değerlerinin ortalamaları arasındaki farklılık One-Way Anova programında değerlendirilmiştir. Varyans analizi ile farklı türlerin son kültür OD değerleri ($P=0,481>0,05$) ve farklı türlerin log kob/ml değerleri ($P=0,176<0,05$) arasında anlamlı bir fark belirlenemezken, son kültür pH değerlerinin ($P=0,032<0,05$) ortalamaları arasındaki farkın anlamlı olduğu belirlenmiştir. *L. rhamnosus* ile *L. helveticus*' ların oksalatlı ortamdaki son kültür pH'larının ortalamaları arasındaki fark anlamlı bulunmuştur. Ayrıca One-Way Anova programından elde edilen sonuçlar

incelendiğinde; *L. fermentum* ve *L. helveticus* suşlarının oksalatlı ortama en dirençli suşlar olduğu belirlenmiştir. Pearson korelasyonuna göre *Lactobacillus* suşlarının EPS üretimleri ile oksalata dirençlilikleri arasındaki ilişki anlamlı bulunmuştur ($r=0,491$, $P=0,039<0,05$) (Şekil 4.8). Asit ve safraya dirençli, EPS üretimi yüksek olarak belirlenen *L. fermentum* ECP22, *L. helveticus* KMP5, BT11, *L. brevis* KMP1 ve BP8 suşlarının oksalat dirençliliklerinin de yüksek olduğu gözlenmiştir.

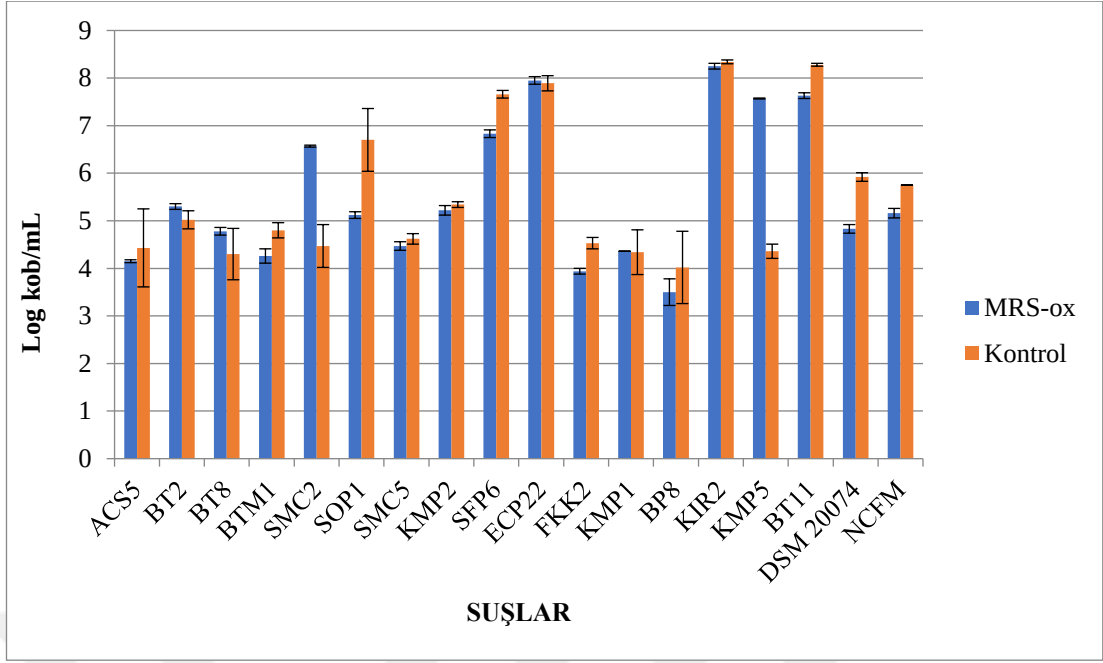


Şekil 4.8: *Lactobacillus* suşlarının EPS üretimleri ile oksalata dirençlilikleri arasındaki korelasyon grafiği

Çizelge 4.3: Laktobasillerin sodyum oksalata (20 mM) dirençlilikleri

	MRS-OX			Kontrol (MRS)		
Suşlar	Son Kültür OD	Son Kültür pH	log Kob/mL	Son Kültür OD	Son Kültür pH	log Kob/mL
<i>L. rhamnosus</i> ACS5	1,87±0,02	4,41±0,01	4,15±0,03	2,09±0,01	4,24±0,01	4,43±0,82
<i>L. rhamnosus</i> BT2	1,60±0,01	4,52±0,01	5,30±0,06	1,77±0,01	4,40±0,05	5,02±0,19
<i>L. rhamnosus</i> BT8	1,36±0,03	4,46±0,02	4,78±0,08	1,83±0,02	4,45±0,04	4,30±0,54
<i>L. rhamnosus</i> BTM1	1,60±0,01	4,50±0,00	4,26±0,15	1,84±0,00	4,35±0,06	4,80±0,16
<i>L. rhamnosus</i> SMC2	1,92±0,01	4,12±0,06	6,57±0,02	2,17±0,02	3,75±0,01	4,47±0,45
<i>L. rhamnosus</i> SOP1	1,38±0,00	4,94±0,20	5,12±0,07	1,76±0,01	4,96±0,02	6,70±0,66
<i>L. rhamnosus</i> SMC5	1,47±0,05	4,07±0,04	4,47±0,09	2,17±0,03	3,94±0,06	4,62±0,11
<i>L. rhamnosus</i> KMP2	1,14±0,00	4,59±0,03	5,22±0,10	1,68±0,002	4,51±0,04	5,34±0,06
<i>L. fermentum</i> SFP6	1,55±0,00	4,92±0,02	6,83±0,08	1,84±0,00	4,81±0,00	7,66±0,08
<i>L. fermentum</i> ECP22	1,53±0,02	4,86±0,02	7,95±0,08	1,82±0,01	4,76±0,01	7,89±0,16
<i>L. fermentum</i> FKK2	1,20±0,02	4,54±0,00	3,94±0,06	1,67±0,00	4,52±0,04	4,53±0,12
<i>L. brevis</i> KMP1	1,59±0,04	4,52±0,01	4,36±0,00	1,77±0,01	4,35±0,02	4,34±0,47
<i>L. brevis</i> BP8	1,60±0,03	4,53±0,01	3,50±0,28	1,78±0,00	4,43±0,00	4,02±0,76
<i>L. brevis</i> KIR2	1,84±0,01	4,64±0,03	8,25±0,06	2,02±0,02	4,41±0,01	8,34±0,04
<i>L. helveticus</i> KMP5	1,22±0,00	5,66±0,03	7,57±0,01	1,35±0,01	4,84±0,04	4,36±0,15
<i>L. helveticus</i> BT11	1,54±0,00	4,87±0,02	7,63±0,06	1,86±0,03	4,69±0,03	8,28±0,03
<i>L. delbrueckii</i> DSM 20074	1,25±0,00	4,60±0,03	4,83±0,09	1,76±0,02	4,46±0,01	5,92±0,09
<i>L. acidophilus</i> NCFM	1,19±0,01	4,58±0,04	5,16±0,10	1,67±0,02	4,54±0,02	5,75±0,00

Kontrol: Sodyum oksalat içermeyen ortamda ve eş zamanlı gelişen kültürler



Şekil 4.9: Laktobasillerin MRS-ox ve MRS besi ortamlarındaki canlılıkları (log kob/mL)

4.4. Laktobasillerin Sodyum Oksalatlı Ortamdaki EPS Üretimleri

Çalışmamızda bulunan *L. rhamnosus* (8 adet), *L. fermentum* (3 adet), *L. brevis* (3 adet) ve *L. helveticus* (2 adet) türlerine ait 16 adet laktobasil suşu ile test bakterisi olarak kullandığımız (*L. delbrueckii* DSM 20074, *L. acidophilus* NCFM) bakterilerinin 20 mM sodyum oksalatlı ortamda ürettikleri eksopolisakkarit miktar tayini ve breadford metodu ile elde edilen EPS içerisindeki protein miktar tayini mg/L cinsinden değerleri 3.2.4’ te anlatıldığı gibi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4’te ve Şekil 4.7’de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre bakterilerin son kültür pH değerleri 4,12- 4,94 aralığında ölçülmüştür. Bakterilerden izole edilen EPS’lere protein bulaşı tespit edilerek net EPS miktarı mg/L cinsinden hesaplanmıştır. En yüksek EPS üretimi 307,80 mg/L EPS miktarı ile *L. rhamnosus* BT11 suşunda, en düşük EPS üretimi ise 55,11 mg/L EPS miktarı ile *L. rhamnosus* ACS5 suşunda gözlenmiştir. Oksalat degradasyonu negatif olan *L. delbrueckii* DSM 20074 suşunun EPS üretiminin yüksek olduğu belirlenmiştir. Suşların son kültür pH değerlerinin 4,07 ile 5,66 arasında olduğu saptanmıştır. Son kültürlerin belirlenen OD değerlerinin ise 1,14 ile 1,87 arasında olduğu saptanmıştır. Çalışma kapsamında EPS izolasyonunda kullanılan metot ile protein bulaşının çok

düşük olduğu belirlenmiştir. Suşların MRS-ox'taki EPS üretim miktarları MRS besi ortamındaki EPS üretim miktarlarına göre azalma göstermiş ve oksalatın EPS üretimi üzerinde inhibitör etkisi olduğu belirlenmiştir. EPS üretim miktarı en fazla azalma gösteren suşlar test bakterilerinden *L. delbrueckii* DSM 20074, *L. acidophilus* NCFM, deneyde kullanılan bakterilerinden *L. rhamnosus* ACS5, SMC2, SOP1, *L. fermentum* SFP6, ECP22, *L. brevis* KMP1, KIR2, *L. helveticus* KMP5 ve *L. helveticus* BT11'dir. *L. rhamnosus* BT2, BT8, BTM1, SMC5, KMP2, *L. fermentum* FKK2 ve *L. brevis* BP8 suşlarının oksalatlı ortamda EPS üretimlerinde düşük oranda azalma olduğu gözlenmiştir. Hem MRS hem de MRS-ox besi ortamında EPS üretimi yüksek olan suş *L. rhamnosus* BTM1, her iki besi ortamında diğer suşlara göre düşük EPS üretimi gösteren suş ise *L. rhamnosus* SMC5 olarak bulunmuştur (Şekil 4.10).

Çizelge 4.4: Laktobasil suşlarının MRS-ox besi ortamındaki EPS üretimleri

SUŞLAR	Son Kültür OD	Son Kültür pH	EPS (mg/L)	PROTEİN (mg/L)	Net EPS (mg/L)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ACS5	1,87±0,02	4,41±0,01	55,12±1,63	0,0013	55,11
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> BT2	1,60±0,01	4,52±0,01	164,92±4,62	0,91	164,01
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> BT8	1,36±0,03	4,46±0,02	133,77±5,16	0,0012	133,76
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> BTM1	1,60±0,01	4,50±0,00	307,81±1,36	0,0012	307,80
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> SMC2	1,92±0,01	4,12±0,06	151,08±10,33	0,0017	151,07
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> SOP1	1,38±0,00	4,94±0,20	139,15±9,25	0,0016	139,14
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> SMC5	1,47±0,05	4,07±0,04	106,27±10,61	0,0011	106,26
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> KMP2	1,14±0,00	4,59±0,03	135,89±1,63	0,0014	135,88
<i>Lactobacillus fermentum</i> SFP6	1,55±0,00	4,92±0,02	110,41±5,51	0,0011	110,40
<i>Lactobacillus fermentum</i> ECP22	1,53±0,02	4,86±0,02	133,86±4,22	0,0015	133,85
<i>Lactobacillus fermentum</i> FKK2	1,20±0,02	4,54±0,00	136,66±1,08	0,0016	136,65

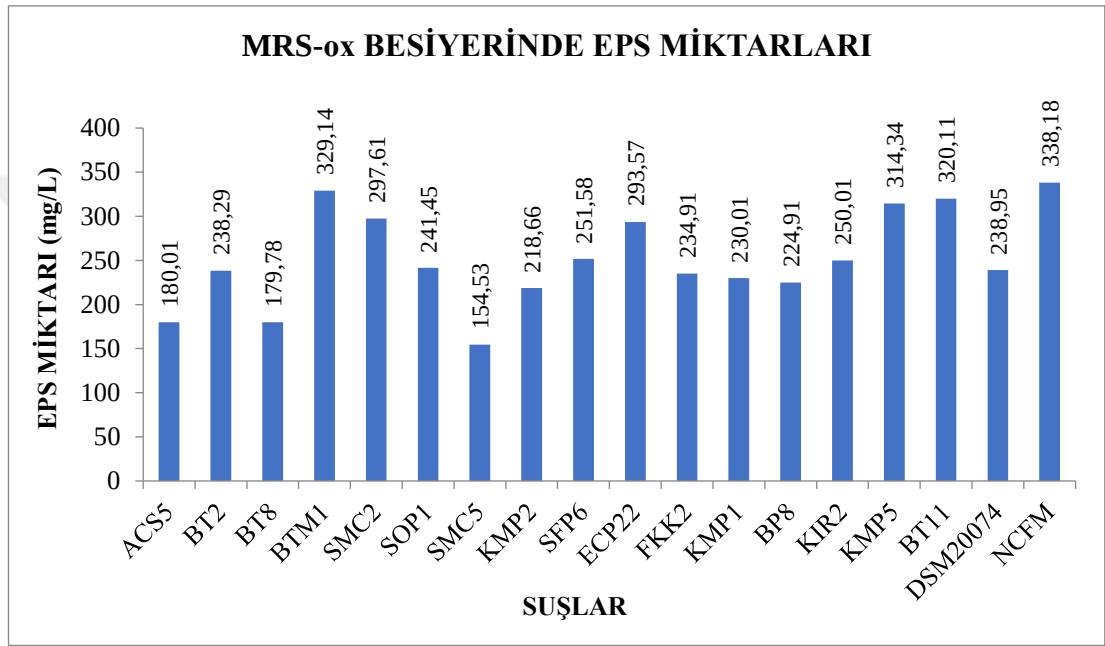
Çizelge 4.4 (devam): Laktobasil suşlarının MRS-ox besi ortamındaki EPS üretimleri

SUŞLAR	Son Kültür OD	Son Kültür pH	EPS (mg/L)	PROTEİN (mg/L)	Net EPS (mg/L)
<i>Lactobacillus brevis</i> KMP1	1,59±0,04	4,52±0,01	119,54±6,80	0,0013	119,53
<i>Lactobacillus brevis</i> BP8	1,60±0,03	4,53±0,01	140,70±2,99	0,0011	140,69
<i>Lactobacillus brevis</i> KIR2	1,30±0,03	4,99±0,02	65,40±16,78	0,0013	59,07
<i>L. helveticus</i> KMP5	1,22±0,00	5,66±0,03	131,46±2,45	0,91	131,45
<i>L. helveticus</i> BT11	1,54±0,00	4,87±0,02	69,45±4,76	0,0012	69,44
<i>L. delbrueckii</i> DSM 20074	1,25±0,00	4,60±0,03	137,62±8,15	0,0012	137,61
<i>L. acidophilus</i> NCFM	1,19±0,01	4,58±0,04	158,58±13,33	0,0017	158,57

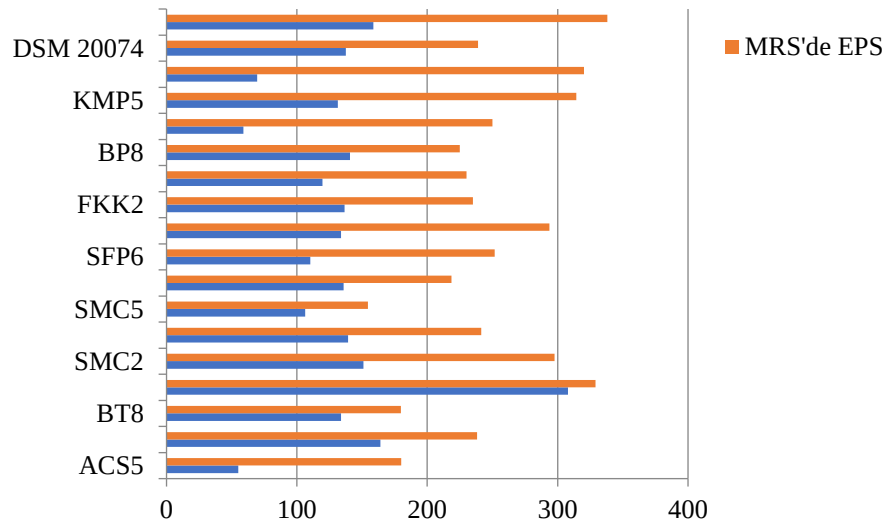
Çizelge 4.4'te verilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; *Lactobacillus* suşlarının oksalatlı ortamdaki son kültür OD'leri ile EPS üretimleri arasında ($r=0,043$ ve $P=0,876>0,05$ olduğu için) ve sodyum oksalatlı ortamdaki son kültür pH değerleri ile EPS üretimleri ($r=-0,154$ ve $P=0,570>0,05$) arasında istatistiksel olarak korelasyon belirlenememiştir.

20 mM sodyum oksalatlı ortamda geliştirilen *Lactobacillus* cinsine ait *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. brevis* ve *L. helveticus* suşlarının son kültür pH ve OD'leri ile EPS üretimlerinin ortalamaları arasındaki farklılık One-Way Anova programında değerlendirilmiştir. Varyans analizi ile farklı türlerin son kültür OD değerleri ($P=0,791>0,05$) ve farklı türlerin MRS-ox besiyerinde EPS üretim değerleri ($P=0,268>0,05$) arasında anlamlı bir fark belirlenememiştir. *L. rhamnosus* ile *L. helveticus*' ların oksalatlı ortamdaki son kültür pH'larının ortalamaları arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$). One-Way Anova programından elde edilen veriler değerlendirildiğinde *L. rhamnosus* suşlarının sodyum oksalatlı ortamda ortalama EPS (149,13 mg/L) üretiminin diğer türlerden yüksek olduğu tespit edilmiştir. *L. helveticus* suşları oksaltsız ortamda da EPS üretimi yüksek tür olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2). MRS-ox ve MRS ortamlarında EPS üretimleri arasında herhangi bir korelasyon belirlenmemiştir ($r=0,392$, $P=0,133>0,05$). Asit ve safraya dirençli, EPS üretimi ile 20

mM sodyum oksalata direnci yüksek olarak belirlenen SMC5, KMP1, BP8 ve KMP5 suşlarının 20 mM sodyum oksalatlı ortamda EPS üretimleri de yüksek olarak belirlenmiştir. Asit ve safraya dirençli, EPS üretimi yüksek olarak belirlenen ACS5 suşunun ise 20 mM sodyum oksalatlı ortamda da EPS üretiminin düşük olduğu (55,11 mg/L) gözlenmiştir. Asite duyarlı olarak belirlenen BT8 suşunun 20 mM sodyum oksalatlı ortamda da EPS üretimi kontrol besiyerindeki EPS üretimine göre önemli oranda azalma belirlenmiştir.



Şekil 4.10: Laktobasil suşlarının MRS-ox besi ortamındaki EPS üretimleri



Şekil 4.11: Laktobasil suşlarının MRS ve MRS-ox besi ortamlarındaki EPS üretimleri

4.5. Laktobasillerin 10 mM Sodyum Oksalatı Degradasyon Sonuçları

Bağırsaklarda oksalat emiliminin artması çeşitli bağırsak hastalıklarına yol açan hiperoksalüriye neden olmasına rağmen besinlerle alınan oksalat ve kalsiyumun miktarı, oksalatın degradasyonu, emilimi ve idrara salınma oranlarının belirlenmesinde önemli bir değişken olabileceği bildirilmiştir (Campieri vd., 2001). Bu nedenle çalışmaya güncel literatürde belirlenen 10 mM oksalat dozu ile başlanmış ve daha sonra iki kat artırılarak aktivitenin devam edip etmediği tespit edilmiştir.

Çalışmada *L. rhamnosus* (8), *L. fermentum* (3), *L. brevis* (3) ve *L. helveticus* (2) türlerine ait 16 laktobasil suşu ile 2 test bakterisinin (*L. delbrueckii* DSM 20074, *L. acidophilus* NCFM) 10 mM sodyum oksalat içeren MRS-ox besi ortamındaki sodyum oksalat degradasyonu çalışması bölüm 3.2.7’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiş ve oksalatlı ortamda gelişen kültürlerin canlılıklarını, kültür yoğunluklarını, ortamın pH değerini değerlendirmek ve kontrolle karşılaştırmak için ölçümler yapılmış, degradasyon sonuçları ile birlikte Çizelge 4.5’de verilmiştir.

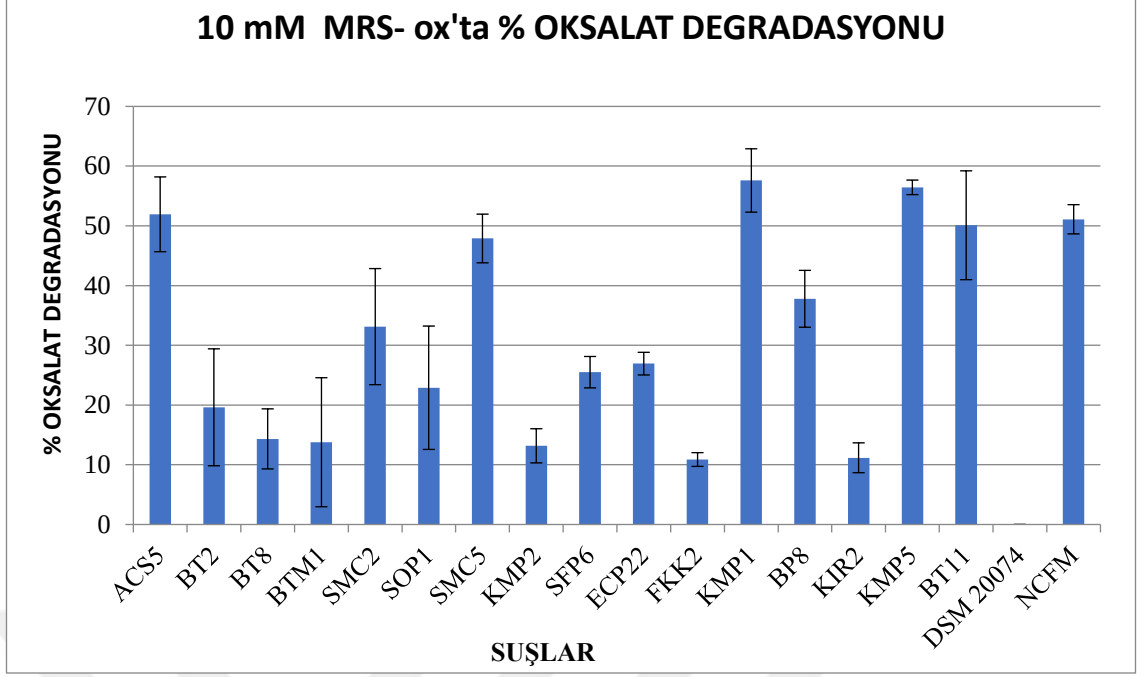
Çizelge 4.5: *Lactobacillus* suşlarının 10 mM sodyum oksalat deşredasyonu sonuçları

Suşlar	Kontrol			10 mM Sodyum Oksalat			10 mM oksalat	
	pH	OD	Kob/mL	pH	OD	Kob/mL	%deşredasyon	Örnek supernatant pH
<i>L. rhamnosus</i> ACS5	4,44±0,01	1,67±0,01	8,83±0,61	4,52±0,01	1,66±0,03	5,91±0,08	51,93±6,26	5,52±0,01
<i>L. rhamnosus</i> BT2	4,53±0,00	1,54±0,03	9,46±0,65	4,58±0,01	1,57±0,06	8,36±0,07	19,62±9,79	5,61±0,01
<i>L. rhamnosus</i> BT8	4,50±0,00	1,49±0,01	8,47±0,44	4,47±0,00	1,90±0,04	8,38±0,05	14,33±5,03	5,27±0,01
<i>L. rhamnosus</i> BTM1	4,49±0,01	1,50±0,01	9,51±0,01	4,61±0,00	1,61±0,06	6,65±0,10	13,77±10,80	5,72±0,01
<i>L. rhamnosus</i> SMC2	4,31±0,00	1,81±0,02	8,98±0,59	4,53±0,01	1,66±0,02	5,63±0,09	33,13±9,72	5,51±0,00
<i>L. rhamnosus</i> SOP1	4,61±0,01	1,53±0,01	9,67±0,57	4,69±0,01	1,71±0,13	5,99±0,05	22,90±10,33	5,57±0,01
<i>L. rhamnosus</i> SMC5	3,92±0,01	1,89±0,03	8,45±0,68	4,53±0,02	2,12±0,23	8,19±0,03	47,89±4,08	5,22±0,02
<i>L. rhamnosus</i> KMP2	4,48±0,01	1,51±0,01	9,35±0,59	4,59±0,00	1,54±0,01	6,56±0,07	13,17±2,86	5,67±0,00
<i>L. fermentum</i> SFP6	4,57±0,01	1,51±0,01	9,34±1,02	4,59±0,01	1,79±0,01	6,54±0,06	25,50±2,63	5,64±0,00
<i>L. fermentum</i> ECP22	4,27±0,01	1,93±0,01	8,35±0,54	4,41±0,01	1,79±0,06	8,27±0,03	26,93±1,90	5,27±0,01
<i>L. fermentum</i> FKK2	4,49±0,01	1,43±0,01	8,76±0,56	4,59±0,01	1,48±0,01	6,49±0,15	10,88±1,15	5,71±0,00
<i>L. brevis</i> KMP1	4,52±0,00	1,52±0,01	8,82±0,49	4,51±0,01	1,59±0,04	8,41±0,07	57,60±5,30	5,52±0,00
<i>L. brevis</i> BP8	4,50±0,00	1,47±0,01	9,49±1,21	4,59±0,00	1,63±0,05	8,49±0,05	37,79±4,76	5,75±0,06
<i>L. brevis</i> KIR2	4,54±0,01	1,44±0,01	8,89±0,52	4,53±0,00	1,75±0,03	5,96±0,06	11,17±2,50	5,65±0,01
<i>L. helveticus</i> KMP5	4,54±0,01	1,57±0,00	9,61±1,24	4,66±0,00	1,70±0,06	8,48±0,05	56,45±1,22	5,55±0,00
<i>L. helveticus</i> BT11	4,37±0,01	1,50±0,01	9,35±0,03	4,51±0,00	1,53±0,05	8,55±0,03	50,10±9,11	5,59±0,01
<i>L. delbrueckii</i> DSM 20074	4,51±0,01	1,53±0,01	9,03±0,58	4,67±0,01	1,75±0,04	6,88±0,06	-	5,61±0,00
<i>L. acidophilus</i> NCFM	4,48±0,00	1,48±0,02	8,84±0,59	4,57±0,01	1,65±0,01	6,14±0,08	51,10±2,45	5,62±0,01

Çizelge 4.5 incelendiğinde DSM 20074 oksalatlı ortamdaki son kültür OD ve log kob/mL değerleri kontrolle karşılaştırıldığında, OD değerlerinde önemli bir azalma belirlenmezken, canlılık sayımlarında 2,15 log kob/mL değerleri arasında düşük oranda azalma tespit edilmiştir. Kontrol grubunun son kültür pH değeri 3,92-4,61; 10mM MRS-ox ortamının son kültür pH değeri de 4,41-4,69 aralığında değişim göstermiştir.

Oksalat degradasyonu pozitif NCFM ve oksalat degradasyonu negatif DSM 20074 test bakterilerinin sonuçları Çizelge 4.5’de verilmiştir. Pozitif kontrol NCFM ile karşılaştırıldığında çalışmada kullanılan *L. brevis* KMP1 ve *L. helveticus* KMP5 suşlarının degradasyonun daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Suşların örnek supernatant pH değerlerinin pH: 7’den küçük olması da degradasyon aktivitesi olduğunu göstermektedir.

10 mM sodyum oksalatlı ortamdaki log kob/mL ile oksalat degradasyonu ($r=0,314$, $P=0,205> 0,05$), EPS üretimi ile oksalat degradasyonu arasında ($r=0,127$, $P=0,616>0,05$) Pearson korelasyonuna göre istatistiksel bir ilişki bulunmamakla birlikte; yüksek EPS üretimi gösteren *L. rhamnosus* SMC5 (%47,89), *L. brevis* KMP1, (%57,60) ve *L. helveticus* KMP5, BT11 (%56,45 ve %50,10) suşlarının 10mM sodyum oksalatı da diğer suşlara oranla yüksek oranda degrade edebildiği gözlenmektedir. Düşük EPS üretimi gösteren *L. rhamnosus* BT8 suşunun sodyum oksalat degradasyonunun da düşük olduğu (%14,33) tespit edilmiştir. *L. rhamnosus* (8), *L. fermentum* (3), *L. brevis* (3) ve *L. helveticus* (2) suşlarının oksalat degradasyonlarının ortalamaları arasındaki farklılık One-Way Anova programında değerlendirilmiştir. Suşların oksalat degradasyonlarının ortalamaları arasında anlamlı bir fark belirlenememiştir ($P=0,170>0.05$). Ortalama en yüksek oksalat degradasyonu *L. helveticuslar*’da belirlenmiştir.



Şekil 4.12: Laktobasilllerin 10 mM sodyum oksalatlı ortamda % oksalat degradasyon değerleri

4.6. Laktobasillerin 20 mM Sodyum Oksalatı Degradasyon Sonuçları

Gastrointestinal sistem koşullarına dirençli, EPS üretimi yüksek, oksalatlı ortama direnç gösteren ve 10 mM sodyum oksalatı degrade eden suşlar (*L. rhamnosus* ACS5, SMC5, *L. brevis* KMP1, BP8 ve *L. helveticus* KMP5, BT11) ve karşılaştırmak için gastrointestinal sistem koşullarına dirençsiz ve diğer özellikler bakımından düşük performans gösteren bir suş (*L. rhamnosus* BT8), 10 mM sodyum oksalat yerine 20 mM sodyum oksalat içeren besi ortamlarına uygulanarak suşların yüksek oksalatlı ortamdaki degradasyonları belirlenmiştir. Laktobasillerin 20 mM sodyum oksalatı degradasyonu çalışmasında, 20 mM sodyum oksalatlı ortamda gelişen kültürlerin canlılıklarını, kültür yoğunluklarını ve ortamın pH'sını değerlendirmek ve kontrolle karşılaştırmak için ölçümler yapılmış, degradasyon sonuçları ile birlikte Çizelge 4.6'da verilmiştir. Çizelge 4.6 incelendiğinde 20 mM sodyum oksalatlı ortamda BP8 suşunun canlılığında kontrolle karşılaştırıldığında düşük oranda (0,09 log kob/mL) azalma tespit edilirken, genel olarak suşların canlılıkları 20 mM sodyum oksalatlı ortamda artış göstermiştir.

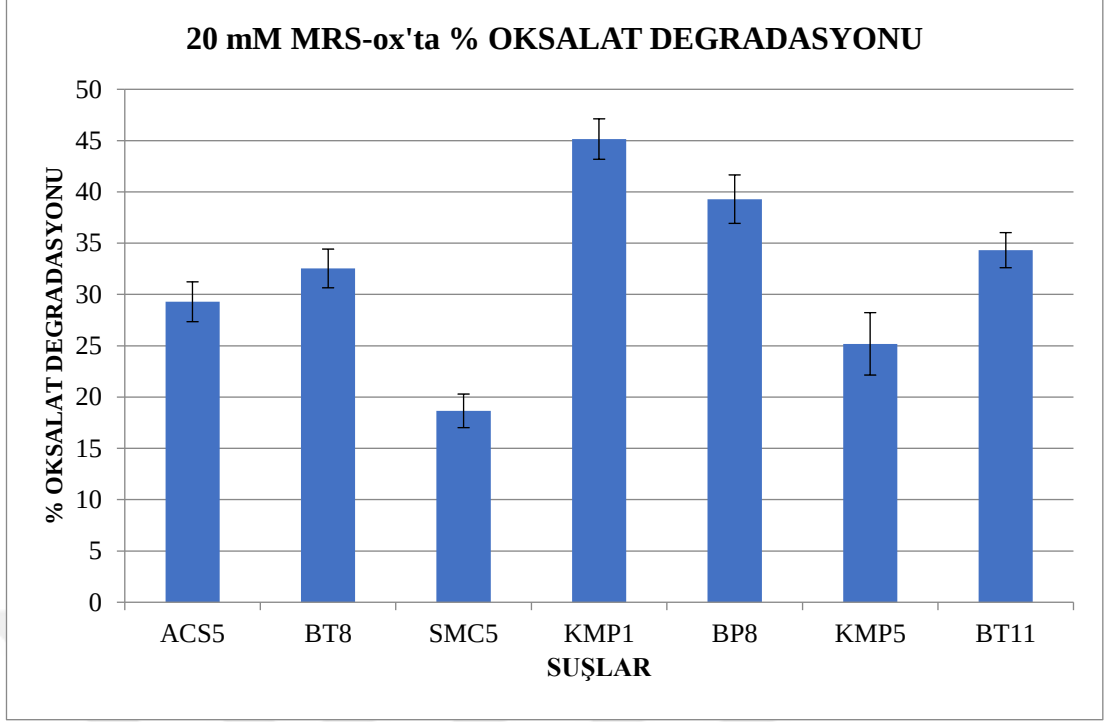
Kontrol grubunun son kültür pH değerleri 4,03-4,65; 20 mM sodyum oksalatlı ortamda geliştirilen suşların son kültür pH değerleri ise 4,22-5,60 aralığında belirlenmiştir.

20 mM sodyum oksalatlı ortamda geliştirilen suşların degradasyon sonuçları, 10 mM sodyum oksalat degradasyon sonuçları ile karşılaştırıldığında ACS5, SMC5, KMP1, KMP5 ve BT11 kültürlerin ortamdaki oksalat konsantrasyonunun artmasına paralel olarak degradasyon aktiviteleri de azalma gözlenmiştir. BP8 suşunun degradasyon aktivitesinde ise 20 mM sodyum oksalatlı ortamda artış belirlenmiştir. Çalışmalarda pozitif kontrol olarak kullanılan NCFM'nin degradasyon aktivitesi ortamda oksalat konsantrasyonunun artması ile azalmıştır.

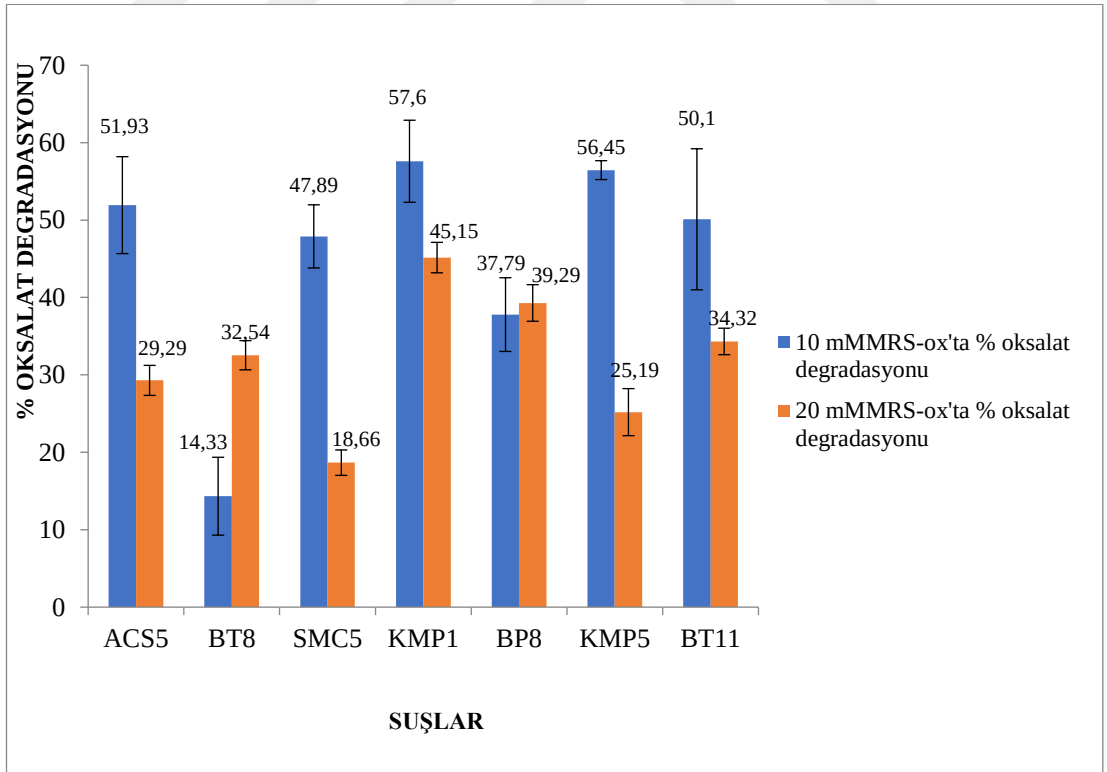
20 mM sodyum oksalatlı ortamın log kob/mL değeri ile oksalat degradasyonu ($r=0,448$, $P=0,227> 0,05$), EPS üretimi ile oksalat degradasyonu arasında ($r=-0,187$, $P=0,630>0,05$) Pearson korelasyonuna göre istatistiksel bir ilişki bulunmamakla birlikte, yüksek EPS üretimi gösteren *L. rhamnosus* SMC5 (%34,32), *L. brevis* KMP1 (%45,15) ve *L. brevis* BP8 (%39,29) suşlarının 20 mM sodyum oksalatı da diğer suşlara oranla daha yüksek oranda degrade edebildiği gözlenmektedir. Düşük EPS üretimi gösteren *L. rhamnosus* BT8 suşunun oksalat degradasyonunun da düşük olduğu tespit edilmiştir. 20 mM ile 10 mM sodyum oksalat degradasyon sonuçları arasında Pearson korelasyonuna ilişki tespit edilememiştir ($r=0,575$, $P=0,105<0,05$). Ortamda oksalat konsantrasyonunun artmasına paralel olarak degradasyon oranı da azalmıştır. *L. rhamnosus*, *L. brevis* ve *L. helveticus* suşlarının oksalat degradasyonlarının ortalamaları arasındaki farklılık One-Way Anova programında değerlendirilmiştir. Suşların oksalat degradasyonlarının ortalamaları arasındaki fark 0,05 düzeyinde anlamlı bulunmuştur. 20 mM oksalatı ortalama en yüksek degrade eden (%42,22) tür *L. brevis* olarak belirlenmiştir. Seçilen suşların % degradasyonları grafiksel olarak şekil 4.13'de gösterilmiştir. Şekil 4.14'de ise 10mM ve 20 mM sodyum oksalatlı ortamda degradasyon yetenekleri grafiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.6: *Lactobacillus* suşlarının 20 mM sodyum oksalat deşredasyonu sonuçları

Suşlar	Kontrol			20 mM Sodyum Oksalat			20 mM oksalat	
	pH	OD	Kob/mL	pH	OD	Kob/mL	%Deşredasyon	Sample supernatant pH
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ACS5	4,41±0,01	1,68±0,02	7,62±0,87	4,56±0,00	1,79±0,03	8,42±0,01	29,29±1,94	5,86±0,01
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> SMC5	4,03±0,01	1,95±0,01	7,13±0,07	4,51±0,01	2,05±0,02	8,51±0,01	18,66±1,64	5,85±0,01
<i>Lactobacillus brevis</i> KMP1	4,40±0,01	1,41±0,00	7,30±0,21	4,48±0,01	1,52±0,03	8,30±0,03	45,15±1,97	6,09±0,01
<i>Lactobacillus brevis</i> BP8	4,47±0,01	1,46±0,04	7,99±0,04	4,51±0,01	1,70±0,01	7,90±0,69	39,29±2,6	5,99±0,01
<i>L.helveticus</i> KMP5	4,07±0,00	1,89±0,02	6,63±0,21	4,22±0,00	2,17±0,03	8,52±0,02	25,19±3,04	5,92±0,01
<i>L.helveticus</i> BT11	4,42±0,00	1,52±0,03	7,20±0,00	4,45±0,01	1,80±0,01	8,49±0,03	34,32±1,71	5,90±0,01
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> BT8	4,51±0,01	1,49±0,01	7,23±0,07	4,56±0,00	1,55±0,01	8,43±0,03	32,54±1,89	5,93±0,01



Şekil 4.13: Laktobasillerin 20 mM sodyum oksalat içeren ortamdaki % oksalat degradasyonları



Şekil 4.14: Laktobasillerden seçilen 7 suşun 10 mM ve 20 mM sodyum oksalatlı ortamdaki % degradasyon değerlerinin karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

İnsanlar ve hayvanların günlük bitkisel beslenmelerinde, oksalat ihtiva eden gıdalar az da olsa bulunmasına rağmen, dünyada bazı bölgelerde insanlar mevsimsel besinler ile birlikte tüketilen bitkisel kaynaklı gıdalarla daha çok maruz kalmaktadır. Oksalik asit içeriği yüksek gıdalarla beslenilmesi, kalsiyum ve diğer minerallerin absorpsiyonunun sınırlandırıldığı gibi, nefrolitiazis oluşumunda da önemli bir faktör olan hiperoksalüriye neden olmaktadır. Oksalatın bağırsaktan aşırı absorpsiyonu durumunda da enterik hiperoksalüri ifadesi kullanılır. Gıdalardan alınan oksalatın, bağırsakta absorpsiyonu, intestinal oksalat degradasyonu yapan bakterilerdeki varyasyonlar ve oksalat transportörlerindeki genetik modifikasyonlar da üriner oksalat salgısının artmasına ve dolayısıyla tekrarlayan nefrolitiazise neden olmaktadır (Allison vd., 1986).

Oksalik asitin iyonlarla birleşerek oluşturduğu bileşikler böbrek taşının büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Tekrarlayan nefrolitiazis problemi yaşayan hastalar günümüz tedavilerince yeterli tıbbi müdahale alamamaktadır. Piyasada bulunan ilaçlar hastalığın seyrini ve semptomlarını azaltmasına karşın nüks etme sıklığına bir etkisi olmayıp kalıcı tedavi sağlayamamaktadır. Oksalat taşı olan hastalar için önerilen tedavi doğrudan belirli besinlerin sınırlandırılması ve ilaç (diüretik, potasyum sitrat, piridoksin, selüloz fosfat,) uygulamasıdır. Oksalat oksidaz enzimi uygulaması ise sadece tüketilen gıdalarda bulunan oksalatı degrade edebildiğinden ve mide- bağırsak sistemi boyunca bulunan proteolitik enzimler ile inaktif olmasından dolayı etkin bir tedavi sağlanamamıştır (Sidhu vd.,1999). Cerrahi müdahale seçeneklerinden ESWL (Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy), lazerle şok dalgaları ile taş boyutu küçülterek üreter boyunca idrar ile atılması sağlanır. Fakat bu tedavi yönteminde üretra ve üreterde tıkanmalar ve enfeksiyonel durum gözlemlenebilmektedir. Hasta gerekirse birkaç seans bu tedaviyi almaktadır. Her seansta birey nefron kaybı yaşamaktadır. Bir diğer seçenek olan endoskopi üreter taş tedavisinde hastanın idrar yolundan lazer ile girilerek kesiksiz işlem yapılmaktadır. Anestezi kaynaklı bu müdahalenin de hastaya yan etkileri gözlemlenmektedir. Boyut olarak büyük taşlarda bu tedavilerin dışında

perkutan nefrolitotomi (PCNL), dıştan cerrahi kesi ile taşın çıkarılması işlemidir. Hastanın iyileşme süresi uzundur (Morozumi vd.,1987, Sidhu vd.,1999). Gastrointestinal sistemde kolonize olan *O. formigenes* kalsiyum oksalat taşının önlenmesinde oksalat degradasyonu yaparak aktif rol aldığı ve kalsiyum oksalat taşının gözlemlendiği nefrolitiazis hastalarında, bu bakterinin kolonizasyondaki eksikliğini hastalığın sebeplerinden biri olarak gösterilmektedir (Allison vd.,1985, Siener vd., 2013). *O. formigenes*'in oksalat metabolizmasında etkin rol almasına karşın kolonizasyonda stabil olmaması, çevresel etmenler ve antibiyotik kullanımı gibi durumlara *O. formigenes*'in duyarlı olmasından dolayı günümüzde yeni probiyotiklerin araştırılması ve kullanılması alternatifine yönelinmişlerdir (Lange vd., 2012). *Lactobacillus*' ların bağırsakta kolonize olması ve oksalat parçalayabilme yeteneklerinin belirlenmesinden sonra, probiyotiklerin de böbrek taşı tedavisinde kullanılabileceği üzerine atılan fikir ve çalışmalarla nefroloji ve üroloji bilimlerine yeni bir tedavi yöntemi olarak ilgi çekici bir hal almıştır. Campieri vd., (2001) ve Weese vd., (2004) çalışmalarında *O. formigenes* 'in yüksek degradasyon yeteneğine rağmen canlılıklarını bağırsak florasında koruyamamasından ve süreklilik arz etmemesinden dolayı günlük gıdalarla aldığımız oksalatın degradasyonu için probiyotikler, *O. formigenes* ' e alternatif bir yöntem olarak önerilmiştir (Sidhu vd., 1999 , Parvez vd., 2006). Laktobasiller ve bifidobakteriler insanların gastrointestinal sistemindeki mikrobiotadan yaygın olarak bulunurlar. Özellikle immun sistem ve bağışıklık üzerine etkileri olmak üzere insan sağlığı için probiyotik olarak birçok işleve sahiptirler (Ouwehand vd., 2002 , Gill ve Guarner, 2004). Probiyotiklerin insanlarda kolonizasyonu doğumdan itibaren 3 yaşına kadar doğal yollarla gerçekleşmektedir. Probiyotikler; bebek diyarelerinde, alerjik vakalarda, irritabl bağırsak sendromu, yetişkin diyare ve konstipasyonlarında aktif tedavi yöntemi ya da takviye edici gıda olarak günümüzde kullanılmaktadır (Bourlioux vd., 2003). *Laktobacillus*'ların oksalat degradasyon yetenekleri üzerine yapılan çalışmalarda idiyopatik oksalat ürolitiazis ve hiperoksalüri hastalarında üriner oksalat salınımının azaltılmasında probiyotik olarak *Laktobacillus* 'ların kullanılabileceği gösterilmiştir (Sidhu vd., 1999, Federici vd., 2004, Azcarate-Peril vd., 2006).

Bu çalışmada kullanılan suşlar probiyotik bakteride olması gereken; asit üretimi, antimikrobiyal aktivite, antikolesteromik aktivite, otoagregasyon, koagregasyon ve antibiyotiklere direnç aktiviteleri çalışılmış olan 38 suş arasından seçilen *Lactobacillus*

cinsine ait 16 suş ve iki referans kültür ile yürütülmüştür. Öncelikle *Lactobacillus*'lerin kolona ulaşip oksalatı degrade edebilmeleri için gastrointestinal sistem koşullarına toleransı araştırılarak, EPS üretimleri belirlenmiş, EPS'nin bu koşullardaki koruyucu rolü araştırılmıştır. Yüksek oksalat konsantrasyonunun 16 suş üzerindeki ve EPS üretimleri üzerindeki toksik etkisi belirlenmiştir. *Lactobacillus*'lerin oksalat degradasyonu üzerinde daha önce yapılan çalışmalardan farklı olarak bu çalışmada EPS'nin oksalat degradasyonu yapan suşlarda koruyucu rolü olabileceği hipotezini önermekteyiz.

Kolon, insan vücudunda temel enerji kaynaklarında da olduğu gibi oksalat absorpsiyonunun yapıldığı temel bölgedir. Bu nedenle oksalat degradasyonu aktivitesi göstermesi için kullanılacak probiyotiklerin gastrointestinal sistemde mide-safra salgılarına dirençli olması ve geçici de olsa kolonda kolonize olması gerekmektedir (Murphy vd., 2009, Lewanika vd., 2007). Mikroorganizmaların probiyotik olarak nitelendirilebilmesi için mide-bağırsak sisteminde canlı kalarak mide ortamının pH değerine direnç gösterip, safra salgısının yoğunluk gösterdiği sindirim sisteminin jujenum ve duodenum bölgelerinden geçebilmesi gerekmektedir (Vernazza vd., 2005). Pankreatin ve safra tuzlarının varlığı bakterilere ince bağırsak girişinde olumsuz etki yaratmasından dolayı mikroorganizmaların önünde bir engel teşkil etmektedir (Masco vd., 2007). Safra, karaciğerdeki lipoproteinler kullanılarak sentezlenen ve safra kesesinde depolanan, motilitede ihtiyaç halinde jujenuma salgılanır (Mathara vd., 2008, Begley vd., 2006). Bu salgının sindirim sistemindeki rolü doğal bir arındırıcı görevi görerek yağ içeriğini emülsifiye etmesi ve çözündürmesidir. Yağlara olan etkisinden dolayı bakterilerin hücre zarının yapısına zarar vererek antimikrobiyal etki göstermektedir. Hücre zarı dışında DNA'ya zarar vermesi, bazı peptid ve proteinsel yapıların bozulmasına neden olarak farklı antimikrobiyal ve antiviral etkide de yer almaktadır (Papamanoli vd., 2003).

Papamanoli vd., (2003) %0,1-2,0 aralığında beş farklı safra(oxgall) konsantrasyonunda yaptıkları çalışmada %0,3 safra tuzu konsantrasyonda kültürlerin canlılıklarını devamı konusunda farklılıkların ortaya çıktığını ve %0,3 konsantrasyon değerinin probiyotik bakteri araştırmalarında kullanılabilecek kritik değer olduğunu belirtmişlerdir. Klingberg vd., (2005) %0.3 oranında safra tuzu varlığının inhibe etki gösterebileceğini, ancak test edilen kültürlerin en az %86'sının probiyotik özellik gösterebilmesi için yeterli canlılığını koruduğunu saptamışlardır. Zoral (2013),

yayınlağığı çalışmasında *Lactobacillus* suşlarının %0,3 safra tuzu ihtiya eden besiyerinde canlılık sayımı sonucu canlı kalabilme oranını %76 bulmuştur.

Tez çalıřmasında kullanılan suřların dűřűk pH kořullarına toleransı, pH'sı 2,0 olan MRS ve safraya toleransı, %0,3 oranında safra içeren MRS besiyerlerine 4,11-8,57 log kob/mL ($\sim 10^6$, t=0 izelge 4.1) suřlardan inokűle edilerek belirlenmiřtir. İlk ekimden sonra iki saatlik inkűbasyondan sonra pH:2 ye en yűksek direnç gűsteren suř *L. rhamnosus* ACS5 olarak gűzlemlenmiřtir. Çalıřmada kullanılan 16 farklı *Lactobacillus* suřunun %44'ű pH:2 mide sisteminin asidik ortamının taklit edildiđi besiyerinde geliřim ve direnç gűsteremezken, %56'sında 2,59-5,21 log kob/ml oranında 2 saat boyunca canlılığını sűrdűrműřtur. Laktobasil tűrleri arasında karřılařtırma yapıldıđında, *L. rhamnosus* tűrűne ait bakterilerin %50'si, *L. fermentum* suřlarının %33'ű ve *L. brevis* suřlarının ise %67'si pH:2'de canlılıklarını sűrdűrműřtur. *L.helveticus* tűrűne ait KMP5 ve BT11 suřları ise pH:2'ye direnç sađlayarak canlılık gűstermiřtir.

Test bakterilerinden *L. delbrueckii* DSM 20074 2. saat sonunda pH:2 ortamında canlılığını koruyamazken, *L. acidophilus* NCFM 2,81 log kob/mL miktarında inkűbasyon sonucunda canlılık gűstermiřtir. Genel olarak tűm bakteriler 2 saat sonunda safra direnci gűstermiřlerdir. Deney sonuçları, *L. rhamnosus* ACS5, SMC5, *L. fermentum* ECP22, *L. helveticus* KMP5, BT11, *L. brevis* KMP1 ve BP8 suřlarının hem asitli (2,59-5.21 log kob/mL) hem de safralı (5,99-8,57 log kob/mL) ortamlarda canlılıklarını sűrdűrerek gastrointestinal sistem kořullarına dirençli suřlar olduđunu gűstermiřtir. Mishra ve Prasad (2005)'ın çalıřmasında yer alan 7 LAB'sinden yalnız 3'űnűn pH 2,0 veya 3,0'e dirençlilik gűsterdiđi belirtilmiřtir (Mishra ve Prasad, 2005). Bir diđer çalıřmada, 44 farklı *Lactobacillus* suřunun mide ortamındaki asit duyarlılıđı test edilmiřtir ve pH 2.5'te herhangi bir suřta űreme ve canlılık gűzlemlenmemiřtir (Jacobsen vd., 1999). Probiyotik bakterilerin canlılık oranındaki dűřűřűn pepsin ve/veya yűksek pH deđerinin birlikte inhibe etmesi olabilir. Bu olumsuz ortam kořullarına rađmen diđer taraftan, sűt proteinleri probiyotikler űzerinde koruyucu etki gűsterip, midenin asidik ortamında bakterilerin canlılıklarını sűrdűrmelerini sađlayabilmektedir. Bu yűzden, probiyotik bakterilerin genellikle sűt ve sűt űrűnleri veya hayvansal gıdalar ile birlikte tűketildiđinde daha etkili oldukları bildirilmiřtir (Fernandez vd., 2003).

Haller vd., (2001) tarafından yapılan bir çalışmada çeşitli kaynaklardan izolasyonu sağlanan *Lactobacillus* cinsine ait suşların pH:2'de canlılıklarını %0-93 oranında

koruduğu bildirilmiştir. Bu çalışmaya göre farklı türlerin hatta aynı türe ait suşların bile pH dirençlerinin farklı olmasının sebebinin bakterilerin üreme evresindeki farklılıklardan kaynaklandığı belirtilmiştir. Pereira ve Gibson (2002) insan gaitasından izolasyonunu sağladıkları *L. fermentum* KC5b suşunun pH 2 olarak ayarlanmış besiyerine inoküle edilmesinden sonra 120 dakikalık inkübasyon süresinin sonunda canlılığını koruyabildiği belirlenmiştir. Murphy vd., (2009) kedi ve köpeklerin bağırsağından izole ettikleri *L. animalis* ve *L. murinus* türlerinin pH 2.5'te 0, 30, 60, 120, 180 ve 360. zamanlarındaki (dk) canlılıklarını araştırmışlar ve bu pH değerinde yaklaşık hücre miktarını 10^8 kob/mL bulmuşlar ve seçilen tüm probiyotik suşların insan midesinden başarıyla geçebilecek potansiyele sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Bakterilerin, probiyotik olarak değerlendirilebilmesi ve mide bağırsak sistemi boyunca canlılığını koruyabilmesi ve asit, safra ortamlarında direnç gösterebilmesi için eksopolisakkarit üretim miktarları oldukça önemlidir. EPS üretimi, bakteriyi sıvı kaybına, bakteriyofajlara, fagositoza, makrofajlara, bakteriyofajlara, antibiyotik ve sistem boyunca bulunan toksik diğer bileşiklere karşı koruduğu bilinmektedir (Tyvaert vd., 2006).

Deneylerimizde Türkiye'nin çeşitli bölgelerindeki doğal peynirlerden izole edilen 16 *Lactobacillus* suşunun EPS üretimlerinin oksalatlı ve normal besiyerlerindeki miktar tayinleri yapılarak gastrointestinal sistem koşullarına karşı koruyucu rolü belirlenmiştir. Deneyleri yapılan *Lactobacillus* suşlarının oksalatsız ortamda, ortalama EPS üretimlerinin, *L. rhamnosus* 149,12 mg/L, *L. fermentum* 126,96 mg/L, *L. brevis* 104,43 mg/L, *L. helveticus* 100,44 mg/L olarak belirlenmiştir. Asit ve safra ortamından elde edilen log kob/ml değerleri ile EPS üretimi arasındaki ilişki Pearson korelasyonuna göre değerlendirilmiştir. Asit ve safraya direnç ile EPS üretimi arasında istatistiksel bir ilişki belirlenememiştir. Ancak asit ve safraya dirençli olarak belirlenen SFP6, NCFM, BTM1, FKK2 suşlarının EPS üretimlerinin de yüksek olduğu gözlenmiştir. Asit ve safraya duyarlı olarak belirlenen ACS5 suşunun EPS üretiminin de düşük olduğu (180,01 mg/L) tespit edilmiştir. Suzuki ve diğerleri (2013), yaptıkları çalışmada farklı EPS üretim yeteneğine sahip *L. brevis* KB290 ve KB392 suşlarının canlılıklarının yapay mide ve bağırsak sıvılarında yapılan çalışmada, EPS üretimi yüksek olan KB290 suşunun canlılığının EPS üretim yeteneği düşük olan KB392'den yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir (Suzuki vd., 2013). Pham, vd., (2000) yaptıkları çalışmada glukoz (20 g/L) ilave edilen temel besiyerine inoküle edilen *L. rhamnosus* R suşunun, 15 saatlik inkübasyon süresinde gelişimi (kob ve OD) ile EPS üretimin

arasında anlamlı derecede paralellik gösterdiği, 21 saat süren inkübasyon sonunda ise EPS üretimlerinin 438 mg/L olduğunu bildirmişlerdir.

Zhang vd., (2016) yaptıkları çalışmada *L. rhamnosus* GG suşundan 229,3±0.008 kDa moleküler ağırlığa sahip ramnoz, N-asetil-D-glikoz amin ve galaktoz monomerlerinden oluşan EPS izole etmişlerdir. Shi vd., (2014), yaptıkları çalışmada *L. fermentum* TDS030603 suşunun MRS besiyerinde EPS üretimi 113 mg/L olarak belirlemişler, besiyerine glikoz ve amonyum sitrat eklenmesi durumunda EPS üretiminin arttığını gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar EPS üretimlerinin türler ve hatta suşlar arasında farklı olmasında, fermantasyon şartlarının (sıcaklık, inkübasyon, süre ve pH) ve besiyeri bileşenlerinin (nitrojen ve karbon kaynağı) etkili olabileceğini bildirmişlerdir (Desai vd., 2006 , Sanchez vd., 2006).

Oksalat degradasyon çalışmalarından önce oksalatın, *Lactobacillus* sp. suşlarının canlılıkları ve EPS üretimleri üzerindeki toksik etkisi 20 mM sodyum oksalat içeren MRS-ox ortamında çalışılmıştır. Test bakterileri de dâhil tüm suşların 20 mM sodyum oksalat içeren MRS besi ortamında geliştikleri gözlenmiştir. Genel olarak suşların MRS-ox'taki gelişimleri kontrol grubuna göre düşük oranda azalma göstermiştir. 20 mM oksalat içeren ortamda suşların ortalama canlılıkları; *L. rhamnosus*'larda 4,98 log kob/ml (kontrol 9,92 log kob/mL), *L. fermentum*'larda 6,24 log kob/mL (kontrol 6,69 log kob/mL), *L. brevis*'lerde 5,37 log kob/mL (kontrol 5,57 log kob/mL) ve *L. helveticus*da ise 7,60 log kob/ml (kontrol 6,32 log kob/mL) olduğu tespit edilmiştir. One-Way Anova programından elde edilen sonuçlar incelendiğinde; *L. helveticus* suşlarının oksalatlı ortama en dirençli suşlar olduğu belirlenmiştir. Oksalat degradasyonunun negatif olduğu bilinen *L. delbrueckii* DSM 20074'ün oksalata direncinin de düşük olduğu ancak oksalat degradasyonu pozitif olan *L. acidophilus* NCFM suşunun ise oksalata dirençli olduğu fakat bu direncin kullanılan 16 laktobasil suşu ile karşılaştırıldığında düşük olduğu belirlenmiştir. İstatistiksel analizlerde farklı türlerin log kob/ml ($P=0,02<0,05$) ve son kültür pH değerlerinin ($P=0,00<0,05$) ortalamaları arasındaki farkın anlamlı olduğu belirlenmiştir. Pearson korelasyonuna göre *Lactobacillus* suşlarının EPS üretimleri ile oksalata dirençlilikleri arasındaki ilişki anlamlı bulunmuştur ($r=0,491$, $P=0,039<0,05$). Asit ve safraya dirençli, EPS üretimi yüksek olarak belirlenen *L. rhamnosus* ACS5, SMC5, *L. fermentum* ECP22, *L. helveticus* KMP5, BT11, *L. brevis* KMP1 ve BP8 suşlarının oksalat dirençliliklerinin de yüksek olduğu gözlenmiştir. Campieri ve diğerleri (2001), 20 mM amonyum oksalat içeren MRS ortamında canlılıkları *L. plantarum*'larda 230×10^6

kob/mL (=log 8,36 kob/ml), *L. brevis*' lerde 120×10^6 kob/mL (=8,08 log kob/mL) ve *L. acidophilus*'larda ise 52×10^6 kob/mL (=8,72 log kob/mL) olarak tespit etmişlerdir. Ren vd., (2011), bakteriyel gelişim ve oksalat degradasyon yeteneği arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak farklı olduğunu, 8 suşta $P < 0,05$ ve $P < 0,01$ düzeyinde pozitif bir ilişki olduğunu ancak beş suş ve bunların karışık kültürlerinde ise canlılık sayımları ile degradasyon düzeyi arasında korelasyon olmadığını belirlemişlerdir. Bu araştırmacılar canlılık ile degradasyon arasındaki ilişkinin suşa bağlı olduğunu bildirmişlerdir (Ren vd., 2011).

Turroni vd., (2007), test ettikleri 12 farklı tür içeren 60 *Lactobacillus* suşlarından 30'unda oksalat degradasyon aktivitesi belirlemişlerdir. Bu araştırmacılar 5 mM oksalatın degradasyonunu Trinity Biotech kiti ile *L. acidophilus*'ta %100, *L. casei*'de %20-40, *L. rhamnosus*' ta %20-47 olarak gözlemlerken, *L. brevis* ve *L. helveticus*' ta ise degradasyon aktivitesi gözlemleyememişlerdir. Aynı araştırmacılar; *L. plantarum* suşlarının deneylerinde oksalat degradasyonunda heterojen bir sonuç elde etmişler, dört suşun oksalat degradasyon aktivitesi göstermediği genom analizleri ile doğrulanırken, üç suşun %40 oranlarında oksalat degradasyonu gösterdiğini belirlemişlerdir. *L. reuteri*'nin bazı suşlarında oksalat degradasyonu gözlemlenmezken, bazı suşlarında genom analizleri ile *oxc* geni tespit edilmiştir. Turroni vd., (2007), çalışmalarından elde edilen sonuçlar, Azcarate-Peril vd., (2006)'nin önermiş oldukları hipotezi desteklemektedir. Bu hipoteze göre oksalat degradasyonu ile ilgili genler *Lactobacillus*'larda yatay gen transferi ile aktarılabilmektedir.

Çalışmada 10 mM MRS-ox ortamında geliştirilen suşların son kültür pH değeri de 4,41-4,69 aralığında değişim göstermiştir. Turroni vd., (2010), Lewanika vd., (2007) ile Azcarate-Peril vd., (2006), yaptıkları çalışmalarda, *B. animalis* subsp. *lactis*, *L. gasseri* ve *L. acidophilus* suşlarının pH kontrollü ortamda oksalat degradasyon aktivitelerini araştırdıklarında pH 4,5'te oksalat degradasyon aktivitelerinin arttığını ve oksalatlı ortamdaki preadaptasyonun da degradasyonu arttırdığını bildirmişlerdir. Gıdalardan alınan oksalik asit miktarına bağlı olarak bağırsaklarda iyonlarla birleşerek oluşan oksalat tuzlarının, mikrovilluslardan emilimi ve birikimi sonucu hiperoksalüri durumuna bağlı olarak bağırsak ve böbreklerde bir dizi rahatsızlıklar gözlemlenmektedir. Bu nedenle çalışmaya güncel literatürde belirlenen 10 mM oksalat dozu ile başlanmış ve daha sonra oksalat konsantrasyonu iki kat artırılarak 20 mM MRS-ox ortamında suşların degradasyonları araştırılmıştır. Laktobasillerin 20 mM

sodyum oksalatı degradasyonu çalışmasında, 20 mM sodyum oksalatlı ortamda gelişen kültürlerin canlılıklarını, kültür yoğunluklarını ve ortamın pH'sını değerlendirmek ve kontrolle karşılaştırmak için ölçümler yapılmış, degradasyon sonuçları ile birlikte Çizelge 4.6' da verilmiştir.

Suşların 20 mM sodyum oksalatlı ortamdaki canlılıkları ile oksalat degradasyonu, EPS üretimi ile oksalat degradasyonu arasında istatistiksel bir ilişki belirlenememekle birlikte, yüksek EPS üretimi gösteren *L. rhamnosus* SMC5 (%32,54), *L. brevis* KMP1, (%45,15), *L. brevis* BP8, (%39,29) ve *L. helveticus* BT11 (%34,32) suşlarının 20 mM sodyum oksalatı da diğer suşlara göre daha yüksek oranda degrade edebildiği gözlenmektedir. Düşük EPS üretimi gösteren *L. rhamnosus* BT8 suşunun oksalat degradasyonunun da düşük olduğu tespit edilmiştir. Ortamda oksalat konsantrasyonunun artmasına paralel olarak degradasyon oranında azalma tespit edilmiştir. 20 mM ile 10 mM sodyum oksalat degradasyon sonuçları arasında istatistiksel olarak da $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı pozitif bir ilişki bulunmuştur. 20 mM sodyum oksalatlı ortamda geliştirilen suşların son kültür pH değerleri ise 4,22-4,56 aralığında belirlenmiştir. Proksimal kolon lümeninin pH'sının (yaklaşık 5,5 ile 6,5) bu bölgede bulunan sakkarolitik mikroorganizmalardan dolayı, distal kolunun pH'sından (6,5 ile 7,0) düşük olduğu bildirilmiştir. Her iki bölgede de fermente edilebilir ancak sindirilmeyen besinlerin geçişi sırasında ve lokal olarak pH düşebilmektedir (Desai vd., 2006). Turroni vd., (2010), *B. animalis. lactis*' in oksalat katabolizmasında yer alan genlerin ve bunların transkripsiyonel aktivitesinin pH değeri ile ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. Murphy vd. (2009), 20 mM amoyum oksalat içeren MRS-ox ortamında test ettikleri 13 bifidobakteri ve 18 laktobasil suşunun, ortalama $2,3 \times 10^8$ kob/mL canlılık göstererek oksalatın toksik etkisi olmadığını ve oksalat degradasyonunun ise suşa bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar 20 mM MRS-ox besi ortamında bifidobakterilerin tamamının ve laktobasilerden ise *L. acidophilus*, *L. reuteri* ve *L. salivarius* suşlarının oksalatı degrade edemediğini, ancak *L. animalis* ve *L. murinus*'un degradasyonlarının anlamlı derecede yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Campieri vd., (2001) araştırmalarında bakteriyel gelişim ve degradasyon arasında ilişki bulunmadığını, *L. acidophilus*, *S. thermophilus* ve *B. infantis* suşlarının 20 mM MRS-ox ortamında düşük gelişim göstermelerine rağmen oksalatı degrade edebildiklerini (%3,06, %3,41 ve %2,18) savunmuşlardır. Ren vd., (2011) çalışmalarında ise 20 g/L glikoz ilave edilen MRS-ox ortamında *E. faecium* (%40,75), *E. faecalis* (%34,87), *L. lactis* (%24,8), *L. garvieae* (%28,4), *L.*

mesenteroides (%14,48) suşlarında degradasyon aktivitesi belirlemişlerdir. Ren vd., (2011), bakteriyel gelişme ve degradasyon arasındaki ilişkinin değişken olduğunu; bazı suşlarda ve karışık kültürde pozitif ilişki bulunduğunu, diğerlerinde herhangi bir korelasyon bulunmadığını bildirmişlerdir. Çalışmayı burada verilen çalışmalar ile karşılaştırdığımızda; kullanılan suşlarda da bakteriyel gelişme ve degradasyon arasında ilişki belirlenmemesi ve pH'ın 4.38-4.53 arasında olması açısından paralellik göstermektedir. Yapılan çalışmalardan farklı olarak EPS'nin suşları oksalatın toksik etkisinden koruduğunu ve daha fazla oksalat bağlayarak degradasyonu arttıracaklarını önermiştik. İstatistiksel olarak bir ilişki olmamakla birlikte sonuçları karşılaştırdığımızda EPS üretimi yüksek olan *L. rhamnosus* SMC5 (%32,54), *L. brevis* KMP1, (%45,15), *L. brevis* BP8, (%39,29) ve *L. helveticus* BT11 (%34,32) suşlarının degradasyonunun da yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak yapılmış olan çalışmada oksalat degradasyon aktivitesi bakımından test edilen ve probiyotik olarak kullanılabilecek peynir kökenli 3 suşun (*L. helveticus* BT11, *L. brevis* KMP1 ve *L. rhamnosus* SMC5) sodyum oksalatı yüksek oranda degrade ettiği belirlenmiştir. Bu suşlar arasından *L. brevis* KMP1 suşu diğer suşlara göre daha yüksek oksalat degradasyon aktivitesi göstermiştir.

Böbrek taşı tedavisinde uygulanan yöntemler: şok dalgaları ile taş kırma, endoskopik üreter taş tedavisi, perkütan nefrolitotomi ve açıktan cerrahi gibi hastaya acı veren farklı metotlardır. Ayrıca bu metodların uygulanmasına rağmen tekrarlayan nefrolitiyazisi olan hastaların çoğunlukta olması sebebiyle bakterilerin konakta oksalat dengesini düzenlemek için oksalatı parçalayarak plasma ve idrardaki konsantrasyonunu düşüren probiyotikler bu gibi hastalıkların tedavisinde umut verici uygulamalardır. Gelecek çalışmalarda, laktobasillerin farklı probiyotikler içeren ortamlarda, bireysel ya da kombine kültürlerinin oksalat degradasyon aktivitelerinin *in vitro* çalışmaların yanı sıra *in vivo* çalışmalarla da desteklenmesi önerilebilir. Ayrıca; yüksek performans gösteren suşların, oksalat degradasyonunda temel bakteri olan *O. formigenes*'in oksalat degradasyonunda görev alan enzimleri kodlayan genlerle benzerlik gösterip göstermediği moleküler analizlerle test edilebilir. Sağlıklı bir biotanın varlığı insan sağlığında hayati önem arz etmesinden dolayı çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların gelecek dönemdeki probiyotik çalışmalara katkı sağlayacağı ve aktif probiyotik özellik gösteren kültürlerin başta insan sağlığı olmak üzere çeşitli alanlarda ticari preparatlar halinde kullanıma sunulabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Al-Wahsh, I., Wu, Y. ve Liebman, M., (2012). Acute probiotic ingestion reduces gastrointestinal oxalate absorption in healthy subjects, *Urological Research*, 40, 3, 191-196.
- Alenezi, H. ve Denstedt, J.D., (2015). Flexible ureteroscopy: Technological advancements, current indications and outcomes in the treatment of urolithiasis, *Asian Journal of Urology*, 2, 3, 133-141.
- Alenezi, H., Eltiraifi, A.E. ve Alomar, M., (2015). Minimally invasive surgery for the treatment of ureteral stump syndrome, *Urology Annals*, 7, 4, 454.
- Allison, M. J., MacGregor, B. J., Sharp, R. and Stahl, D. A. (2015). *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*. Published Online: Published by John Wiley & Sons.
- Allison, M.J., Cook, H.M., Milne, D.B., Gallagher, S., Clayman, R.V., (1986). Oxalate degradation by gastrointestinal bacteria from humans, *The Journal of Nutrition*, 116, 3, 455-460.
- Allison, M.J., Dawson, K.A., Mayberry, W.R., Foss, J.G., (1985). *Oxalobacter formigenes* gen. nov., sp. nov.: oxalate-degrading anaerobes that inhabit the gastrointestinal tract, *Archives of Microbiology*, 141, 1, 1-7.
- Arunachalam, K.D., (1999). Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology, *Nutrition Research*, 19, 10, 1559-1597.
- Aso, Y. ve Akazan, H., (1992). Prophylactic effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer, *Urologia Internationalis*, 49, 3, 125-129.
- Ayhan, K., (2000). Gıdalarda bulunan mikroorganizmalar, Alınmıştır, "Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları" Sim Matbaacılık, 2.
- Azcarate-Peril, M.A., Bruno-Bárcena, J.M., Hassan, H.M., Klaenhammer, T.R., (2006). Transcriptional and functional analysis of oxalyl-coenzyme A (CoA) decarboxylase and formyl-CoA transferase genes from *Lactobacillus acidophilus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3, 1891-1899.
- Begley, M., Hill, C. ve Gahan, C.G., (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics, *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3, 1729-1738.
- Bourlioux, P., Koletzko, B., Guarner, F., Braesco, V., (2003). The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine," held in Paris, June 14, 2002, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 4, 675-683.
- Böke, H. (2005). *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* Türüne Ait Suşların Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi ve Tutuklamanın Bu Özellikler Üzerine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 4-52.
- Bozkurt, H. ve Aslım, B., (2004). İmmobilizasyonun Probiyotik Kültürlerde Kullanımı, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 2, 7, 1-14.

- Campieri, C., Campieri, M., Bertuzzi, V., Swennen, E., Matteuzzi, D., Stefoni, S., Pirovano, F., Centi, C., Ulisse, S., Famularo, G., (2001). Reduction of oxaluria after an oral course of lactic acid bacteria at high concentration, *Kidney International*, 60, 3, 1097-1105.
- Cerning, J., (1995). Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria, *Le lait*, 75, 4-5, 463-472.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.K., (2000). Effect of conjugated bile salts on antibiotic susceptibility of bile salt-tolerant *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* isolates, *Journal of food protection*, 63, 10, 1369-1376.
- Cummings, J. ve Macfarlane, G., (1997). Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism, *Clinical Nutrition*, 16, 1, 3-11.
- Çakır, İ., (2003). *Lactobacillus* ve *Bifidobacter*'lerde bazı probiyotik özelliklerin incelenmesi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Ankara.
- Desai, K., Akolkar, S., Badhe, Y., Tambe, S., Lele, S., (2006). Optimization of fermentation media for exopolysaccharide production from *Lactobacillus plantarum* using artificial intelligence-based techniques, *Process Biochemistry*, 41, 8, 1842-1848.
- Donohue, D. ve Salminen, S., (1996). Safety of probiotic bacteria, *Asia pacific journal of clinical nutrition*, 5, 25-28.
- Duboc, P. ve Mollet, B., (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry, *International Dairy Journal*, 11, 9, 759-768.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.t., Smith, F., (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical chemistry*, 28, 3, 350-356.
- Federici, F., Vitali, B., Gotti, R., Pasca, M.R., Gobbi, S., Peck, A.B., Brigidi, P., (2004). Characterization and heterologous expression of the oxalyl coenzyme A decarboxylase gene from *Bifidobacterium lactis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 9, 5066-5073.
- Ferraz, R. R. N., Marques, N. C., Froeder, L., Menon, V. B., Siliano, P. R., Baxmann, A. C. and Heilberg, I. P. (2009). Effects of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium breve* on urinary oxalate excretion in nephrolithiasis patients. *Urological Research*, 37, 95-100.
- Fernández, M.F., Boris, S., Barbes, C., (2003). Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract, *Journal of Applied Microbiology*, 94, 3, 449-455.
- Flickinger, E. ve Fahey, G., (2002). Pet food and feed applications of inulin, oligofructose and other oligosaccharides, *British Journal of Nutrition*, 87, S2, S297-S300.
- Garssen, J., Herreilers, M., Van Loveren, H., Vos, J., (2004). Immunomodulation by probiotics: a literature survey. *RIVM rapport 340320001*, 6-33.
- Gibson, G.R. ve Roberfroid, M.B., (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics, *The Journal of Nutrition*, 125, 6, 1401-1412.
- Gill, H. ve Guarner, F., (2004). Probiotics and human health: a clinical perspective, *Postgraduate Medical Journal*, 80, 947, 516-526.
- Goldfarb, D.S., Modersitzki, F. ve Asplin, J.R., (2007). A randomized, controlled trial of lactic acid bacteria for idiopathic hyperoxaluria, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2, 4, 745-749.

- Gomes, A.M. ve Malcata, F.X., (1999). *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics, Trends in Food Science & Technology, 10, 4-5, 139-157.
- Gontzea, I. ve Sutzescu, P., (1968). Natural antinutritive substances in foodstuffs and forages, Natural antinutritive substances in foodstuffs and forages.
- Haller, D., Colbus, H., Gänzle, M., Scherenbacher, P., Bode, C., Hammes, W., (2001). Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastrointestinal ecosystem: a comparative in vitro study between bacteria of intestinal and fermented food origin, Systematic and Applied Microbiology, 24, 2, 218-226.
- Hatch, M. ve Freel, R., (1995). Alterations in intestinal transport of oxalate in disease states, Scanning microscopy, 9, 4, 1121-1126; discussion 1126.
- Hoffer, L., Levine, M., Assouline, S., Melnychuk, D., Padayatty, S., Rosadiuk, K., Rousseau, C., Robitaille, L., Miller Jr, W., (2008). Phase I clinical trial of iv ascorbic acid in advanced malignancy, Annals of Oncology, 19, 11, 1969-1974.
- Hofvendahl, K. ve Hahn-Hägerdal, B., (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources1, Enzyme and Microbial Technology, 26, 2-4, 87-107.
- Hokama, S., Honma, Y., Toma, C., Ogawa, Y., (2000). Oxalate-degrading *Enterococcus faecalis*, Microbiology and immunology, 44, 4, 235-240.
- Hokama, S., Toma, C., Iwanaga, M., Morozumi, M., Sugaya, K., Ogawa, Y., (2005). Oxalate-degrading *Providencia rettgeri* isolated from human stools, International Journal of Urology, 12, 6, 533-538.
- Holmes, R.P. ve Kennedy, M., (2000). Estimation of the oxalate content of foods and daily oxalate intake, Kidney international, 57, 4, 1662-1667.
- Holzapfel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., (1998). Overview of gut flora and probiotics, International journal of food microbiology, 41, 2, 85-101.
- Hove, H., Nørgaard, H., Mortensen, P.B., (1999). Lactic acid bacteria and the human gastrointestinal tract, European Journal of Clinical Nutrition, 53, 5, 339.
- Huang, Y. ve Adams, M.C., (2004). *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria, International Journal of Food Microbiology, 91, 3, 253-260.
- Isolauri, E., Salminen, S. ve Ouwehand, A.C., (2004). Probiotics, Best practice & research Clinical gastroenterology, 18, 2, 299-313.
- Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H., Salminen, S., (2001). Probiotics: effects on immunity-, The American journal of clinical nutrition, 73, 2, 444s-450s.
- Jacobsen, C.N., Nielsen, V.R., Hayford, A., Møller, P.L., Michaelsen, K., Paerregaard, A., Sandström, B., Tvede, M., Jakobsen, M., (1999). Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans, Applied and Environmental Microbiology, 65, 11, 4949-4956.
- James, L.F., (1972). Oxalate toxicosis, Clinical Toxicology, 5, 2, 231-243.
- Jan, G., Leverrier, P., Proudly, I., Roland, N., (2002). Survival and beneficial effects of propionibacteria in the human gut: *in vivo* and *in vitro* investigations, Le Lait, 82, 1, 131-144.
- Jiang, J., Knight, J., Easter, L.H., Neiberg, R., Holmes, R.P., Assimos, D.G., (2011). Impact of dietary calcium and oxalate, and *Oxalobacter formigenes*

- colonization on urinary oxalate excretion, *The Journal of Urology*, 186, 1, 135-139.
- Karahan, Z.C. ve Güvener, E., "Probiotics", *J. Infections Diseases and Clinical Microbiol.*, 4(3): 156-162 (1999).
- Kaur, I.P., Chopra, K. ve Saini, A., (2002). Probiotics: potential pharmaceutical applications, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15, 1, 1-9.
- Klaenhammer, T.R. ve Kullen, M.J., (1999). Selection and design of probiotics, *International Journal of Food Microbiology*, 50, 1-2, 45-57.
- Klingberg, T.D., Axelsson, L., Naterstad, K., Elsser, D., Budde, B.B., (2005). Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages, *International Journal of Food Microbiology*, 105, 3, 419-431.
- Kos, B., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., Matošić, S., (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92, *Journal of Applied Microbiology*, 94, 6, 981-987.
- Kšonžeková, P., Bystrický, P., Vlčková, S., Pätoprstý, V., Pulzová, L., Mudroňová, D., Kubašková, T., Csank, T., Tkáčiková, L., (2016). Exopolysaccharides of *Lactobacillus reuteri*: their influence on adherence of *E. coli* to epithelial cells and inflammatory response, *Carbohydrate polymers*, 141, 10-19.
- Lange, J.N., Wood, K.D., Wong, H., Otto, R., Mufarrij, P.W., Knight, J., Akpınar, H., Holmes, R.P., Assimios, D.G., (2012). Sensitivity of human strains of *Oxalobacter formigenes* to commonly prescribed antibiotics, *Urology*, 79, 6, 1286-1289.
- Leigh, J.A. ve Walker, G.C., (1994). Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function, *Trends in Genetics*, 10, 2, 63-67.
- Lewanika, T.R., Reid, S.J., Abratt, V.R., Macfarlane, G.T., Macfarlane, S., (2007). *Lactobacillus gasser* Gasser AM63T degrades oxalate in a multistage continuous culture simulator of the human colonic microbiota, *FEMS microbiology ecology*, 61, 1, 110-120.
- Li, C., Li, W., Chen, X., Feng, M., Rui, X., Jiang, M., 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, 2, 477-485.
- Li, W., Mutuvulla, M., Chen, X., Jiang, M., 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, 3, 497-505.
- Liebman, M. ve Al-Wahsh, I.A., (2011). Probiotics and other key determinants of dietary oxalate absorption, *Advances in Nutrition*, 2, 3, 254-260.
- Lieske, J.C., Goldfarb, D.S., De Simone, C., Regnier, C., (2005). Use of a probiotic to decrease enteric hyperoxaluria, *Kidney international*, 68, 3, 1244-1249.
- Ma, H., (2004). Concept and protocol to isolate cholesterol-reducing bacteria from carnivores, *Nat Sci*, 2, 11-17.
- Marshall, V.M. ve Rawson, H., (1999). Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt, *International journal of food science & technology*, 34, 2, 137-143.
- Marteau, P. R., Vrese, M., Cellier, J. C. and Schrezenmeir, J. (2001). Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 430-436.

- Masco, L., Crockaert, C., Van Hoorde, K., Swings, J., Huys, G., (2007). In vitro assessment of the gastrointestinal transit tolerance of taxonomic reference strains from human origin and probiotic product isolates of *Bifidobacterium*, Journal of dairy science, 90, 8, 3572-3578.
- Mathara, J.M., Schillinger, U., Kutima, P.M., Mbugua, S.K., Guigas, C., Franz, C., Holzapfel, W.H., (2008). Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Maasai traditional fermented milk products in Kenya, Current Microbiology, 56, 4, 315-321.
- Meena, B., Padma Umopathy, K., Pankaja, N., Prakash, J., (1987). Soluble and insoluble oxalates in selected foods, Journal of Food Science and Technology, 24, 1, 43-44.
- Mishra, V. ve Prasad, D., (2005). Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics, International Journal of Food Microbiology, 103, 1, 109-115.
- Morozumi, M., Yamaguchi, K., Ogawa, Y. and Kitagawa, R. (1987). Oxalate metabolism in stone formers. Kidney Dial 23, 332-337.
- Murphy, C., Murphy, S., O'Brien, F., O'Donoghue, M., Boileau, T., Sunvold, G., Reinhart, G., Kiely, B., Shanahan, F., O'Mahony, L., (2009). Metabolic activity of probiotics—oxalate degradation, Veterinary Microbiology, 136, 1-2, 100-107.
- Müslümanoğlu, A.Y. ve Tepeler, A., (2008). Renal kolik, tani ve tedavisi, Marmara Medical Journal, 21, 2, 187-192.
- Noonan, S. ve Savage, G., (1999). Oxalate content of foods and its effect on humans, Asia Pacific Journal Of Clinical Nutrition, 8, 1.
- Okombo, J., Liebman, M., (2010). Probiotic-induced reduction of gastrointestinal oxalate absorption in healthy subjects, Urological Research, 38, 3, 169-178.
- Ong, L., Henriksson, A. ve Shah, N., (2006). Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium spp.* and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid, International Dairy Journal, 16, 5, 446-456.
- Ouwehand, A.C., Salminen, S. ve Isolauri, E., (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects, Antonie Van Leeuwenhoek, 82, 1-4, 279-289.
- Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., Kotzekidou, P., (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties, Meat science, 65, 2, 859-867.
- Park, J.S., Wood, P.M., Davies, M.J., Gilbert, B.C., Whitwood, A.C., (1997). A kinetic and ESR investigation of iron (II) oxalate oxidation by hydrogen peroxide and dioxygen as a source of hydroxyl radicals, Free Radical Research, 27, 5, 447-458.
- Parvez, S., Malik, K.A., Ah Kang, S., Kim, H.Y., (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health, Journal of Applied Microbiology, 100, 6, 1171-1185.
- Pereira, D.I. ve Gibson, G.R., (2002). Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut, Applied and Environmental Microbiology, 68, 9, 4689-4693.
- Perrin, S., Warchol, M., Grill, J., Schneider, F., (2001). Fermentations of fructo-oligosaccharides and their components by *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 on batch culture in semi-synthetic medium, Journal of Applied Microbiology, 90, 6, 859-865.

- Pham, P., Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G., Cerning, J., (2000). Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 6, 2302-2310.
- Rasic, J.L. ve Kurmann, J.A., (1978). Yoghurt. Scientific grounds, technology, manufacture and preparations, Yoghurt. Scientific grounds, technology, manufacture and preparations.
- Ren, Z., Pan, C., Jiang, L., Wu, C., Liu, Y., Zhong, Z., Ran, L., Ren, F., Chen, X., Wang, Y., (2011). Oxalate-degrading capacities of lactic acid bacteria in canine feces, *Veterinary Microbiology*, 152, 3-4, 368-373.
- Rolfe, R.D., (2000). The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health, *The Journal of Nutrition*, 130, 2, 396S-402S.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J. ve Zoon, P., (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, *International Dairy Journal*, 12, 2-3, 163-171.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Mättö, J., Mattila-Sandholm, T., (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties, *Journal of Biotechnology*, 84, 3, 197-215.
- Sánchez, J.-I., Martínez, B., Guillén, R., Jiménez-Díaz, R., Rodríguez, A., (2006). Culture conditions determine the balance between two different exopolysaccharides produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26, *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 12, 7495-7502.
- Sanders, M.E., (1999). Probiotics, *Food technology*, 53, 67-77.
- Scardovi, V., “Genus *Bifidobacterium*”. In Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G. (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 7th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 122-136 (1986).
- Shi, T., Aryantini, N.P.D., Uchida, K., Urashima, T., Fukuda, K., (2014). Enhancement of Exopolysaccharide production of *Lactobacillus fermentum* TDS030603 by modifying culture conditions, *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 33, 2, 85-90.
- Shokeir, A.A., (2001). Renal colic: pathophysiology, diagnosis and treatment, *European urology*, 39, 3, 241-249.
- Sidhu, H., Allison, M.J., Chow, J.M., Clark, A., Peck, A.B., (2001). Rapid reversal of hyperoxaluria in a rat model after probiotic administration of *Oxalobacter formigenes*, *The Journal of urology*, 166, 4, 1487-1491.
- Sidhu, H., Enatska, L., Ogden, S., Williams, W.N., Allison, M.J., Peck, A.B., (1997). Evaluating children in the Ukraine for colonization with the intestinal bacterium *Oxalobacter formigenes*, using a polymerase chain reaction-based detection system, *Molecular Diagnosis*, 2, 2, 89-97.
- Sidhu, H., Holmes, R., Allison, M., Peck, A., (1999). Direct Quantification of the Enteric Bacterium *Oxalobacter formigenes* in Human Fecal Samples by Quantitative Competitive-Template PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 5, 1503-1509.
- Sidhu, H., Schmidt, M.E., Cornelius, J.G., Thamilselvan, S., Khan, S.R., Hesse, A., Peck, A.B., (1999). Direct correlation between hyperoxaluria/oxalate stone disease and the absence of the gastrointestinal tract-dwelling bacterium *Oxalobacter formigenes*: possible prevention by gut recolonization or enzyme replacement therapy, *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 10, S334-340.

- Siener, R., Bangen, U., Sidhu, H., Hönow, R., Von Unruh, G., Hesse, A., (2013). The role of *Oxalobacter formigenes* colonization in calcium oxalate stone disease, *Kidney international*, 83, 6, 1144-1149.
- Suomalainen, T., Sigvart-Mattila, P., Mättö, J., Tynkkynen, S., (2008). In vitro and in vivo gastrointestinal survival, antibiotic susceptibility and genetic identification of *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS, *International dairy journal*, 18, 3, 271-278.
- Suzuki, S., Yakabe, T., Suganuma, H., Fukao, M., Saito, T., Yajima, N., (2013). Cell-bound exopolysaccharides of *Lactobacillus brevis* KB290: protective role and monosaccharide composition, *Canadian Journal of Microbiology*, 59, 8, 549-555.
- Tahri, K., Grille, J.P. ve Schneider, F., (1996). Bifidobacteria strain behavior toward cholesterol: coprecipitation with bile salts and assimilation, *Current Microbiology*, 33, 3, 187-193.
- Taylor, G. ve Williams, C.M., (1998). Effects of probiotics and prebiotics on blood lipids, *The British Journal of Nutrition*, 80, 4, S225-230.
- Tintinalli, J., Stapczynski, J., Ma, O., Cline, D., Cydulka, R., Mercler, G., Ürolojik TaÇ hastalığı, *Tintinalli Acil Tıp, Kapsamlı Bir çalışma Kılavuzu*, 7, 651-656.
- Troxel, S.A., Sidhu, H., Kaul, P., Low, R.K., (2004). Intestinal *Oxalobacter formigenes* colonization in calcium oxalate stone formers and its relation to urinary oxalate, *Journal of Endourology*, 17, 3, 173-176.
- Turroni, S., Bendazzoli, C., Dipalo, S.C., Candela, M., Vitali, B., Gotti, R., Brigidi, P., (2010). Oxalate-degrading activity in *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*: impact of acidic conditions on the transcriptional levels of the oxalyl coenzyme A (CoA) decarboxylase and formyl-CoA transferase genes, *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 16, 5609-5620.
- Turroni, S., Vitali, B., Bendazzoli, C., Candela, M., Gotti, R., Federici, F., Pirovano, F., Brigidi, P., (2007). Oxalate consumption by lactobacilli: evaluation of oxalyl-CoA decarboxylase and formyl-CoA transferase activity in *Lactobacillus acidophilus*, *Journal of Applied Microbiology*, 103, 5, 1600-1609.
- Tyvaert, G., Morel, C., Joly, J.-P., Decaris, B., Charron-Bourgoin, F., (2006). The *eps* locus of *Streptococcus thermophilus* IP6756 is not involved in exopolysaccharide production, *International Dairy Journal*, 16, 5, 467-473.
- Weese, J. S., Weese, H. E., Yuricek, L. and Rousseau, J. (2004). Oxalate degradation by intestinal lactic acid bacteria in dogs and cats. *Veterinary Microbiology*, 101, 161-166.
- Vernazza, C., Gibson, G. ve Rastall, R., (2005). *In vitro* fermentation of chitosan derivatives by mixed cultures of human faecal bacteria, *Carbohydrate Polymers*, 60, 4, 539-545.
- Welman, A.D. ve Maddox, I.S., (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges, *Trends in biotechnology*, 21, 6, 269-274.
- Williams, H.E. ve Wandzilak, T.R., (1989). Oxalate synthesis, transport and the hyperoxaluric syndromes, *The Journal of Urology*, 141, 3, 742-747.
- Wollowski, I., Rechkemmer, G. ve Pool-Zobel, B.L., (2001). Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer–, *The American journal of clinical nutrition*, 73, 2, 451s-455s.
- Yücesan, S., (2002). Probiyotikler ve Sağlık üzerine etkileri, *Türkiye Diyetisyenler Derneği Bülteni*, 2, 1-13.

- Zarembski, P. ve Hodgkinson, A., (1962). The oxalic acid content of English diets, Brit. J. Nutrition, 16, 627-634.
- Zhang, Z., Zhou, Z., Li, Y., Zhou, L., Ding, Q., Xu, L., (2016). Isolated exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* GG alleviated adipogenesis mediated by TLR2 in mice, Scientific Reports, 6, 36083.
- Zoral S. (2013). İnsan Kaynaklı *Lactobacillus* spp. Suşlarının Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırşehir, 37-38.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Serdar AKÇA

Doğum Tarihi ve Yeri: 21.07.1988 / Karabük

E-posta adresi : akkaeczanesi@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Gazi Üniversitesi ECZACILIK FAKÜLTESİ / 2011

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

Özet Bildiri / Poster

Akca, S., Sönmez, S., Beyatlı, Y., Önal, Darılmaz, D.,(2016). *Lactobacillus fermentum* Suşlarının Probiyotik ve Bazı Teknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi. I.Uluslararası Turizm ve Mikrobiyal Gıda Kongresi