



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI**

**KONJUGE LİNOLEİK ASİT ÜREten LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN, İZOLASYONU, TANISI VE TARHANA
ÜRETİMİNDE KULLANILMASI**

Doktora Tezi

Koka ZONGO

Danışman
Prof. Dr. Fehmi YAZICI

SAMSUN
2021

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI



**KONJUGE LİNOLEİK ASİT ÜREten LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN, İZOLASYONU, TANISI VE TARHANA
ÜRETİMİNDE KULLANILMASI**

Doktora Tezi

Koka ZONGO

Danışman

Prof. Dr. Fehmi YAZICI

Bu doktora tezi, PYO.MUH. 1904.19.006 Proje No'lu Bilimsel Araştırma Projesi olarak Ondokuz Mayıs Üniversitesi BAP birimi ve Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı ve CV Raman Uluslararası Bursları aracılığıyla Türk ve Hindistan Hükümeti tarafından desteklenmiştir.

SAMSUN
2021

TEZ KABUL VE ONAYI

Koka ZONGO tarafından, **Prof. Dr. Fehmi YAZICI** danışmanlığında hazırlanan “**Konjuge Linoleik Asit Üreten Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Tanısı ve Tarhana Üretiminde Kullanılması**” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 5.5.2021 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	İmza	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Kamil IŞIK Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı		☒ Kabul
			☐ Ret
Üye (Danışman)	Prof. Dr. Fehmi YAZICI Ondokuz Mayıs Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı		☒ Kabul
			☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Ahmet Hilmi ÇON Ondokuz Mayıs Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı		☒ Kabul
			☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Osman GÜL Kastamonu Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği		☒ Kabul
			☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Oğuz AYDEMİR Çankırı Karatekin Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü		☒ Kabul
			☐ Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

ONAY

... / ... / ...

Prof. Dr. Ali BOLAT
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

İmza

05 / 04 / 2021

Koka ZONGO

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı: Konjuge Linoleik Asit Üreten Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Tanısı ve Tarhana Üretiminde Kullanılması

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 05/04/2021 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 7

Tek kaynak oranı : % 1 çıkmıştır.

İmza

05/04/ 2021

Prof. Dr. Fehmi YAZICI

ÖZET

KONJUGE LİNOLEİK ASİT ÜRETEK LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN, İZOLASYONU, TANISI VE TARHANA ÜRETİMİNDE KULLANILMASI

Koka ZONGO

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı

Doktora, Mayıs/2021

Danışman: Prof. Dr. Fehmi YAZICI

Ruminant hayvanlardan elde edilen gıda ürünlerinde yüksek oranda bulunan konjuge linoleik asit (KLA) insanların sağlığı için yararlı çoklu doymamış bir yağ asitidir. KLA meme, kolon kanserleri ile cilt tümörü oluşumları ve diyabetin önlemesi, vücutta yağ birikimi ve ateroskleroz gelişimini azaltması, bağışıklık sistemini modüle etmesi gibi pek çok fonksiyonlara sahiptir. KLA, ruminant kökenli gıda maddelerinde doğal olarak bulunmaktadır. Ayrıca, *Butyrivibrio fibrisolvens* haricinde, *Lactococcus lactis*, *Propionibacterium freudenreichii*, bazı *Streptococcus*, *Bifidobacterium* ve *Limosilactobacillus* türleri de KLA üretme özeliğine sahiptirler. Üstelik bakteriler, kimyasal yöntemlere göre daha spesifik ve insan sağlığına zararsız olan izomerleri üreterek iyi bir alternatif oluşturmaktadırlar. 70 kilogram ağırlığa sahip bir kişide prostat kanserinin önlenmesi için günde en az 3 gram *cis*-9, *trans*-11 izomeri tüketilmesi önerilmektedir. Ruminantlardan elde edilen gıdalar KLA bakımından zengin olmakla beraber bunların Türkiye'de hatta dünyada tüketimi yetersizdir. Bu çalışmada günlük tüketilen ürünlerde bulunan KLA miktarını artırmak için ayçiçek yağındaki LA'yı, *trans*-10, *cis*-12-KLA izomerine dönüştürme özeliğine sahip laktik asit bakterileri kaşar peyniri, sucuk, adjuvan ve keçi rumenlerinden izole edilmiştir. Planlanan hedeflere ulaşmak için çeşitli matrikslerden elde edilen 538 izolat içinden *Limosilactobacillus fermentum* ve *Enterococcus faecium* türleri olarak tanımlanan 30 izolatın *trans*-10, *cis*-12-KLA izomerinin çoğunluğunu ürettiği tespit edilmiştir. *Limosilactobacillus* ve *Enterococcus* spp'ye ait KLA üreten 30 izolattan 5'i starter kültür olarak kullanılarak KLA ile zenginleştirilmiş tarhana üretilmiştir. Tarhananın toplam KLA içeriğinin 12,33-13,44 µg/g arasında değiştiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, bakteriler kullanılarak temel gıdaların zenginleştirilebileceği bu çalışma ile ortaya konulmuş ve tüketiciler için KLA'ca zengin fonksiyonel ürünlerin üretimi için bir model sistem olarak sunulmuştur.

Anahtar Sözcükler: laktik asit bakterileri, konjuge linoleik asit, *Limosilactobacillus fermentum*, bitkisel fonksiyonel gıda, tarhana

ABSTRACT

ISOLATION, CHARACTERIZATION OF LACTIC ACID BACTERIA PRODUCING CONJUGATED LINOLEIC ACID (CLA) AND IMPLEMENTATION IN TARHANA, A CEREAL BASED FOOD

Koka ZONGO

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Food Engineering

Doctor of Philosophy, May/2021

Supervisor: Prof. Dr. Fehmi YAZICI

CLA, majorly observed in ruminant food items such as milk and meat products, is a polyunsaturated fatty acid with enormous human health benefits. CLA has many functions such as preventing breast and colon cancers, skin tumor formation, inhibiting carcinogenesis, reducing fat accumulation in the body, preventing diabetes, reducing the development of atherosclerosis, improving bone mineralization, and modulating the immune system. Although CLA is naturally occurring in ruminant-derived food items such as milk and meat, *Lactococcus lactis*, *Propionibacterium freudenreihii*, some *Limosilactobacillus Bifidobacterium* and *Streptococcus spp* have been reported to produce human health harmless more specific isomers. However, to be useful for human health, the recommended daily intake of *cis-9*, *trans-11* CLA should be around 3 g for 70 kg-person. To biofortify the staple food with CLA to increase its content in daily consumed products, we aimed to isolate LAB with capability to convert sunflower oil containing LA into the *trans-10*, *cis-12*-CLA isomer on MRS. Out of 538 isolates from various matrices including kaşar cheese, sucuk, adjuevan and goat rumen, 30 isolates identified as *Limosilactobacillus fermentum* and *Enterococcus faecium* species were majority producing *trans-10*, *cis-12*-CLA isomer. Five of 30 CLA producing bacteria belonging to *Limosilactobacillus* and *Enterococcus spp* were used as a starter culture to enrich tarhana in CLA. The total CLA content of ground tarhana ranges from 12.33 to 13.44 µg/g. The result demonstrated that enrichment of this staple foods in CLA could be used as a new approach to impart to consumers the functional properties of this essential nutrient.

Keywords: lactic acid bacteria, conjugated linoleic acid, *Limosilactobacillus fermentum*, plant based functional food, tarhana

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Öncelikle bu tezin konusunun seçilmesi, planlanması ve yürütülmesinde vermiş oldukları destek, bilgi paylaşımı ve son beş yıldır verdikleri emek için danışman hocam Prof. Dr. Fehmi Yazıcı ve Prof. Dr. Ahmet Hilmi Çon'a çok teşekkür ederim. Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı ve CV Raman Uluslararası Bursları aracılığıyla Türk ve Hindistan Hükümetine de finansal katkılarından dolayı özel teşekkür ederim.

Ön denemeler için Hindistan'a beni kabul eden Hindistan Gıda İşleme Teknolojisi Enstitüsü (IIFPT) Direktörü Dr. C. Anandharamakrishnan'a özellikle teşekkür ederim. Dr. Nilgün Özdemir ve Araştırma Görevlisi Ayşegül Beşir'e deneyler sırasında sağladıkları malzemeler ve bazı sonuçların teknik yorumları için özel teşekkür ederim. Ayrıca projenin başarılmasında katkısı olan herkese içtenlikle teşekkür ederim. Hindistan deneyimim esnasında bana yardımcı olan ve neredeyse tüm Biyoteknoloji bilgilerini benimle paylaşan Dr. Jeyan Arthur Moses ve Dr. Srinivasan Krishnamoorthy'a teşekkür ederim. Prof. K. Suresh Kumar ve Prof. R. Vidyalakshmi'ye materyal temin etmesi ve teknik yorumlarından dolayı teşekkür ederim. Ayrıca Dr. Murat Delibaş'a, tüm laboratuvar meslektaşlarına ve hedefime ulaşmak için beni doğrudan veya dolaylı olarak motive eden, bilgilerinin dokunuşu ve sürekli teşvikleriyle beni aydınlatan bilim insanlarına minnettarım. Bu tecrübenin benim için son derece önemli bir fırsat olduğunu düşünüyorum ve bugünlerini yarınıma adayan herkese; PYO.MUH. 1904.19.006 Proje No'lu Bilimsel Araştırma Projesi olarak Ondokuz Mayıs Üniversitesi'ne ve IIFPT 'ye destekleri için içten teşekkür ederim.

Bu doktora çalışmam çocuklarım Rebecca Koka, Michael Koka, karım Yannick Goya, Annem Monne Therese Soumahoro, Babam Nataba Zongo ve Guillaume, Alain, Andre, Marceline ve Martine kardeşlerime adanmıştır.

Koka ZONGO

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ	1
2. KONJUGE LINOLEİK ASİT KAVRAMI VE LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1. Konjuge Linoleik Asit Kavramı ve İzomerleri	4
2.2. Konjuge Linoleik Asit'in Sağlık Üzerine Yararlı Etkileri	4
2.2.1. Kansere Üzerine Konjuge Linoleik Asit'in Etkisi.....	5
2.2.2. Vücutta Yağ Birikiminin Azaltılması ve Ateroskleroz Gelişimi Üzerine Konjuge Linoleik Asit'in Etkisi.....	6
2.2.3. Diyabet Üzerine Konjuge Linoleik Asit'in Etkisi	6
2.2.4. Bağışıklık Sistemi Üzerine Konjuge Linoleik Asit'in Etkisi.....	7
2.3. Konjuge Linoleik Asit İçeren Gıdalar.....	8
2.4. Konjuge Linoleik Asit Üretimi ve Gıdaların Zenginleştirilmesi	9
2.4.1. Mikrobiyal Yöntemle Konjuge Linoleik Asit Üretimi	10
2.4.2. Kimyasal Yöntemle Konjuge Linoleik Asit Üretimi	12
2.4.3. Tüketime Yönelik Ürün Geliştirilmesi ve Gıdaların Konjuge Linoleik Asit ile Zenginleştirilmesi	12
2.5. Konjuge Linoleik Asit Üretimindeki Yaşanan Sorunlar.....	13
2.6. Tarhana.....	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	16
3.1. Materyal	16
3.2. Yöntemler.....	18
3.2.1. Laktik Asit Bakterisi İzolasyonu	18
3.2.2. Linoleik Asit'e Dayanıklı LAB'nin Tanımlanması.....	19
3.2.3. İzolatların 16S rDNA Dizi Analizi ile Tanımlanması	19
3.2.4. KLA Üreten İzolatların Karbonhidrat Fermantasyonu	21
3.2.5. Konjuge Linoleik Asit Üretimi ve Analizi.....	21
3.2.6. Konjuge Linoleik Asit Üretimi Üzerine Ortam pH Değerinin Etkisinin Belirlenmesi	23
3.2.7. Fonksiyonel Tarhana Üretilmesi ve Analizi	23
3.2.8. İstatistiksel Analiz.....	26
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	27
4.1. Linoleik Asit'e Dayanıklı LAB İzolasyonu	27
4.2. Linoleik Asit'e Dayanıklı LAB İzolatlarının Tanımlanması	28

4.3. KLA Biyoaktif İzomerlerinin Tanımlanması ve Seçimi	34
4.4. LAB Tanımlama Sonuçlarının Karbonhidrat Fermantasyon Profili Kullanılarak Doğrulanması	36
4.5. Konjuge Linoleik Asit Biyoaktif İzomerlerinin Miktarı	38
4.6. Konjuge linoleik asit üretim standardizasyonu ve ortam pH'sının optimizasyonu	43
4.7. Linoleik Asit Konsantrasyonunun KLA Üretimi Üzerine Etkisi	44
4.8. Konjuge Linoleik Asit ile zenginleştirilmiş Tarhana Üretimi	45
4.8.1. Tarhananın KLA İçeriği	46
4.8.2. Tarhananın pH Değeri	49
5. SONUÇ VE PERSPEKTİFLER	51
6. KAYNAKÇA	52
7. EKLER	63



SİMGELER VE KISALTMALAR

KLA	: Konjüge Linoleik Asit
LA	: Linoleik Asit
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TBE	: Tris/Borate/EDTA Tamponu
OD	: Optikal Yoğunluk
CH ₃ CN	: Asetonitril
DNA	: Deoksiribonukleik Asit
LAB	: Laktik Asit Bakterileri
FAME	: Serbest Yağ Asiti Esterleri (Fatty Asit Methyl Esters)
BMI	: Vücut Kitle indeksi
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
GC	:Gaz Kromatografi
rRNA	: Ribosomal Ribonukleik Asit
DMBA	: 7,12-Dimethylbenz (a) anthracene
PPAR	: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α or γ
LPS	: Lipopolisakarit
MRS	: De Man, Rogosa and Sharpe
NaCl	: Sodyum Klorür
KNO ₃	: Potasyum nitrat
ODS	: Octadecylsilyl

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Cis-9, trans-11</i> -KLA (üst yapı), <i>trans-10, cis-12</i> -KLA (orta yapı) ve linoleik asit (18: 2 <i>cis-9, cis-12</i> , alt yapı) yapıları	4
Şekil 2.2. Linoleik asit, risinoleik asit ve hint yağından <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> tarafından KLA üretimi.....	10
Şekil 3.1. Fermente balık — Abidjan bölgesinin (Fildişi Sahili) perakende pazarlarında toplanan <i>Chloroscombrus chrysurus</i> (Adjeuvan)	16
Şekil 3.2. Keçi rümen —Thanjavur (Hindistan) bölgesindeki perakende pazarlarda toplanan <i>Capra aegagrus hircus</i> rümeni	17
Şekil 3.3. Samsun (Türkiye) market ve pazarlarından marketlerinden toplanan fermente sucuk	17
Şekil 3.4. Samsun (Türkiye) market ve pazarlarından toplanan kaşar peyniri	17
Şekil 3.5. Tarhana malzemeleri.....	18
Şekil 3.6. Tarhana üretimi modifiye prosesi şekillendirilmiştir.....	25
Şekil 4.1. Tüm biyolojik matrislerden izole edilmiş olası <i>Lactobacillus</i> ve <i>Lactococcus</i> (%)	28
Şekil 4.2. <i>Limosilactobacillus fermentum</i> suşlarının PCR ürünleri.....	29
Şekil 4.3. <i>Limosilactobacillus fermentum</i> , <i>Limosilactobacillus gorillae</i> ve <i>Enterococcus</i> spp bakterilerinin 16S rRNA gen dizilerine dayanarak hazırlanmış filogenetik ağacı.	31
Şekil 4.4. (A) <i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK M26 tarafından ayçiçek yağından üretmiş KLA ve (B) Sigma KLA referans standardının kısmi kromatogramları	34
Şekil 4.5. Üretilmiş KLA ve referans standartların spektrumları	36
Şekil 4.6. Kalsiyumun Karbonatın (CaCO_3) izolatların KLA üretimi üzerine etkisi.	44
Şekil 4.7. Farklı LA konsantrasyonlarının KLA üretimi üzerine etkisi.....	45
Şekil 4.8. Farklı LA konsantrasyonlarının KLA'ya dönüşüm	45
Şekil 4.9. Fermente edilmiş tarhana (yaş tarhana).....	46
Şekil 4.10. Kurutulmuş tarhana (toz tarhana)	46

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 2. 1. Dünyada geviş getiren hayvanların sütünde bulunan toplam konjuge linoleik asit miktarı (g/100 g toplam yağ asidi).....	8
Tablo 2. 2. Et ürünlerinde ortalama KLA içeriği (mg /g yağ asiti).....	9
Tablo 2. 3. Yüksek miktarda KLA üreten suşlar	11
Tablo 2. 4. Alkali katalizörler kullanılarak KLA üretimi	12
Tablo 3. 1. LAB izolatları 16S rRNA gen gölgesi dizi analizine primerleri.....	20
Tablo 3. 2. Tarhana Bileşimi.....	24
Tablo 4. 1. İzolasyon kaynakları ile ilgili LAB izolatları	30
Tablo 4. 2. <i>Limosilactobacillus</i> ve <i>Enterococcus</i> türleri ikili uzaklık mesafeler	33
Tablo 4. 3. KLA üreten laktobasillerin karbonhidrat fermantasyon profili	37
Tablo 4. 4. %0,1 ayçiçek yağı içeren mMRS'de laktobasiller tarafından üretilen toplam KLA miktarı (µg/ml).....	38
Tablo 4. 5. % 0,1 LA konsantrasyonda CaCO ₃ varlığı ve yokluğunda izolatlar tarafından üretilen KLA değerleri	43
Tablo 4. 6. %1 ayçiçek yağı ile zenginleştirilmiş tarhanada laktobasiller tarafından üretilen toplam KLA miktarı (µg/g kurutulmuş tarhana).....	47
Tablo 4. 7. Depolama süresince Tarhananın pH'ında meydana gelen değişiklikler.....	50

1. GİRİŞ

Beslenme ve insan sağığı arasında oldukça yakın bir ilişki olduğu bilinmektedir. Beslenme, bir canlı organizmanın büyüme ve enerji sağlamak için gerekli protein, karbonhidrat, yağ, vitamin, mineral ve elektrolitler dahil olmak üzere gıda maddelerini alıp kullandığı bir süreçtir. İnsan ve diğer canlılar sağlıklı ve zinde olmaları için, güvenli ve besin değeri yüksek gıdalara her zaman erişebilmelidir (WFP, 2009). Gıda güvenliğinin sağlanması için gıdaların yeterli miktarda üretimi, güvenli bir şekilde işlenmesi ve gıdaya kolay erişilebilirliğin sağlanması gerekir. Ancak şimdiye kadar, gelişmemiş ülkelerde hatta gelişmiş ülkelerde de sağlıklı şartlarda ve yetersiz teknoloji ile gıdaların üretilmesi nedeniyle kalitelerinin düşük olması ve ilave olarak da yoksulluk nedeniyle satın alım güçlerinin yetersiz olması gıda güvenliğinin halen bir sorun olmaya devam etmesine yol açmaktadır. Sonuç olarak yetersiz beslenmeye ait çift taraflı problemler bulunmaktadır.

Yetersiz beslenmeden kaynaklanan bu çift yönlü problemler aşırı veya yetersiz beslenme olarak karşımıza çıkmaktadır. Çift yönlü problemler bir toplumun, ülkenin veya nüfusun tamamı ya da bir kısmının aşırı beslenirken (yani aşırı kilo ve obezite) diğer kısmının gıdasız kalması (büyümesine engel olmak) ile sonuçlanmaktadır (Popkin et al., 2019). Yetersiz, dengesiz ve besin değeri düşük diyetlerle beslenme çift taraflı problemlerle ilgili hastalıkların ortaya çıkmasında önemli faktörlerdir (IFPRI, 2016). 2019'da FAO tarafından yayımlanmış 2018 gıda güvenliği raporuna göre, gıdaya erişim sıkıntısı çeken ve yetersiz beslenen insan sayısı, 2016 yılında 804 milyon iken 2017'de 821 milyona yükselmiştir (FAO, 2019). İnsanların sağlıklı gıdalara erişim sıkıntısı ve dengesiz beslenme aşırı kilo ve obezite gibi farklı hastalıkların ortaya çıkmasına yol açmaktadır.

Dünya Gıda Programı, yetersiz beslenmeyi (malnütrisyon) bireyin fiziksel faaliyeti, büyüme, hamilelik, emzirme, fiziksel aktivite ve yaşam mücadelesi gibi fonksiyonları yerine getirmek için yeterli gıdaya ulaşamadığı bir durum olarak tanımlamaktadır. Bu yetersizlik, halk sağığı açısından ciddi sorunlar doğurmaktadır. Yetersiz beslenme, küresel ölçekte tüm sağık verileri göz önüne alındığında halk sağığı açısından birinci derecede tehdit oluşturmakta ve dünyada en fazla ölüme neden olmaktadır (Raigar and Mishra, 2015; Schoonees et al., 2013). Yetersiz beslenmeyi önlemek için dünya çapında birçok yaklaşım uygulanmaktadır. Bu yaklaşımlar ulusal ve uluslararası basında gerekli siyasal eylemleri, bilimsel

araştırmaları, öncelikli araştırma ve eğitsel faaliyetleri ve sağlık eylem planlarını içermektedir (Hawkes et al., 2020). Tüketilen gıdalar, gıdaların tüketildiği ortamlar ve sistemler, gıda ile ilgili politikaların değerlendirilmesi ve bilimsel öncelikler kapsamına giren operasyonel konular, keşfedilmesi gereken önemli yollardır. Fonksiyonel gıdalardaki bileşenlerin yeterli miktarda alınması yetersiz/dengesiz beslenmeyi önleyebilmektedir.

Probiyotik mikroorganizmaların sağlık üzerine olan pozitif etkilerinden dolayı yetersiz beslenmeyi önlemek için gıda katkıları veya üretici kültür olarak kullanımları ile ilgili çalışmalar son 30-40 yıldır büyük oranda artmıştır (Fuller, 1992). Daha önce belirtildiği gibi fonksiyonel gıda bileşenleri ve nutrasötik ürünler, genel sağlığın iyileştirilmesi ve hastalık riskinin azaltılmasında önemli alternatiflerdir. Bu tür gıdalardan geleneksel faydalarının yanında fizyolojik yararlar sağlamaları da beklenmektedir. Fonksiyonel bileşenler arasında, son yıllarda konjuge bağlara sahip linoleik asit (LA), birden fazla çift bağ içeren linoleik asit izomerlerini ifade edilen KLA'yı dile getirilmektedir (Paszczyk et al., 2012). KLA, ağırlıklı olarak süt ve ruminant kaynaklı gıdalarda bulunan çoklu doymamış bir yağ asididir. Süt, KLA'in 20'den fazla izomerlerini içerir, ancak dominant olan *cis-9*, *trans-11* izomeri toplam KLA'in % 75-90'ını oluşturur (Lock and Bauman, 2004). Sadece sütte yoğun bir şekilde bulunan *cis-9*, *trans-11* izomeri ve %3-5 oranında bulunan *trans-10*, *cis-12* izomeri biyolojik aktiviteye sahiptir (Parodi, 1999).

Yapılan araştırmalara göre KLA meme, kolon kanserleri ile cilt tümörü oluşumlarını ve diyabeti önlemesi, vücutta yağ birikimini ve ateroskleroz gelişimini azaltması, bağışıklık sistemini modüle etmesi gibi pek çok fonksiyonlara sahiptir (Cruz-Hernandez et al., 2006; Sels and Philippaerts, 2014; Van Nieuwenhove et al., 2012). Bununla birlikte, insan sağlığına yararlı olması için önerilen günlük *cis-9*, *trans-11* KLA alımı 70 kg bir kişi için yaklaşık 3 gramdır (Ip et al., 1994). Buna göre yıllık 1,1 kg KLA tüketilmesi gerekmektedir. Fakat bu miktarı karşılamak mümkün değildir. Yapılan araştırmalara göre Türkiye'de KLA kaynağı ürünler yani hayvansal ürünler özellikle süt ürünlerindeki toplam yağın %0,15-0,56'sı KLA olması nedeniyle yukarıda belirtilen değeri karşılamaktan çok uzaktır (Seçkin et al., 2005). Benzer bir şekilde, dünya çapında yapılan çalışmalarda da ruminant sütlerindeki KLA içeriğinin toplam yağın %0,06-2,96'sı olduğu bildirilmiştir (Zongo et al., 2021). Hayvansal gıdalar KLA bakımından zengin olmasına rağmen Türkiye'de ve hatta dünyada

hayvansal gıdaların tüketiminin yetersiz olmasından dolayı önerilen günlük KLA alımının karşılanması sorun olmaya devam etmektedir. Mesela Türkiye'de sığır, dana ve koyun etlerinin tüketimi yılda kişi başı 12,4 kg iken, süt ve süt ürünleri tüketimi 231 kg'dır (OECD, 2017; Örmeci Kart and Demircan, 2014; USK, 2016). Aynı şekilde balık ve balık ürünleri tüketimi kişi başına 5,5 kg olarak bildirilmiştir (BSÜGM, 2018).

Sonuç olarak, yalnızca hayvansal ürünlerin tüketilmesiyle önerilen günlük KLA alımını karşılamak zordur. Bundan dolayı KLA'nın günlük tüketilen temel gıda ürünlerdeki miktarını artırmak için gıdaların KLA ile zenginleştirilmesi gerekmektedir. Biyofortifikasyon için bazı bakterilerin biyohidrojenasyon yoluyla linoleik asitten KLA oluşturabileceği göz önüne alındığında, bu bakterileri kullanarak gıdaları zenginleştirmenin mümkün olduğu söylenebilmektedir (Kanmani et al., 2013). Literatür verilerine göre *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Lactococcus lactis*, *Propionibacterium freudenreichii*, bazı *Streptococcus*, *Bifidobacterium* ve *Limosilactobacillus* türlerinin KLA üretme özelliklerine sahip oldukları bildirilmiştir (Van Nieuwenhove et al., 2012; Yang et al., 2017). Üstelik, bakteriler, kimyasal yöntemlere göre daha spesifik ve insan sağlığına zararsız olan izomerleri üreterek önemli bir alternatif oluşturlar. Gıdalarda KLA varlığı HPLC ve GC gibi kromatografik teknikler kullanılarak ppm düzeyinde tespit edilebilmektedir. Kapiler gaz kromatografisi (GC), gaz kromatografisi-kütle spektrofotometresi (GC-MS) ve gümüş iyonu yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) KLA analizinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Parodi, 2003).

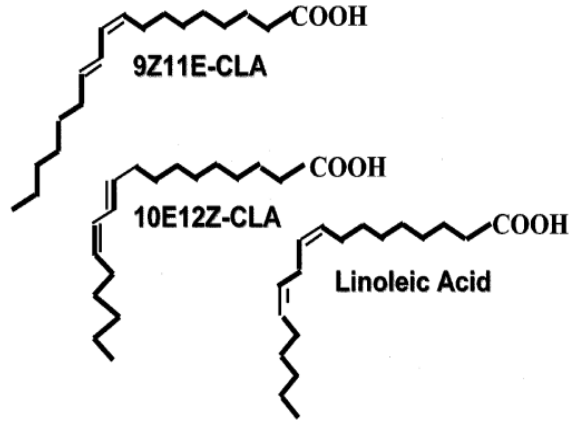
Bu çalışmada temel geleneksel bir ürün olan tarhanayı KLA ile zenginleştirmek için üç farklı ülkeden toplanan örnek matrislerinden LA'ya dayanaklı LAB'ların izole edilmesi, izolatların LA'yı KLA'ya dönüştürme yeteneklerinin araştırılması, iki biyoaktif izomer olan *cis-9*, *trans-11* ve *trans-10*, *cis-12*-KLA üretimlerinin tespit edilmesi ve son olarak da uygun maliyetli bir substrat olan ayçiçek yağı kullanılarak tarhananın *trans-10*, *cis-12* KLA'ca zengin bir ürüne dönüştürülmesi amaçlanmıştır.

2. KONJUGE LİNOLEİK ASİT KAVRAMI VE LİTERATÜR ÖZETİ

Bu bölümde, KLA kavramının temeli irdelenmiştir. KLA'nın izomerleri, insan sağlığı üzerinde yararlı özellikleri, gıdalardaki miktarı, gıda maddelerinden sentezi ve KLA'le zenginleştirilmesi, sentez sürecinde yaşanan sorunlar ve perspektifleri hakkındaki bilgiler özetlenmiştir.

2.1. Konjuge Linoleik Asit Kavramı ve İzomerleri

Geviş getiren hayvan kaynaklı gıdalarda yüksek oranda bulunan KLA, insan sağlığı için yararlı çoklu doymamış bir yağ asitidir. KLA insan sağlığı üzerinde birçok yararlı özelliğe sahip olduğundan, yüksek KLA miktarına sahip geviş getiren hayvan ürünlerinin tüketimi biyoyararlılığının artırılması için önemlidir (Duchemin et al. 2013). KLA'da bulunan çift bağlar *cis* veya *trans* konfigürasyonunda 8 ve 10, 9 ve 11, 10 ve 12, 11 ve 13 pozisyonlarında konumsal ve geometrik izomerlerin oluşumunu ifade eder. Bunlardan sadece iki izomer doğal olarak meydana gelen *cis*-9, *trans*-11 ve *trans*-10, *cis*-12 KLA izomerleri biyolojik olarak aktiftir (Pariza et al., 2001).



Şekil 2. 1. *Cis*-9, *trans*-11-KLA (üst yapı), *trans*-10, *cis*-12-KLA (orta yapı) ve linoleik asit (18: 2 *cis*-9, *cis*-12, alt yapı) yapıları (Belury, 2002)

2.2. Konjuge Linoleik Asit'in Sağlık Üzerine Yararlı Etkileri

Farklı tür kanserlerin önlenmesinde KLA'nın büyük bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. KLA; meme, kolon kanserleri ile cilt tümörü oluşumlarını ve diyabeti önleme, vücutta yağ birikimi ve ateroskleroz gelişimini azaltma, bağışıklık sistemini

modüle etme gibi pek çok fonksiyonlara sahiptir (den Hartigh, 2018; Dhar Dubey et al., 2019; Dilzer and Park, 2012). Bununla birlikte, sağlık üzerine yararlı olması için önerilen günlük *cis-9, trans-11*-KLA izomerinin (toplam diyetel KLA %80'ini) miktarı 70 kg'lık bir kişi için yaklaşık 3 g olmalıdır (Ip et al., 1994). Ancak yetişkinler önerilen günlük alımının sadece yarısını karşılayabilmektedirler. Bu sebeple süt ve et gibi gıda ürünlerindeki mevcut KLA miktarını arttırmaya yönelik kapsamlı araştırmaların yapılması zorunlu hale gelmiştir (Collomb et al., 2002; Stoop et al., 2009; O'Donnell et al., 2011; Duchemin et al., 2013; Nudda et al., 2014). Tavsiye edilen KLA miktarı alındığında insan sağlığı üzerine aşağıda sıralanan yararlı etkileri gözlemlenmiştir.

2.2.1. Kansere Üzerine Konjuge Linoleik Asit'in Etkisi

KLA'nın farklı kanser tiplerini önlemede önemli etkisi olduğu kanıtlanmıştır. Pek çok hayvan üzerinde yapılan denemelerde KLA'nın kolon, cilt ve meme kanserlerinin önlemede etkili olduğu belirtilmiştir. Ip et al. (1994) tarafından yapılan çalışmada, farelere 10 mg kanser indüktörü olan 7,12-Dimethylbenz (a) anthracene (DMBA) vermeden önce, fareler %1 KLA'lı bir diyet ile 24 hafta süresince beslenmiştir. Tüm fareler, meme kanserinin gelişip gelişmediğini değerlendirmek için her hafta el ile muayene yapılmıştır.

Sonuç olarak, %1 oranında KLA içeren bir diyetin farelerde meme kanserinin oluşmasını önleyebileceği bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar tarafından üç yıl sonra yapılan çalışmalara göre, daha düşük KLA konsantrasyonundaki diyetin de tümör oluşumuna karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur (Ip et al., 1994). Konu ile ilgili insan denemeleri sınırlı olmasına rağmen, KLA'nın kanser önlemedeki etkinliği olmadığı belirtilmiştir. Chajès et al. (2003) KLA'nın meme kanseri gelişiminde oynadığı rolü araştırıp, meme kanseri ile KLA alımı arasında pozitif bir ilişki olmadığını bildirmişlerdir. Voorrips et al. (2002) Hollandada bir kohort çalışmasında, KLA ve diğer yağ asitleri alımı ile meme kanseri arasındaki ilişkiyi değerlendikten sonra, hayvanlarda KLA alımının meme kanserinin önlenmesinde etkin olduğu, ama postmenopozal kadınlarda koruyucu etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Bu iki çalışmada elde edilen sonuçlar kullanılan KLA konsantrasyonu (%0,2 günlük alımı) ile ilgili olabilir. Zira KLA'nın sağlık üzerinde yararları etkisini

gösterebilmesi için günde en az 3g alınması tavsiye edilmiştir (Ip et al. 1994). Çalışmalarda gözlemlenen KLA'nın kanseri önleyip önlemediği ile ilgili tutarsızlığı gidermek için KLA'nın günde en az 3g alınmasını içeren daha fazla deneysel çalışmalara ihtiyaç vardır.

2.2.2. Vücutta Yağ Birikiminin Azaltılması ve Ateroskleroz Gelişimi Üzerine Konjuge Linoleik Asit'in Etkisi

KLA, vücutta yağın depolanmasını azaltması ve yağsız vücut kütlelerinin artmasını sağladığı için farklı ticari markalar altında dünya çapında pazarlanan bir besin takviyesidir (EFSA, 2015).

Dislipidemi, vücuttaki lipit profillerinde meydana gelen farklı anormalliklerdir. Aterosklerotik ve kardiyovasküler hastalıklara (ASKVH) yakalanma riskini arttıran pek çok risk faktörü içinde en önemlisidir (Reiner and Tedeschi-Reiner, 2013). Ateroskleroz, arterlerin iç duvarlarında kalsiyum ile birleşmiş lipit materyaldir ve özellikle kötü kolesterolle birikerek ortaya çıkan bir hastalıktır (Lee et al., 1994). KLA'nın tavşanlarda meydana gelen ateroskerozu nasıl etkileyeceğini araştırmak için yapılan çalışmada, KLA'nın hipokolesterolemik ve anti-aterojenik özelliklere sahip olduğu ortaya konulmuştur (Lee et al., 1994). Derakhshande-Rishehri et al. (2015) insanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, KLA takviyesi ve KLA'ca zenginleştirilmiş gıda tüketen insanların serum lipit profillerlerini bir meta analizinde incelemişlerdir. Sonuçta, KLA ile zenginleştirilmiş olan gıdalar KLA takviyesi ile karşılaştırıldığında, kötü kolesterol seviyesini etkili bir şekilde azaltmaya yardımcı olduğu ispatlanmıştır. Böylece KLA ile zenginleştirilmiş gıdaların, takviye şekilde hazırlanmış olanlardan daha etkili olduğunu söylemek mümkündür.

2.2.3. Diyabet Üzerine Konjuge Linoleik Asit'in Etkisi

Diyabet, vücudumuzda pankreas salgı bezinin yeterli miktarda insülin hormonu üretmemesi ya da ürettiği insülin hormonunun etkili bir şekilde kullanılamaması durumunda gelişen ve ömür boyu süren bir hastalıktır (TDV, 2000). KLA'nın diyabetin önleminde payı olduğunu gösteren pek çok çalışma mevcuttur. Houseknecht et al. (1998) bu konuda çalışan ilk araştırmacılardan biridir. Thiazolidinediones gibi, KLA'nın da plazmadaki glikoz seviyesinin düşüren ve insülin etkisini iyileştiren peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR α veya γ)

aktivasyonuna neden olan faktör olduğunu kanıtlanmıştır (Houseknecht et al.,1998). Ryder et al. (2001) tarafından da KLA'nın glikoz toleransını iyileştirdiği ve vücut yağlanmasını azalttığı bildirilmiştir.

Norris et al. (2009) KLA ve aspir yağı (LA'ca zengin) içeren diyet ile 36 hafta boyunca beslenen Tip 2 diyabeti olan obez kadınların vücut kompozisyonlarının nasıl etkilendiğini araştırdıkları çalışmalarında KLA'nın yağsız vücut kitlesini değiştirmede fakat vücut kitle indeksini (BMI) ve toplam yağ kütlesini azalttığını bildirmişlerdir. KLA'nın BMI'yi düşürmedeki etkisi, her 16 haftalık diyet döneminin son 8 haftasında tespit edilmiştir. Bu araştırmacıların tersine, Raff et al. (2008) tarafından yapılan çalışmada, bazı farklılıklar olmakla beraber (deneme süreci, KLA günlük alımı miktarı ve kullanılan gıda çeşidi) KLA ile zenginleştirilmiş tereyağlı bir diyet 5 hafta boyunca insanlara verildiğinde KLA'nın lipid peroksidasyonunu artırma ve kardiyovasküler hastalığa neden olma riski olduğu; insülin ve glikoz seviyeleri üzerine ise etkili olmadığı bildirilmiştir.

2.2.4. Bağışıklık Sistemi Üzerine Konjuge Linoleik Asit'in Etkisi

Bağışıklık sistemi modülasyonunda KLA etkinliği hakkında pek çok çalışma olsa da, insan bağışıklık sistemi hakkında az sayıda bilimsel çalışma mevcuttur. KLA ile ilgili literatür incelendiğinde, bugüne kadar insanlar üzerinde yapılan in vivo çalışmalarda sadece birkaç çalışmada KLA'nın etkileri incelenmiştir. Cook et al. (1993) tarafından KLA'nın bağışıklık sistemini modüle edebileceği bildirilmiştir. Bu çalışma KLA izomerlerinin civciv ve sıçanların büyüme hızını azaltan endotoksinlerin (lipopolisakarit, LPS) etkisini ortadan kaldırabileceğini ortaya koymuştur. Albers et al. (2003) KLA'nın ana izomerlerinin *cis-9*, *trans-11* ve *trans-10*, *cis-12* KLA iki farklı izomer karışımını kullanarak insan bağışıklık sisteminin fonksiyonu üzerine etkilerini araştırıp, 50:50 oranında KLA ile beslenen sağlıklı erkeklerde bağışıklık sistemlerinin yeni enfeksiyonlara karşı adaptif yeteneklerini geliştirebilen bir koruyucu olduğunu kanıtlanmıştır. Fakat, 80:20 orandaki dozajın 50:50 dozajı kadar etkili olmadığı bildirilmiştir. Bağışıklık sistemini güçlendirmede anlamlı etkiyi gösteren diğer çalışmalar literatürde araştırılmıştır. Bununla birlikte, KLA'nın etki mekanizması in vivo denemelerde kesin kanıt moleküler mekanizma mevcut olmadığı için, KLA PPAR ekspresyonu/fonksiyonunda ve eikosanoid yollarının diferansiyel modülasyonu

etkileme konusunda daha fazla araştırmalar yapılması durumunda bu yöntem önleme ve tedavilerde uygulanabilecektir (O'Shea et al. 2004).

2.3. Konjuge Linoleik Asit İçeren Gıdalar

Geviş getiren hayvan kaynaklı süt, et, hayvansal yağlar veya bunlardan türetilmiş ürünler KLA'nın ana kaynaklarını oluşturması yanında insan sütü, bitkisel yağlar, balık ve su ürünleri ile geviş getirmeyen hayvanlardan elde edilen etler veya gıdalar az miktarda KLA içerirler (Parodi, 2003). Mesela peynirlerde KLA içeriği 0,050 ila 2,86 g/100g yağ arasında değişmektedir (Abd El-Salam and El-Shibiny, 2014).

Gıdalarda değişken KLA'ın miktarı, KLA öncül maddeleri olan oleik, linoleik ve linolenik asitlerin miktarı ile ilgilidir (Bauman et al. 1999). Aynı zamanda, öncül maddelerin miktarını etkileyebilecek gıda işleme yöntemi de miktarı etkileyebilir. Yemlerde bulunan KLA öncül maddelerindeki değişim (Nudda et al., 2007) ve bölgesel iklim değişikliği, gıda maddelerindeki toplam KLA miktarını etkilemektedir (Ledoux et al., 2005; Baars et al., 2019). Et ve et ürünlerinde KLA miktarı 0,8 -6,6 mg/g yağ asiti olarak bildirilmiştir (Schmid et al., 2006). Süt ürünlerinde kıtalara göre her 100g toplam yağ asiti içinde ortalama %0,44 -1,33 arasında KLA bulunduğu belirlenmiştir (Tablo 2.1) (Zongo et al., 2021). Geviş getiren hayvansal gıdaların aksine, bitkisel yağlar 0 - 0,5g/100g arasında değişen miktarda düşük KLA seviyesine sahiptir (Chin et al., 1992; Fritsche and Fritsche, 1998; Juanéda et al., 2001).

Tablo 2. 1. Dünyada geviş getiren hayvanların sütünde bulunan toplam konjuge linoleik asit miktarı (g/100 g toplam yağ asidi) (Zongo et al., 2021)

Kıta	N	Ortalama	Minimum	Maksimum	Std. sapma
Afrika	202	0,44 (0,19 – 0,68)	0,33	0,52	0,09
Asya	≈ 828	0,74 (0,60 – 0,87)	0,06	2,63	0,45
Avrupa	≈ 8332	0,68 (0,62 – 0,74)	0,10	2,50	0,39
Kuzey Amerika	≈ 1908	0,53 (0,39 - 0,66)	0,01	1,12	0,27
Okyanusya	≈ 562	1,33 (1,16 – 1,49)	0,86	1,83	0,28
Güney Amerika	≈ 718	0,76 (0,54 – 0,97)	0,21	2,96	0,53

Geviş getiren hayvanlardan üretilen gıda maddeleri önemli kaynak olmasına rağmen, KLA geviş getirmeyen hayvanlardan elde edilen ürünlerde de bulunmaktadır (Tablo 2.2.). Mesela, KLA içeriği hindi etinde yaklaşık 2,5 mg /g yağ iken (Ha et al., 1987), tavuk etinde 0,7 -1,5 mg /g yağ asiti arasında değişmektedir (Chin et al., 1992; Rule et al., 2002; Schmid et al., 2006). Yumurtada bu oran gram metillenmiş yağ asidi başına yaklaşık 0,9 mg'dır (Chin et al., 1992). Daha önce de belirtildiği gibi, KLA'nın insan sağlığı üzerine yararlı etkilerini arttırmak için günlük alınan miktarını artırmak; bunun için de KLA ile gıdaları zenginleştirmek gerekmektedir.

Tablo 2. 2. Et ürünlerinde ortalama KLA içeriği (mg /g yağ asiti) (Schmid et al., 2006)

Et ürünleri	KLA içeriği (Birim?)
Salam	4,2
Knackwurst	3,7
Siyah pudding	3,0
Mortadella	2.9
Sosis	1.5/3.6
Karaciğer sosis	3.3
Pişmiş jambon	2.7
Sığır eti frank	3.3
Hindi frank	1.6
Sığır eti tütsülenmiş sosis	3.8
Tütsülenmiş domuz pastırması	0.8–2.6
Füme sosisleri	2.4
Yaymaya Alman tütsülenmiş sosis	4.4
Tütsülenmiş jambon	2.9
Füme hindi	2.4
Kıyma	3.5
Tuzlanmış biftek	6.6
Saksı eti	3.0

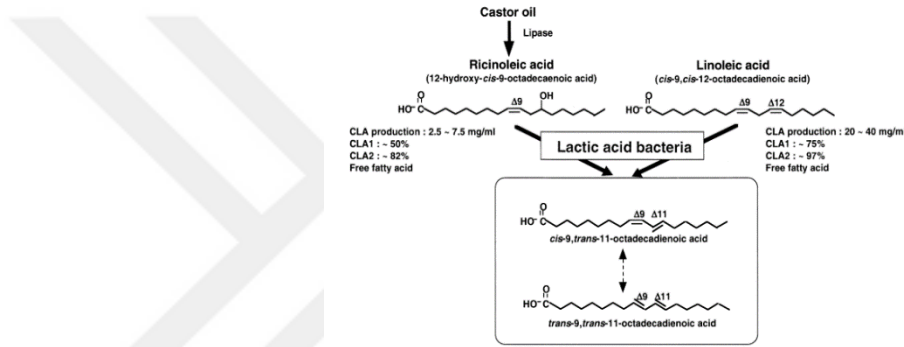
2.4. Konjuge Linoleik Asit Üretimi ve Gıdaların Zenginleştirilmesi

KLA üretimi ve gıdaların zenginleştirmeleri ile ilgili çalışmalar literatürde mevcuttur. Piyasada çoğunlukla bu zenginleştirme kimyasal yöntemlerle yapılmasına rağmen, mikrobiyal yöntemlerle de bunu başarmak mümkündür. Farklı yaklaşımlarla

KLA mikrobiyal ve kimyasal yöntemlerle üretilebilmektedir. Üretim yöntemine bağlı olarak tüm üretim aşamaları birbirinden farklıdır.

2.4.1. Mikrobiyal Yöntemle Konjuge Linoleik Asit Üretimi

Reiser (1951) ve Shorland et al. (1955) ilk olarak rümende oluşan doymamış ve trans yağ asitlerinden kimyasal hidrojenasyon reaksiyonu yoluyla gerçekleştirilen konjüge oktadekanoik asit oluşumunu tespit ederek daha sonraki çalışmalarda kanıtlamışlardır. Günümüzde kimyasal yöntemin ötesinde birçok bakterinin, özellikle laktik asit bakterileri, *Butyrivibrio fibrisolvens* ve *Megasphaera elsdenii*'nin saf linoleik asit veya bitkisel yağın içerdiği LA'yı kullanarak biyohidrojenasyon yoluyla KLA ürettikleri bildirilmiştir (Şekil 2.2 ve Tablo 2.3.).



Şekil 2. 2. Linoleik asit, risinoleik asit ve hint yağından *Lactiplantibacillus plantarum* tarafından KLA üretimi (Ogawa et al. 2005)

Bununla birlikte, bakteriler tarafından KLA üretimini artırmak için birçok farklı yöntem geliştirilmiş olsa da yöntemin verimi suştan suşa değişmektedir (Andrade et al., 2012; Van Nieuwenhove et al., 2012; Yang et al., 2017). Örneğin Khosravi et al. (2015) *Lactiplantibacillus plantarum*'un KLA üretme koşullarını optimize ederek 3 mg/ml linoleik asitten 240,69 µg/ml KLA elde etmeyi başarmışlardır.

Alonso et al. (2003) insan bağırsağından *Limosilactobacillus acidophilus* ve *Lactocaseibacillus casei* bakterilerini izole ederek linoleik asit (0; 0,05; 0,1; 0,2 ve 0,5 mg/ml) içeren broth içerisinde 80,14 ila 131,63 µg/ml arasında KLA üretmişler ve optimum konsantrasyonun %0,02 linoleik asit olduğunu bildirmişlerdir. Yüksek KLA üreten suşlar ile ilgili literatürde veriler bulunmaktadır (Andrade et al., 2012; Yang et al., 2017).

Tablo 2. 3. Yüksek miktarda KLA üreten suşlar (Yang et al. 2017)

Bakteriler	Suşlar	Substrat (g/l)	Toplam KLA (g/l)
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	A38	LA (0,10)	0,080
	1.184	LA (2,00)	1,728
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	L1	LA (0,20)	0,131
	AKU 1137	LA (4,00)	1,500
	AKU 1137	LA (5,00)	4,900
<i>Lactobacillus brevis</i>	IAM 1082	LA (4,00)	0,550
<i>Lactobacillus casei</i>	CRL 431	LA (0,20)	0,072
	JCM 1551	LA (4,00)	2,020
	JCM 1551	Hintyağı (5,00)	2,700
<i>Lactobacillus plantarum</i>	lp 15	LA (0,10)	0,026
	PL62	LA (1,00)	2,65 ^e
<i>Lactobacillus pentosus</i>	C14	LA (0,20)	0,069
	ATCC55739	LA (0,55)	0,350
<i>Lactobacillus reuteri</i>	ATCC55739	LA (0,90)	0,300
<i>Bifidobacterium animalis</i>	Bb12	LA (0,56)	0,170
	NCFB2257	LA (0,55)	0,231
<i>Bifidobacterium breve</i>	NCFB11815	LA (0,55)	0,215
	NCFB8815	LA (0,55)	0,242
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	CRL 1399	LA (0,20)	0,050
<i>Bifidobacterium lactis</i>	Bb12	LA (0,55)	0,170
<i>Enterococcus faecium</i>	M74	Soya yağı (10)	0,73
<i>Megasphaera elsdenii</i>	YJ-4	LA (0,02)	0,007
<i>Pediococcus acidilactici</i>	AKU1059	LA (4,00)	1,400
<i>Propinibacterium acnes</i>	No.27	LA (0,02)	0,017
	P-6 Wiesby	LA (0,75)	0,265
<i>Propinibacterium freudenreichii</i>	9093	LA (0,50)	0,111
	ATCC 6207	LA (0,10)	0,023
	56	Soya yağı (10)	1,09
<i>Propinibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	51	Soya yağı (10)	1,65
	23	Soya yağı (10)	0,81
<i>Streptococcus thermophilus</i>	CRL 728	LA (0,20)	0,068
	CRL728	LA (0,20)	0,105

2.4.2. Kimyasal Yöntemle Konjuge Linoleik Asit Üretimi

Bakteriler tarafından gerçekleştirilen biyohidrojenasyon reaksiyonunun aksine, risinoleik asit ve mono-alkil esterlerin dehidratasyonu, alkali metal alkolat veya propilen glikol kullanılarak linoleik asidin sulu alkali izomerizasyonu ve termal sigmatropik izomer düzenlemelerini içeren kimyasal sentez yoluyla KLA elde edilebilir (Parodi, 2003). KLA üretim yöntemleri ve mekanizmaları Tablo 2.4'te gösterilmiştir. Sentezleme metodu ne olursa olsun piyasada satışa sunulan KLA'yı üretmek için genelde 170°C sıcaklığın üzerinde alkali izomerizasyon yöntemi uygulanmakta ve linoleat bakımından zengin malzemeler ısıtılıp soğutulup karışım tuz veya asitle karıştırılarak meydana gelen karışımdan KLA izole edilmektedir (Reaney, 2002).

Alkali izomerizasyon ile %95'e varan bir verimle KLA üretilmektedir (Tablo 2.4.), fakat KLA üretiminde kimyasal yöntemlerin zayıf tarafı biyolojik olarak aktif izomerlerden farklı olarak zararlı izomerlerin de oluşması nedeniyle insan sağlığına uygun ürünleri elde etmek için reaksiyon kinetiğinin kontrol altında tutulmasının gerekliliği ve bunun için de daha fazla araştırma yapmaya ihtiyaç duyulmasıdır.

Tablo 2. 4. Alkali katalizörler kullanılarak KLA üretimi (Shinn et al. 2017)

Hammadde	Katalizör	Solvent	T (°C)	Saat	KLA (%)
Aspir yağı	KOH	Propilen glikol	150	3,5	76,9
Linoleat'ça zengin trigliserit, ester, sabun, yağ asidi, mum	Alkali gliserol atığı	Alkali gliserol	200	3	95
Aspir yağı metile yağ asid	KOCH ₃	Metanol	110	4	78,3
%75 linoleik asit ile yağ asidi karışımı	<i>t</i> -BuOK	n-heksan	70	2	71,8
Aspir yağı	NaOH	Etanol + su	150	3	79,1

2.4.3. Tüketime Yönelik Ürün Geliştirilmesi ve Gıdaların Konjuge Linoleik Asit ile Zenginleştirilmesi

Süt ve süt ürünleri, et veya geviş getiren hayvansal ürünler insan tüketimi için en doğal KLA kaynakları olmasına rağmen insan tüketimine yönelik günlük tavsiye edilen KLA miktardan çok düşük KLA içerdikleri için gıdaların KLA ile

zenginleştirilmesine ihtiyaç vardır. Gıdalarda KLA miktarını arttırmak için farklı yaklaşımlar ve girişimler yapılmıştır. Hayvan yemine bitkisel yağlar özellikle ayçiçeği, yer fıstığı, kanola, mısır, zeytin ve aspir yağları katılarak KLA içeriğini arttırmak mümkündür (AbuGhazaleh et al., 2007; Raes et al., 2004; Siurana and Calsamiglia, 2016).

Başka bir yöntem olarak KLA üreten mikroorganizmalar gıdaların fermantasyonu sürecinde kullanılarak yağların KLA içeriği artırılabilir (Puniya et al., 2008; Gorissen et al., 2010; Abdollahi et al., 2015). Trigueros et al. (2015) yoğurt starter kültürü bakterileri olan *Limosilactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* kullanarak keçi sütü yoğurdundaki linoleik asidi KLA'ya dönüştürerek KLA'ca zengin bir yoğurt elde etmişlerdir. Gıdaları KLA'larla zenginleştirmede pek çok yaklaşım mevcuttur ve bu amaçla gıdalara uygun KLA üreten bakterilerin ilavesi araştırılmıştır (Andrade et al., 2012; Yang et al., 2017). Bununla birlikte, literatürde gıda maddelerinin KLA'larca zenginleştirilmesi konusunda bazı sorunlar bulunmaktadır.

2.5. Konjuge Linoleik Asit Üretimindeki Yaşanan Sorunlar

Gıdalarda özellikle fermente süt ve et ürünlerinin KLA miktarını arttırmak için çeşitli girişimler yapılmasına rağmen birçoğundan teknolojik sorunlar nedeniyle yeterli sonuçlar elde edilememiştir (Andrade et al., 2012; Gorissen et al., 2015; Shinn et al., 2017). Gorissen et al. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, farklı teknolojik sorunlar nedeniyle gıdalarda KLA konsantrasyonunu arttırmada istenilen sonuçları elde edilememiştir. Genel olarak karşılaşılan en önemli sorun süt ürünlerinin düşük serbest yağ asitleri miktarıdır. Linoleik asit ve α -linolenik asit sütte yeterli miktarlarda bulunmasına rağmen, KLA sentez substratı olarak kullanılamamaktadır. Çünkü KLA sentezine sütteki yağ asitlerini kullanmak için önce trigliseridlerin hidrolize forma getirilmesi gerekmektedir. Diğer bir engel ise bazı bakteriler gıda endüstrisinde faydalı olsa bile, KLA sentezin de yeterli serbest yağ asidi üretebilmek için triaçilgliseridlerin parçalanmasına yetecek kadar lipolitik aktiviteye de sahip olmalarının gerekmesidir.

%3-3,6 yağlı bir sütte serbest linoleik ve α -linolenik asit miktarı 0,02 ile 0,03 mg/ml altında olduğu için bakteriler tarafından KLA üretimi başlatılamamaktadır. Sonuç olarak, ürünlerdeki yağlardan triaçilgliserid hidrolizasyonu yoluyla serbest yağ

asidi miktarının artırılması veya yeterli lipolitik aktiviteye sahip olan bakterilerle KLA üreten mikroorganizmaların beraber kullanması önerilmiştir (Gorissen et al. 2012). Örneğin, et fermantasyonunda serbest yağ asitleri açığa çıkmasına rağmen serbest linoleik asit miktarı sınırlayıcı faktör olmadığında bile sıcaklık ve pH şartları uygun olmadığında bakteriler tarafından linoleik asit'in KLA izomerlerine dönüştürülmesini engellenmektedir. Literatür verilerine göre ürünün pH değerleri ve katılacak KLA üreten mikroorganizmaların asite dayanıklılık kabiliyetleri büyük ölçüde rol oynamaktadır. Gorissen et al. (2011) on farklı linoleat izomeraz (LAI enzimler) enzimine sahip *Lactilactobacillus sakei* LMG13558 suşunun, pH 6,2 ve 30°C'de ürettiği KLA miktarının, 20 ile 25°C'de ürettiğinden daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Aynı zamanda bu bakterinin pH 5,5'te (30°C) veya pH 6,2'de (37°C) LA'yı KLA'ye dönüştüremediği fark edilmiştir. Yani pH ve sıcaklık KLA üretimini büyük ölçüde etkilemektedir. Bu nedenle bu suş gıda uygulamalarında kullanılması durumunda KLA üretimi üzerinde etkili olan faktörlerin detaylı bir araştırmaya tabi tutulmasının gerektiği bildirilmiştir.

Lactiplantibacillus plantarum GSI 303 suşunun daha fazla KLA üretmesi için inkübasyonun koşullarını optimize ederek 2,0 mg/ml LA konsantrasyonundan başlangıç pH'sı 6,5 ve sıcaklığı 37°C olan ortamda 6,36 mg KLA/g üretildiğini; 43°C ve 15°C'de bu miktarın 5,00 ve 5,31 mg/g değerine düştüğünü bildirmişlerdir (Suteebut et al., 2016). Başka kaynaklarda ise 2 mg/ml LA konsantrasyonunda KLA üreten bakterilerin reaksiyonu başlatamadığı ve bakterilerin çoğalmasını engellediklerini bildirilmiştir (Demir and Talpur 2010; Khaskheli et al., 2013). Fazla miktarda KLA üretmek için Rainio et al. (2002) LA toksisitesini azaltmak amacıyla besiyerine polioksietilen sorbitan monooleat (Tween 80) ilave ederek LA toksisitesini engelleyebilmiş ve yüksek miktarda KLA üretebilmiştir. Bu sonuç Tween 80 ve LA miktarı dikkate alınarak bakteriyel fermantasyon yoluyla KLA miktarını arttırmanın mümkün olduğunu ortaya koymuştur.

LA toksisitesini azaltmaya yönelik başka bir yaklaşım, KLA üretim sürecinde yıkanmış hücrelerin kullanılmasıdır. Kishino et al. (2002) ve Ogawa et al. (2001) tarafından bu yöntem kullanılarak yıkanmış *Lactiplantibacillus plantarum* ve *Lactobacillus acidophilus* ve hücreleri tarafından 4,9 ve 40 g/l konsantrasyonunda KLA elde edilmiştir. Fakat bu yöntem KLA miktarını artırsa da ürünün nihai

maliyetinin çok yüksek değerlere çıkmasını engelleyememektedir. Bu nedenle tüketiciye uygun maliyetli KLA ile zenginleştirilmiş ürünler sunmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Son olarak çeşitli zorluklar olmasına rağmen süt ürünleri dışında başka ürünler üretmek için yıkanmış hücreler ve starter kültürleri ile alternatif substratlar özellikle bitkisel yağlar kullanılarak KLA'ca zengin yeni gıda ürünleri üretmek amacıyla daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

2.6. Tarhana

Tez çalışmasında Türkiye'de yaygın olarak tüketilen tarhananın KLA'ca zenginleştirilmesine odaklanılmıştır. Süt ürünleri dışında KLA'ca zengin yeni gıda ürünleri üretmek için starter kültürleri ile alternatif substratlar özellikle bitkisel yağlar kullanılarak KLA sentezlemek amacıyla daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Tarhana, bitki bazlı geleneksel Türk fermente ürünüdür. Besin değeri yüksek, vitamin, protein ve mineral maddelerce zengindir (Daglioglu, 2000; Ozdemir et al., 2007). Tarhana, buğday unu, yoğurt, sebze ve baharatlar kullanılarak üretilmektedir ve dört farklı çeşidi vardır (TSI, 2004). Fermente bir gıda olan tarhana ekşi bir tada sahip ve asidiktir. Bazı ülkelerde tarhana farklı isimlerle bilinir. Macaristan'da thanu, Finlandiya'da talkuna, Suriye, Filistin, Ürdün, Lübnan ve Mısır'da kişhk, Yunanistan'da trahanas, Irak ve İran'da kushuk olarak bilinmektedir (Daglioglu 2000; Blandino et al., 2003).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bakteriyel fermantasyon yoluyla KLA üretiminin stratejisi konusunda ön deneme ve literatür çalışmalarına dayanılarak bu çalışmada LA'yı KLA'ya dönüştürme kabiliyeti yüksek olan laktik asit bakterileri ve ürün zenginleştirmek amacıyla model sistem olarak da geleneksel tarhana tercih edilmiştir. Çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü ve Hindistan Gıda İşleme Teknolojisi Enstitüsünde (Thanjavur) yürütülmüştür.

3.1. Materyal

Samsun ili merkez ve semt pazarlarından aynı perakendeciden kaşar peyniri (*kaşar peyniri*, n=7), ve fermente sucuk (*sucuk*, n=3) olmak üzere iki üretim partisinden, Abidjan (Fildişi Sahili) bölgesinden fermente *Chloroscombrus chrysurus* balığı (*adjuevan* adlı olarak, n=6) ve Hindistan Thanjavur ilinde *Capra aegagrus hircus* keçisi rümeni (rumen, n=5) olmak üzere toplam 21 biyolojik örnek Ekim 2017 ile Aralık 2018 arasında toplanmıştır. Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olmuştur. Analizler Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Süt Teknolojisi ve Biyoteknoloji laboratuvarları ile Hindistan Gıda İşleme Teknolojisi Enstitüsü (Thanjavur) Biyoteknoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Biyolojik örnekler Şekil 3.1-3.4'de gösterilmiştir.



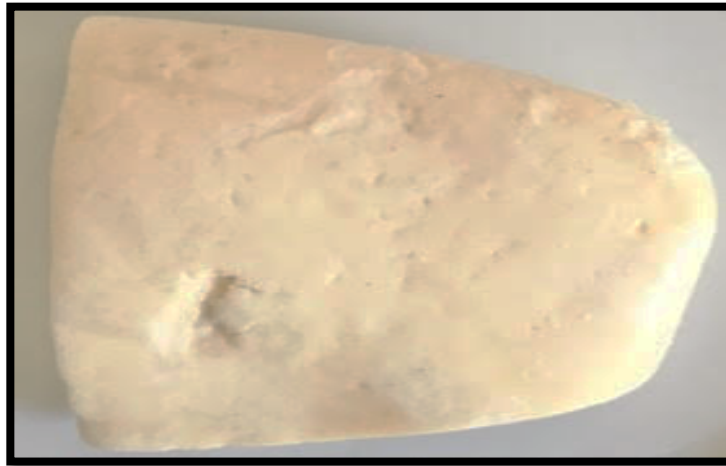
Şekil 3. 1. Fermente balık — Abidjan bölgesinin (Fildişi Sahili) perakende pazarlarında toplanan *Chloroscombrus chrysurus* (Adjeuvan)



Şekil 3. 2. Keçi r men —Thanjavur (Hindistan) bölgesindeki perakende pazarlarda toplanan *Capra aegagrus hircus* rümeni



Şekil 3. 3. Samsun (Türkiye) market ve pazarlarından marketlerinden toplanan fermente sucuk



Şekil 3. 4. Samsun (Türkiye) market ve pazarlarından toplanan ka ar peyniri

Bu çalışmada tarhana üretiminde kullanılan ve Şekil 3.5'te gösterilen bileşen maddeler Samsun piyasasından temin edilmiştir. Starter kültür olarak da materyal bölümünde açıklanan Samsun, Fildişi Sahili'nde Abidjan ve Hindistan'da Thanjavur'da toplanan peynir, fermente sosis, fermente balık ve keçi rümeni dahil olmak üzere toplam 21 örnekten Domingos-Lopes et al. (2016) tarafından bildirilen yöntemle göre izole edilen KLA üreticisi LAB izolatları kullanılmıştır.



Şekil 3. 5. Tarhana malzemeleri

3.2. Yöntemler

3.2.1. Laktik Asit Bakterisi İzolasyonu

Domingos-Lopes et al. (2016) tarafından kullanılan metodolojiye göre 21 biyolojik maktrisler yani pazarlarda satılan sucuk ($n=3$), peynir ($n=7$) ve fermente *Chloroscombrus chrysurus* balığı ($n=6$) ile keçi içkembesinden ($n=5$) MRS ve M17 besiyeleri kullanılarak muhtemel laktik asit bakterileri izole edilmiştir. Numuneler (25 g) 225 ml tampon peptonlu su (Merck) ile seyreltilmiş ve bir stomacher (Smasher, AES / Biomerieux, Fransa) ile homojenize edilmiştir. 10^{-8} 'e kadar iki paralelli örnek seri dilüsyonları hazırlanmış, MRS agar (Biolife) üzerinde iki tekrarlamalı şekilde aşılano, laktobasilleri seçmek için %5 karbon dioksit veya Anaerocult A (Merck) kullanılarak anaerobik jarlar içerisinde 30°C 'de 96 saat inkübe edilmiştir. Laktokok izolasyonu için M17 agar (Liofilchem) üzerine iki paralelli olarak aşılanoş petrilere 72 saat boyunca 25°C 'de aerobik koşullar altında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda, her sayılabilir seyreltmeden on koloni sıvı besiyerine (MRS ve M17 broth) alınmış ve saf bir kültür elde etmek için aynı ortamda iki kez alt kültürlenmiştir. Saf

kültürler, 18 saat boyunca 30°C'de anaerobik koşullarda MRS agar üzerinde veya 25°C'de aerobik koşullarda M17 agar üzerinde geliştirildikten sonra Gram boyama ve katalaz testlerine tabi tutulmuştur (Kozaki et al., 1992). Tüm Gram-pozitif ve katalaz-negatif izolatlar takiben nitrat redüktaz testine tabi tutulmuştur. Nitrat redüktaz testini gerçekleştirmek için KNO₃ (%0,05), et ekstresi (%0,3) ve NaCl (%0,1) içeren besiyeri kullanılmıştır. Asetik asit (5N) içinde hazırlanan alfa naftilamin (%0,5) ve sülfanilik asit (%0,8) nitratın indirgenmesini belirlemek için kullanılmıştır. Gram pozitif, katalaz negatif izolatlar ileri çalışmalar için muhtemel LAB olarak seçilmiştir. Seçilen toplam 538 LAB izolatu çalışmalar için %30 (v/v) gliserol'lu MRS broth besiyerinde -20 ve -80°C'de depolanmıştır.

3.2.2. Linoleik Asit'e Dayanıklı LAB'nin Tanımlanması

İzolatların LA'yi tolere etme yeteneğini belirlemek için, 100 µg/ml LA (Van Nieuwenhove et al., 2007) ilave edilmiş MRS agar üzerine, McFarland standart 4 bulanıklığına sahip kültürden 0,2 ml alınarak yayılmış ve muhtemel laktokoklar 25°C'de 48 saat aerobik koşullarda ve muhtemel laktobasillerde de 30°C anaerobik koşullarda inkübe edilmiştir. LA varlığında çoğalan tüm bakteriler KLA izomerleri ve fonksiyonel gıda üretmek amacıyla kullanılmıştır. Bununla birlikte, tarhana üretimi için izolatların 16S rRNA genleri sekanslanıp suş tipleri belirlenmiştir.

3.2.3. İzolatların 16S rDNA Dizi Analizi ile Tanımlanması

3.2.3.1. Genomik DNA Ekstraksiyonu

LA varlığında MRS üzerinde gelişebilen izolatlar (n=30), aerobik ve anaerobik koşullar altında sırasıyla 25 veya 30°C'de mMRS (broth içinde 20 saat boyunca tekrar geliştirilmiştir. Kültürlenmiş her izolatu 2 ml'si bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve 10.000 x g'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve hücre pelleti toplanmıştır. Toplam genomik DNA, tedarikçinin optimize edilmiş protokolü kullanılarak ekstrakte edilmiştir (PureLink® Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc. MA. ABD). Saflaştırılmış DNA, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) için kullanılabilecek kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.2.3.2. PZR Amplifikasyonu

İzolatların tanımlanması için 0,2 ml'lik PZR tüplerinde Termal Cycler kullanılarak 16S rRNA gen bölgesi çoğaltılmıştır. 16S rRNA genini kodlayan DNA bölgesinin çoğaltılması forward **27F** (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 8-28

konumunda bağlayan) ve reverse 1541R (5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3',1542-1522 konumunda bağlayan) çift primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (De Vuyst et al., 2002; De Vuyst and Vancanneyt, 2007). 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılmasında her bir suş için 50 µl'lik PZR karışımı kullanılmıştır.

Bu karışım için 0,2 ml'lik PZR tüplerinde her bir örnek için 1x master mix 25 µl (GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix, Promega, USA), her (0,4 µM) primer'in 2 µl forward ve reverse primer DNA (200ng) ile PZR reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde steril ultra saf su buz üzerinde karıştırılmıştır. PZR işlemi 95°C'da 3dk ön denatürasyon, 35 çevrim 95°C'da 1 dk, 54°C'da 1 dk, 72°C'de 1dk ve 72°C'de 10 dk süre ile son uzatma bir çevrim, Termal Cyclor (BioRadT100) kullanılarak uygulanmıştır. *Fructiactobacillus sanfrancisci* ATCC 27651^T pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontrol ise yalnızca primerler ve diğer reaktifleri içeren bir tüpten oluşturulmuştur. 16S rDNA amplikonları jel elektroforezi kullanılarak kontrol edilmiştir. Bu amaçla 16S rDNA amplikonları, 2 µl etidyum bromür (0,5 µg/ml, Sigma, ABD) ve 8 µl DNA marker (Thermo Fisher Scientific, 50bp) ile %1 konsantrasyondaki agaroz jelde 30 dk boyunca 100 V'de yürütülmüş ve takiben GelDoc Sisteminde (Vilber Lourmat, Quantum ST5) UV ışık altında kontrol edilmiştir.

3.2.3.3. 16S rDNA Dizi Analizi

16S rRNA amplifikasyon ürünleri PZR pürifikasyon kiti (PureLink PCR Purification Kit, Thermo Fisher Scientific) kullanılarak saflaştırılmış ve 16S rRNA gen bölgesinin yaklaşık uzunluğunun tamamının dizi analizi üç primer (Tablo 3.1) ile ABI PRISM 3730XL Genetik Analyzer (PE Applied Biosystems) otomatik dizi analizi cihazı kullanılarak Macrogen Inc. (Hollanda) firmasında gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3. 1. LAB izolatları'nın 16S rRNA gen gölgesi dizi analizinde kullanılan primerleri

İsim	Diziliş	Bağlanma bölgesi (5'-3')	Kaynak
518F	CCAGCAGCCGCGTAATACG	518-534	Mühling et al., 2008
800R	TAC CAG GGT ATC TAA TCC	800-782	Chun, 1995
Mg5F	AAA CTC AAA GGA ATT GAC GG	907-926	Chun, 1995

3.2.3.4. Filogenetik Analiz

Farklı izolatlar arasındaki evrimsel tarihi veya ilişkiyi keşfetmek için filogenetik analizi gerçekleştirilmiştir. Macrogen firmasından (Hollanda) elde edilen PZR ürünlerinin sekansları, ChromasPro version 2.1.8'de (Technelysium Pty Ltd, Avustralya) ABI formatlı kromatogramlarının dosyaları kullanılarak birleştirilip EZbiocloud sever (URL-13) algoritması kullanılarak, en yakın akraba organizmalarla olan 16S rRNA gen bölgesi nükleotid benzerliği belirlenmiştir (Yoon et al., 2017). Hizalama ve filogenetik analizler CLUSTAL Muscle kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve Maximum Parsimony metodolojisi MEGA X programı aracılığıyla 1000 tekrarlamayla yapılmıştır (Kumar et al., 2018) Filogenetik ağaç, MEGA X programı vasıtasıyla tasarlanmıştır.

3.2.4. KLA Üreten İzolatların Karbonhidrat Fermantasyonu

Daha yüksek benzerlik derecelerine ($\geq 99\%$) sahip suşlar, uygun farklılaşma ve tanımlama için karbonhidrat fermantasyon testlerine tabi tutulmuştur (Atlas, 2010). Suşları birbirinden daha iyi ayırmak için pepton içeren fermantasyon besiyeri litrede 10 g pepton, 5 g NaCl 3 g Maya özü, 10 g karbonhidrat ve %0,2 bromotimol mavisi (10ml) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Test edilen karbonhidratlar glikoz, ksiloz, sorbitol, laktoz, trehaloz, rhamnoz, gliserol, inulin, sukroz ve galaktozdur. 24 saatlik kültürden McFarland standard 4 bulanıklığına eşdeğer (4 nolu) hazırlanmış kültürden 0,2 ml alınarak 5 ml fermantasyon besiyerine aşılanmış ve 25 veya 30°C'de 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Süre sonunda rengin sarıya dönmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.5. Konjuge Linoleik Asit Üretimi ve Analizi

3.2.5.1. Konjuge Linoleik Asit Üretimi

Çözünürlüğünü iyileştiren %2 Tween 80 (polioksietilen sorbitan monooleat, Merck, Darmstadt, Almanya) ile karıştırılmış %0,1 ayçiçek yağı içeren mMRS (%0,5 glikoz ve %0,4 maya ekstratı içeren MRS) broth gece boyunca çoğaltılmış LA'nın varlığında gelişebilen LAB izolatlarıyla aşılanmıştır. Karışım 25 veya 30°C'de 48 saatte inkübe edilmiştir. Yalnızca yağ asidi ve bakterileri içeren kontrol örnekleri de test edilmiştir. 18 saatlik çoğaltılmış kültür McFarland standardı 4 ($1,2 \times 10^9$ kob/ml) kullanılarak kalibre edilmiştir. Üretilmiş KLA spektrofotometrik deney kullanılarak

ölçülmüştür (Troegeler-Meynadier et al., 2003; Barrett et al., 2007).

3.2.5.2. Konjuge Linoleik Asit'in Spektrofotometrik Yöntemle Analizi

Üretilmiş KLA miktarı spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir (Troegeler-Meynadier et al., 2003; Barrett et al., 2007). Bu amaçla 48 saatlik kültürün 2 ml'si 4 ml izopropanol ile karıştırılarak 10.000 rpm ve 4°C'de 30 dk boyunca santrifüj edilip 30 saniye vorteksledikten sonra 10 dk beklemeye bırakılmıştır. Takiben 3 ml hekzan eklendikten sonra tekrar 30 saniye vortekslenmiş ve 10 dk bekletilmiştir. Yağ asidini ihtiva eden 2 ml hekzan çözeltisinin üst kısmından bir pipet ile alınarak 233 nm dalga boyunda spektrometrede okunmuştur (Cary 60 UV-Vis spektrofotometrik, Agilent, Palo Alto, CA). Örneklerin toplam KLA miktarı 125 µg/ml'ye kadar bir seri konsantrasyona karşı çizilen bir standart eğrisi ile karşılaştırılarak hesaplamalar yapılmıştır.

3.2.5.3. Konjuge Linoleik Asit'in Kromatografik Yöntemle Analizi

KLA izomerlerinin tipini belirlemek ve çalışma amacına uygun suşları seçmek için ters fazlı Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC, Agilent 1200 Infinity Series HPLC variable UV wavelength detector, Agilent, Palo Alto, CA) kullanılmıştır. Spektrofotometrik esaslı bu yöntemde daha önce belirtildiği gibi elde edilen yağ asitleri ekstratları kullanılmıştır. Yağ asitlerini içeren 3 ml kültüre 5 ml potasyum hidroksit içeren metanol (2N) eklenip 60°C'de su banyosunda 30 dk inkübe edilmiştir. Takiben oda sıcaklığında 10 dk bekletildikten sonra 5 ml HCL (2N) eklenerek potasyum hidroksit nötralize edilmiştir. 5 ml hekzan hidrolize edilmiş yağ örneklerine eklenip 4100 g'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Üstteki hekzan fazı toplanıp vakum ve azot gazı altında giderilip artık madde 2 ml % 0,14 asetik asit içeren asetonitril içerisinde çözülmüştür. KLA metabolitlerinin ayrılması HPLC C-18 Inertsil ODS-3 kolonu (250 × 4.6 mm, 5 µm, GL Science Inc. USA) CH₃CN/H₂O/CH₃COOH (70/30/0,12; v/v/v) mobil fazıyla 1,5 ml/dakika akış hızında gerçekleştirilmiştir (Banni et al., 2001; Melis et al., 2001; Mele et al., 2013).

3.2.5.4. Konjuge Linoleik Asit İzomerizasyonu ve Biyoaktif İzomerlerin Seçilmesi

KLA izomerlerinin tanımlanması, hedef bileşiklerin alıkonma sürelerinin pikleri referans standarttakilerin 200 ila 260 nm dalga boyundaki pikleri ile karşılaştırılarak

gerçekleştirilmiştir. Sigma ve Nu-Chek-Prep, Inc. USA'den satın alınmış metil *cis-9, trans-11* ve *trans-10,cis-12* karışımli konjuge oktadecadienoat izomer referans standart iyot (I_2) ile izomerize edilerek ilgili izomerlerin birbirinden ayrılmasına katkıda bulunmuştur (Eulitz et al., 1999; Delmonte et al., 2004). Kısaca Delmonte et al. (2004) tarafından belirtildiği gibi 5 ve 10 mg KLA referans standart toplanıp 2 ml petrol eter içeren vidalı bir cam test tüpünde çözülmüştür. Açık pembe bir renk görünene kadar I_2 çözeltisinden birkaç damla (6 mg I_2 /100 ml petrol eteri) ilave edilmiştir. Tüpler 30 dk güneş ışığına maruz bırakılmış ve daha sonra I_2 'yi çıkarmak için 5 ml $Na_2S_2O_3$ (0.1N) ile 10 saniye boyunca çalkanmıştır. Bu işlem şeffaf çözelti elde edilinceye kadar tekrarlanmıştır. Organik faz Na_2SO_4 üzerinde kurutulup azot altında buharlaştırılmış ve % 0,14 asetik asit içeren 2 ml asetonitril içerisinde yeniden süspanse edilip HPLC kolonuna verilmiştir. HPLC ayrımı 3.2.5.3. KLA'nın kromatografi ile ayrımı başlığı altında verilen yöntemle gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. Konjuge Linoleik Asit Üretimi Üzerine Ortam pH Değerinin Etkisinin Belirlenmesi

Kültür ortamının pH değerinin düşmesinin konjuge linoleik asit üretimini olumsuz etkilediği düşünülerek, kalsiyum tuzu ($CaCO_3$) ile pH düşüşü engellenmiştir. Bu amaçla KLA üretimini artırabileceği düşünülerek 20 saatlik kültürün 1 ml'si (McFarland standardı 4; $1,2 \times 10^9$ kob/ml) mMRS brotha aşılıp 24 saatlik inkübasyondan sonra broth pH'ları ölçülüp kalsiyum karbonatla ($CaCO_3$) pH 6'ya ayarlanmıştır. Bu şekilde %0,1 - 0,4 konsantrasyonda ayçiçek yağı ve %2,5 Tween 80 içeren besiyerine ilave edilmiş, daha sonra 24 saatte bir kez vortekslenerek ve 48 saat inkübe edilmiştir. Kontrol olarak $CaCO_3$ içermeyen besiyeri, ilgili izolatlarla aşılmalıdır. Kültürde KLA miktarı HPLC ile belirlenmiştir. HPLC ayrımı 3.2.5.4. KLA'nın kromatografi ile ayrımı başlığı altında verilen yöntemle gerçekleştirilmiştir.

3.2.7. Fonksiyonel Tarhana Üretimi ve Analizi

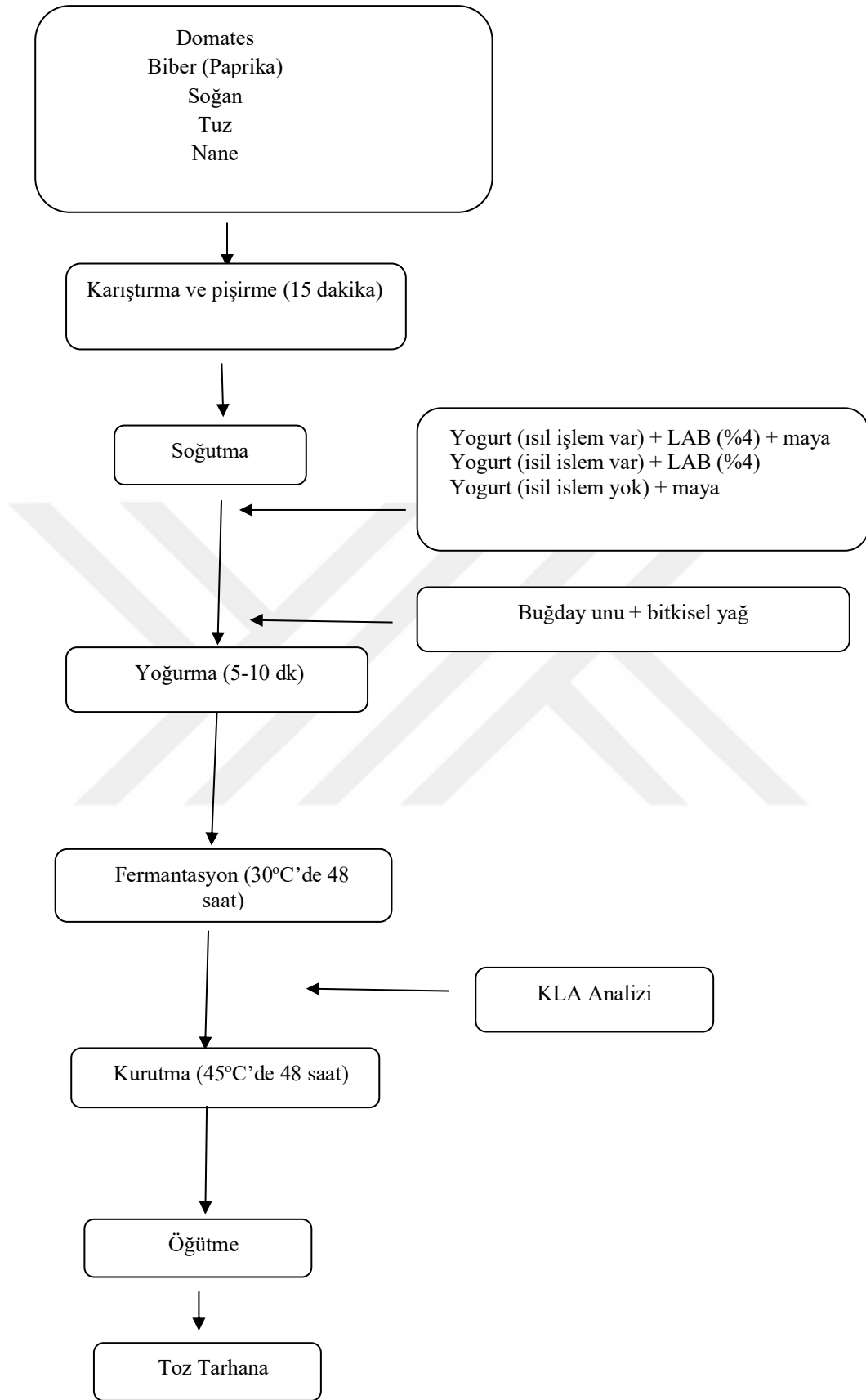
Tarhananın üretimi ve analizleri Ondokuz Mayıs Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan tarhananın KLA'ca zenginleştirilme sonuçları, tarhanada meydana gelen KLA'nın miktarı fermentasyon 48 saat'ten sonra ölçülmüştür.

3.2.7.1. Tarhana Üretimi

Bu çalışmada tarhana Koca et al. (2002) tarafından açıklanan yöntem esas alınarak üretilmiştir. Tarhananın bileşimi Tablo 3.2’de verilmiştir (Koca et al., 2002; TSI 2004). KLA ile zenginleştirilmiş tarhana üretim süreci Şekil 3.6’da özetlenmiştir. Tarhana üretimi için geleneksel olarak kullanılan hammaddelere %1 ayçiçek yağı ile starter kültür olarak *Limosilactobacillus* spp_M26, S3, 2-01 ve *Enterococcus* spp_2-09 izolatları tek tek ve karışım olarak eklenip 30°C’de 48 saat boyunca fermantasyon gerçekleştirilmiştir. Starter kültürlerinin LA dönüşüm oranını etkileyip etkilemediğini belirlemek için; starter kültür kullanılmış tarhana üretimi ile birlikte geleneksel yöntem ile starter kullanılmaksızın tarhana üretimi (kontrol) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen fermente ürün 7 gün sonra kuru hava sterilizatörü FN 400 (Nüve Sanayi Malzemeleri, Türkiye) kullanılarak 45°C’de 48 saat kurutulmuş ve takiben öğütülerek toz halde elde edilmiştir.

Tablo 3. 2. Tarhana Bileşimi (Koca et al. 2002; TSI 2004)

Malzemeler	%
Un	50
Yoğurt	25
Domates	8
Soğan	10
Tuz	4
Nane	1
Maya	1
Biber	1



Şekil 3. 6. Tarhana üretimi modifiye prosesi şekillendirilmiştir

3.2.7.2. Tarhananın Konjuge Linoleik Asit İçeriğinin Belirlenmesi

Fermente yaş tarhananın KLA içeriğı belirlenmiştir. Bu amaçla 4 g yaş tarhanaya 6 ml su ilave edilip pH değeri ölçölmüş ve takiben spektrofotometrik yöntemle KLA içeriğı belirlenmiştir (Troegeler-Meynadier et al. 2003; Barrett et al. 2007). Analizin gerçekleştirilmesinde 48 saat fermente edilmiş tarhanadan hazırlanan solösyonun 2 ml'si 4 ml izopropanol ile karıştırılarak 10.000 rpm hızda 4°C'de 30 dk santriföj edilip 30 saniye vortekslelendikten sonra 10 dk beklemeye bırakılmıştır. Takiben 3 ml hekzan eklenmiş ve tekrar 30 saniye vortekslenerek 10 dk bekletilmiştir. Yağ asidini ihtiva eden 2 ml hekzan çözeltisinin üstü kısmından bir pipet ile alınarak 233 nm dalga boyunda spektrometrede okunmuştur (Cary 60 UV-Vis spektrofotometrik, Agilent, Palo Alto, CA). Örneğlerin toplam KLA miktarı, 125 µg /ml'ye kadar bir seri konsantrasyonda hazırlanan KLA çözeltilerinden yararlanılarak çizilen standart eğri kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.7.3. Tarhananın pH Değerinin Belirlenmesi

pH ölçümü 2 g tarhana örneğinin 6 ml steril saf su içinde süspanse edilmesi ile hazırlanmış süspansiyona, daha önceden kalibre edilmiş pH metre elektrodunun sokulup okunması yoluyla gerçekleştirilmiştir. pH ölçümleri fermantasyonun başlangıcında, 48 saat fermantasyondan sonra ve oda sıcaklığında 7. gün ile 6 ay sonunda ölçölmüştür.

3.2.8. İstatistiksel Analiz

Tüm değlerler ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edilmiştir. Analizler istatistiksel yazılım SPSS (Versiyon 24.0 SPSS) kullanılarak yapılmıştır. Alt grup farklılıkları, tek yönlü ANOVA testi kullanılarak %95 istatistiksel bir anlamlılıkla test edilmiştir. Her bir parametre üç kez tekrarlanmıştır.

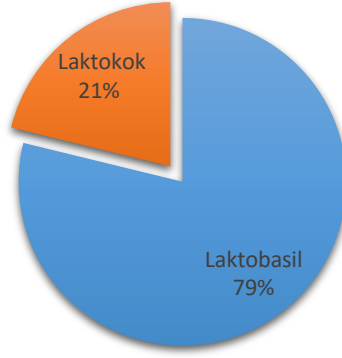
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Linoleik Asit'e Dayanaklı LAB İzolasyonu

Tarhana üretiminde starter kültür olarak kullanılacak LA'yı KLA'ya dönüştürme yeteneğine sahip LAB'ni izole etmek için kaşar peyniri, sucuk, keçi rümeni ve fermente *Chloroscombrus chrysurus* balığı—*adjeuvan* dahil olmak üzere toplam 21 örnek materyal yöntem bölümünde tarif edildiği gibi farklı üretim serisinden toplanmıştır. Besiyeri olarak MRS ve M17 agar kullanılarak laktobasil (n=424) ve laktokok (n=114) izolatları elde edilmiştir (Şekil 4.1). 538 koloniden 30 izolat nitrat redüktaz negatif ve 100 µg/ml LA'lı MRS agar üzerinde çoğalma kabiliyetine sahip olarak belirlenmiştir. LAB gelişimi inhibe edilen LA konsantrasyonu 25 µg/ml LA olarak bildirilmektedir (Jiang et al., 1998; Van Nieuwenhove et al., 2007). Literatürde bildirilen inhibisyon edici LA değeri (>%0,2) ile tutarsızlık gösterse bile izolatların bu yağ asidine duyarlılığı suş, ve kültür ortamının farklılığı ile kullanılan fermantasyon koşullarından kaynaklanmış olabilir (Demir and Talpur, 2010; Khaskheli et al., 2013; Suteebut et al., 2016; Tyagi et al., 2020).

Xu et al. (2008) LA *Lactobacillus acidophilus* ADH, *Lacticaseibacillus casei* ve *Lacticaseibacillus paracasei* çoğalmaları 0; 0,1; 0,5 ve 1 mg/ml LA ilave edilmiş MRS broth'ta dayanma kabiliyeti araştırılmış ve inhibisyon etkisi gözlemlenmemiştir. Bununla birlikte aynı araştırmada 0,5 ve 1 mg/ml LA seviyesi *Bifidobacterium longum* B6 çoğalmasını önemli ölçüde inhibe etmiştir. Ancak bu durum *Lactobacillus* spp'nin LA'ya *Bifidobacterium ssp* 'den daha dirençli olduğunu söylemek için tek başına yeterli değildir. Bu konuda ayrı bir karşılaştırmalı çalışma yapılması gerekir.

Başka bir çalışmada, sığır rumeninden izole edilen *Lactobacillus viridescens* ve *Levilactobacillus brevis* 01 izolatlarının LA'yı tolere ettiği bildirilmiştir. KLA üretim yeteneği suştan suşa değişir. *Levilactobacillus brevis* 01 artan ayçiçek yağı miktarına (%0,25; 0,5 ve 1,0) bağlı olarak yağın gramı başına 8,27; 5,73 ve 1,66 mg KLA üretmiştir. *Levilactobacillus brevis* 01'in aksine, *Lactobacillus viridescens* aynı konsantrasyonlarda 1,83; 5,23 ve 5,67 mg/g yağ verimi ile KLA üretmiştir (Puniya et al. 2008).

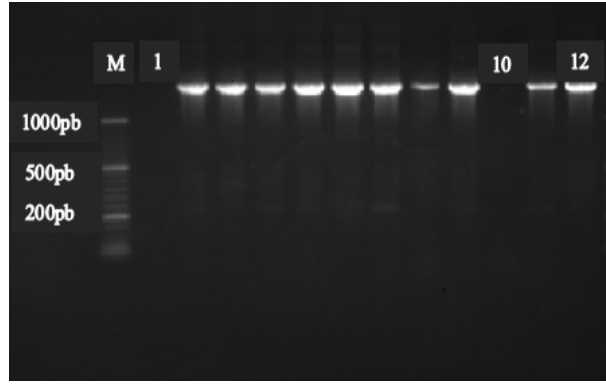


Şekil 4. 1. Tüm biyolojik matrislerden izole edilmiş olası *Lactobacillus* ve *Lactococcus* (%)

Suşların KLA üretime kabiliyetindeki tutarsızlık LA detoksifikasyonu, izolatların LA'ya duyarlılığı, bakteri suşlarının besiyerlerine adaptasyonu gibi faktörlerle ilgili olabilir. Buna göre sabit bir eşik değerinin olmadığını ve suşlara göre değiştiğini belirtmek gerekir. Sonuç olarak yeni izolatların yağ asitlerine duyarlılığını değerlendirmek için yüksek LA konsantrasyonlarında testlerin yapılması gerekir. Bu durum dikkate alınarak çalışmada LA (100 µg /ml) varlığında sürekli çoğalan 30 izolat seçilmiş ve KLA biyoaktif izomerlerinin üretimini içeren daha ileri çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

4.2. Linoleik Asit'e Dayanıklı LAB İzolatlarının Tanımlanması

538 izolattan 30'u (toplam izolatların %6'sı) LA ile zenginleştirilmiş MRS agar üzerinde çoğalan muhtemel KLA üreticileri olarak belirlenmiş ve yüksek üretim potansiyeline sahip 21 izolatın 16S rDNA gen dizilimi belirlenmiştir. Yöntem kısmında belirtilen evrensel primerler kullanılarak yapılan amplifikasyon sonunda 1000 bp'den yüksek uzunlukta PCR ürünleri elde edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4. 2. *Limosilactobacillus fermentum* suşlarının PCR ürünleri ve pozitif kontrol. (M: DNA marker (50-1000bp); 1: negatif kontrol; 2–9 ve 11: *Limolactobacillus fermentum*; 10: negatif sonuç; 12: *Limosilactobacillus sanfranciscensis* ATCC 27651^T)

Tüm izolatların 16S rRNA gen dizileri, sırasıyla 1,2 ve 1,3 kb'ye karşılık gelen AFK_2-01 ve AFK_2-04 suşları dışında en az 1,5 kb'den oluşmuştur. Bunların %99'dan fazla benzerlikle *Lactobacillus* spp ve *Enterococcus* spp cinsine ait olduğu bulunmuştur (Tablo 4.1). *Limosilactobacillus fermentum* cinsi baskın florayı (21 izolatların 18'i) oluştururken, sadece 2 izolat *Enterococcus faecium* türü olarak tanımlanmıştır. Mikroorganizmaları izole edilmek için kullanılan tüm biyolojik örnekler *L. fermentum* suşlarını içerirken, *E. faecium* suşları ise sadece peynir örneklerinde bulunmuştur. Peynirden sadece *Enterococcus* spp izole edilmesine rağmen *Enterococcus* spp'nin yaygın bulunduğu ve insan ve hayvanların bağırsaklarına doğal olarak yerleşik olduğu bilinmektedir (Beukers et al., 2017; Kılıç and Karahan, 2010; Zhang et al., 2016). *Enterococcus* spp genel olarak virülans faktörler ve antibiyotiğe dirençli genlere sahiptir. Hastalık yapabilmelerine rağmen bakteriyosin üretirler ve hatta insan sağlığı için faydalı probiyotik özelliklere sahip türler/suşlar da içerirler (Hanchi et al. 2018).

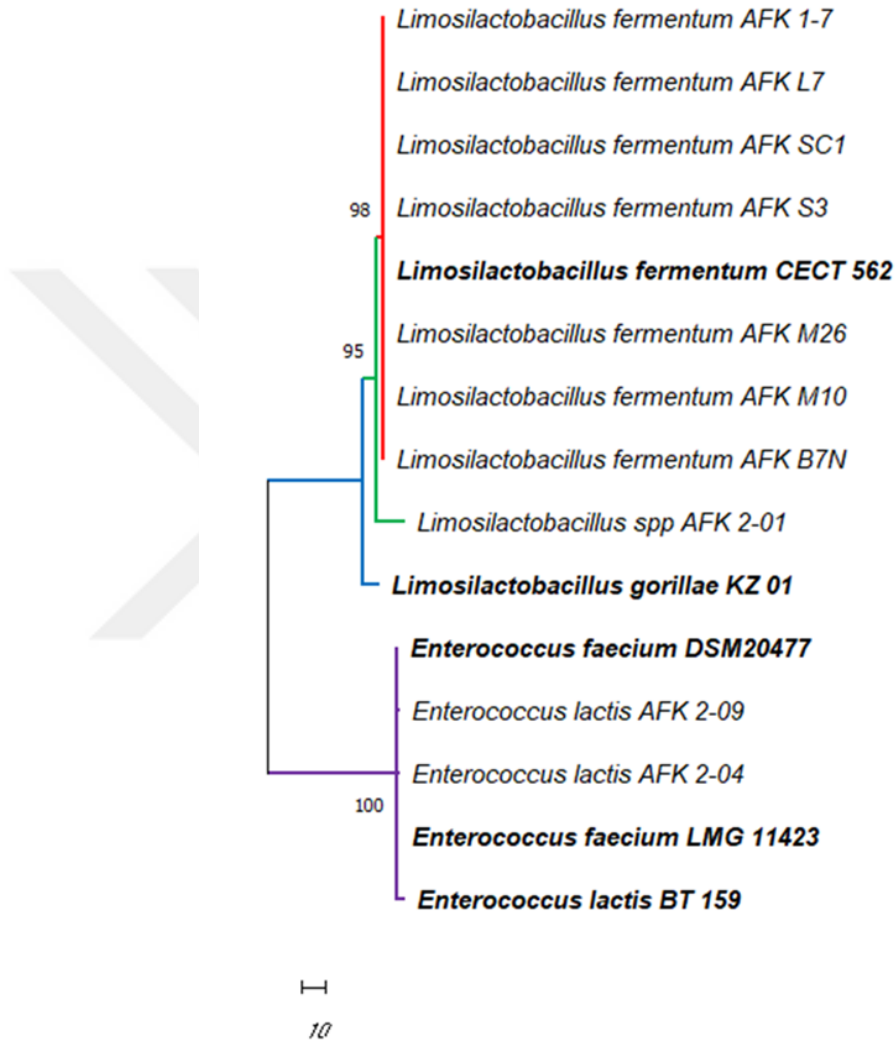
Tablo 4. 1. İzolasyon kaynakları ile ilgili LAB izolatları

İzolat	İzolasyon Kaynağı			
	Peynir	Sucuk	Fermente balık	Keçi rümeni
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK L7				x
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK B7				x
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK SC1			x	
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK S3		x		
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK M26	x			
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK M10	x			
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK 1-7	x			
<i>Lactobacillus</i> spp AFK 2-01				x
<i>Enterococcus faecium</i> AFK 2-04	x			
<i>Enterococcus faecium</i> AFK 2-09	x			
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK 1-2	x			
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK SE1		x		
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK 1-11	x			
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK 1-15	x			
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK 2-10	x			
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK 2-11	x			
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK 2-16	x			
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK R18				x
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK R09				x
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK R25				x
<i>Lactobacillus</i> spp AFK 1-17	x			

Tanımlanan 21 izolatlardan rasgele bir şekilde 10 tanesi seçilmiş ve KLA üretim testleri uygulanmıştır. Bu 10 izolatların akrabalık ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç Şekil 4.3'te verilmiştir. Bu filogenetik ağaç beş küme içermektedir: *Limosilactobacillus fermentum*, *Lb.*AFK_2-01, *Lb. gorillae* ve *Enterococcus faecium* ve *E. lactis*. *Fermentum* cinsi iki alt grup yani AFK_1-7, L7, SC1 ve AFK_S3, M26, M10, B7N ikinci alt grup olarak sınıflandırılmıştır. AFK_1-7, L7 ve SC1 türlerinin yakınlığı Tablo 4.2'de de gösterilmektedir. Bu türlerin ikili uzaklık mesafeleri (Tablo 4.2) filogenetik ağaçta olduğu gibi %0,07 nükleotidle birebirden uzaklaşmaktadır. Bu gözlem diğer cins ve türler için de geçerlidir. Sadece *Lactobacillus* spp AFK_2-01 genel olarak tüm diğer cins ve türlerinden en az %1,16 nükleotid farklıdır ve cins düzeyinde kesin tanısı için daha fazla analizlerin gerçekleştirilmesi lazımdır.

Önceki çalışmalara gelince, peynirde fekal kontaminasyon göstergesi olarak bilinen *Enterococcus* spp Tormo et al. (2015) tarafından açıklandığı gibi bazı faktörler yani coğrafi alanlar, çiftliğe özgü özellikler ve uygulamalara bağlı olarak işlenmiş süte geçebilirler. Çiftçilik uygulamaları bu faktörlere mükemmel bir örnektir. Tormo et al. (2015) sağım odası ile ahır arasındaki doğrudan temasın veya samanın ahırda

kullanılmasının *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium*'un süte geçişini arttırdığını bildirmiştir. *Enterococcus* 'un inek ve keçi sütlerinde bulunmaları Badis et al. (2004) ve Zamfir et al. (2006) gibi yazarlar tarafından ifade edilmiştir. Peynirde *Limosilactobacillus fermentum* ve *Enterococcus faecium* suşlarının izole edildiği çalışmalarla çalışmamızda elde edilen sonuçlar arasında fark yoktur.



Şekil 4. 3. *Limosilactobacillus fermentum*, *Limosilactobacillus gorillae* ve *Enterococcus* spp bakterilerinin 16S rRNA gen dizilerine dayanarak hazırlanmış filogenetik ağacı. (Maksimum Parsimony yöntemi kullanılarak bakterilerin evrimsel öyküsü, 1000 tekrarlanmada çıkarılmıştır. Ölçek çubuğu, site başına ikame sayısını temsil eder (Kumar et al. 2018).

Çalışmada belirlenen bu laktik asit bakterileri Türk beyaz peynirinin doğal mikroflorasında mevcuttur. *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* ve

Lactococcus lactis suşları peynirin olgunlaşma başlangıcında baskın iken *Limosilactobacillus fermentum* ve diğer laktobasiller az miktarda mevcuttur (Hayaloglu et al. 2002). Kaban and Kaya (2008) 7 sucuk örneğinden izole edilmiş 129 laktobasillerin %9,3'ünü *Limosilactobacillus fermentum* suşlarının oluşturduğunu bildirmiştir. Başka bir çalışmada Fildişi Sahilinden temin edilen örneklerimizden olan *adjuvan* fermente örnek gibi *Chloroscombrus chrysurus* numunesinden yüksek miktarlarda *Limosilactobacillus fermentum* suşları izole edilmiştir (Koffi-Nevry et al. 2011).

Literatür çalışmalarında *Limosilactobacillus fermentum* rutin olarak işkembeden izole edilmiş olmakla birlikte Puniya et al. (2008) tarafından Hindistan'da sığır rümeninden izole edilememiştir. Bu çalışmaların sonuçlarındaki tutarsızlık izolasyon süreçlerinin farklılığından kaynaklanabilir. Nitekim mikroorganizmaların izolasyonu sırasında rastgele seçilen 10 koloniden birinde *Limosilactobacillus fermentum* suşunun tanımlanması garanti değildir ve sadece bir şanstır. Asha and Gayathri (2012), Nielsen et al. (2007) ve Wayah and Philip (2018) *Limosilactobacillus fermentum* suşlarını farklı bitki, dışkı ve keçi sütünden izole etmişlerdir. Bu durum bu suşun rümen mikrobiyomunda bulunma olasılığını güçlendirmektedir. Rümen veya biyolojik örneklerin barındırdığı çeşitli bakterilerle aynı alandan seçilen örneklerden elde edilen isolatlar birbirinden farklı olup diğer bölgelerden de farklı suşları elde etmek mümkündür. Çünkü hayvanların yediği otların bileşiminin ve mikrobiyal yükünün bölgeden bölgeye farklı olması mikrobiyom oluşumu ve çeşitliliğini de etkileyebilecektir.

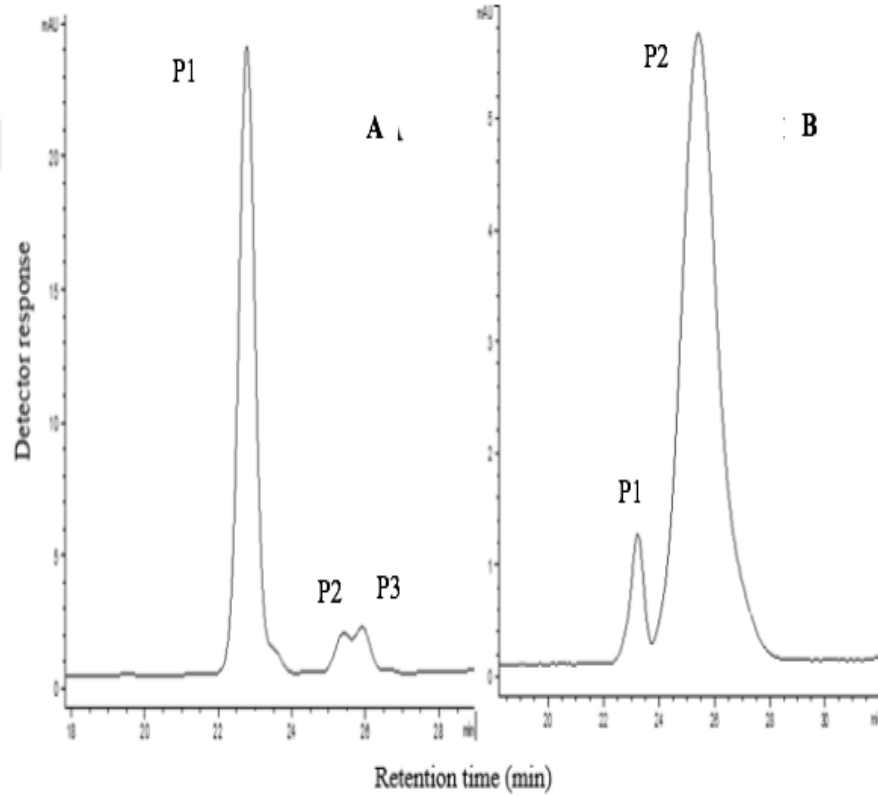
Tablo 4. 2. *Limosilactobacillus* ve *Enterococcus* türleri ikili uzaklık mesafeleri (*p*-değeri)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
<i>Lactobacillus_spp_L-7</i>		0.0000	0.0007	0.0124	0.0007	0.0013	0.0026	0.1156	0.0007	0.0020	0.1140	0.1172	0.0395	0.0020	0.0488	0.0421	0.0408	0.0167	0.1169
<i>Lb.fermentum_strain_NERC_15885</i>			0.0007	0.0119	0.0007	0.0007	0.0020	0.1134	0.0000	0.0013	0.1133	0.1165	0.0395	0.0013	0.0481	0.0415	0.0401	0.0167	0.1148
<i>Lactobacillus_spp_SCI</i>				0.0116	0.0000	0.0000	0.0013	0.1146	0.0007	0.0007	0.1140	0.1165	0.0402	0.0027	0.0495	0.0428	0.0415	0.0174	0.1166
<i>Lactobacillus_spp_2-01</i>					0.0116	0.0116	0.0116	0.0951	0.0148	0.0116	0.0925	0.0948	0.0290	0.0119	0.0401	0.0290	0.0376	0.0188	0.0951
<i>Lactobacillus_spp_S3</i>						0.0000	0.0013	0.1146	0.0007	0.0007	0.1141	0.1166	0.0402	0.0027	0.0495	0.0428	0.0415	0.0174	0.1166
<i>Lactobacillus_spp_M06</i>							0.0039	0.1136	0.0013	0.0007	0.1139	0.1165	0.0401	0.0027	0.0494	0.0428	0.0414	0.0174	0.1161
<i>Lactobacillus_spp_M10</i>								0.1182	0.0058	0.0013	0.1153	0.1172	0.0415	0.0040	0.0508	0.0441	0.0428	0.0187	0.1173
<i>Enterococcus_spp_2-04</i>									0.1159	0.1143	0.0041	0.0042	0.1063	0.1136	0.1171	0.1076	0.1225	0.1123	0.0039
<i>Lactobacillus_spp_L7</i>										0.0013	0.1139	0.1172	0.0395	0.0020	0.0488	0.0421	0.0408	0.0167	0.1166
<i>Lactobacillus_spp_B7N</i>											0.1141	0.1172	0.0411	0.0034	0.0505	0.0438	0.0418	0.0182	0.1163
<i>Enterococcus_fascium</i>												0.0070	0.1079	0.1132	0.1174	0.1092	0.1221	0.1126	0.0047
<i>Enterococcus_lactis</i>													0.1089	0.1165	0.1193	0.1089	0.1221	0.1151	0.0049
<i>Lactobacillus_gastricus</i>														0.0401	0.0408	0.0221	0.0428	0.0428	0.1070
<i>Lb.fermentum_strain_CIP_101980</i>															0.0488	0.0421	0.0414	0.0187	0.1143
<i>Lactobacillus_mucosae</i>																0.0394	0.0454	0.0482	0.1177
<i>Lactobacillus_equitigeroci</i>																	0.0448	0.0421	0.1083
<i>Lactobacillus_inghvaei</i>																		0.0455	0.1231
<i>Lactobacillus_gorillae</i>																			0.1130
<i>Enterococcus_spp_2-09</i>																			

4.3. KLA Biyoaktif İzomerlerinin Tanımlanması ve Seçimi

LA'nın varlığında sürekli çoğalan ve tam olarak tanımlanmış 21 izolatlar, *Limosilactobacillus fermentum* ve *E. faecium* türlerine ait olarak sınıflandırılmıştır. Bu izolatların LA içeren ayçiçek yağını KLA biyoaktif izomerlerine dönüştürme yetenekleri araştırılmıştır (Troegeler-Meynadier et al., 2003; Barrett et al., 2007).

İyot izomerizasyonu kromatogramları ve referans standartlardan alınan KLA izomerlerinin spektrum profilleri, izolatlar tarafından üretilmiş KLA profilleriyle karşılaştırılarak biyoaktif izomerleri tanımlanmıştır. Tüm izomerlerin türleri Eulitz et al. (1999) ve Delmonte et al. (2004) tarafından önerilen yöntemle doğrulanmıştır. İzomer tanımlama ve izomerlerin seçimi Şekil 4.4'A ve B' de alıkonma zamanına göre verilmiştir. Tüm suşlar KLA üretmişlerdir. İzolatlardan 10 tanesi yüksek oranda KLA biyoaktif izomerleri olan iki ana izomeri (*cis-9*, *trans-11*-KLA ve *trans-10*, *cis-12*-KLA) üretme yetenekleri nedeniyle seçilmiştir.



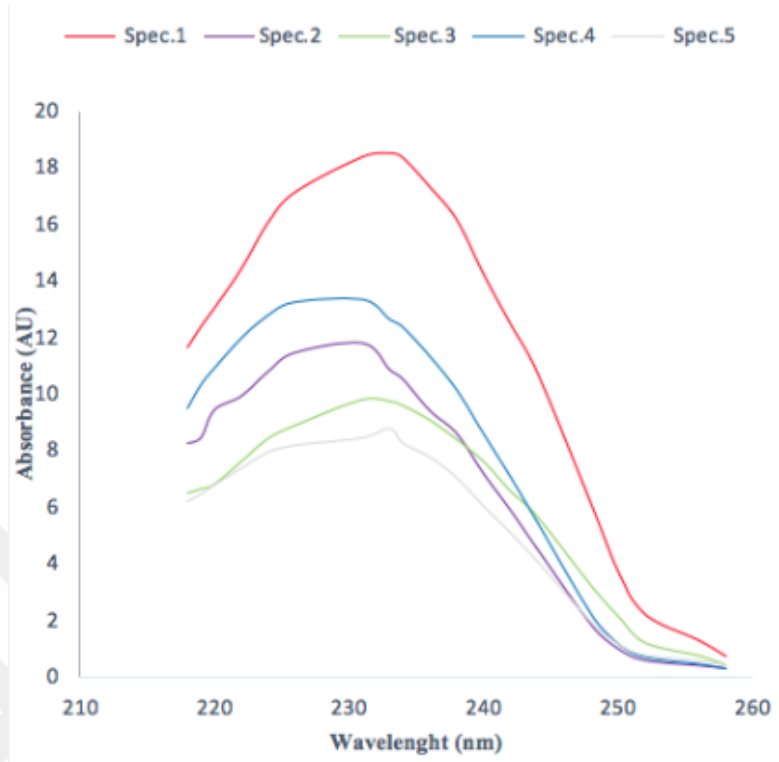
Şekil 4. 4. (A) *Limosilactobacillus fermentum* AFK M26 tarafından ayçiçek yağından üretilmiş KLA ve (B) Sigma KLA referans standardının kısmi kromatogramları. Pikler 22,7-23,5 ve 24-28. dakikalarda gelmiştir. P₍₁₋₃₎ ilgili pikler karşılık gelir

KLA referans standartlarından türetilen dalga boyu spektrumları ve bakteri suşların aktiviteleri ile bilinmeyen elde edilen izomerlerin dalga boyları tanımlanmasına dayanarak KLA izomer ayrımı yapılmıştır (Şekil 4.5). İzomerlerin alıkonma süreleri ve elüsyonu sıraları Banni et al. (2004) ve Melis et al. (2001) tarafından elde edilen değerlerle aynıdır. İki konjüge çift bağa sahip bir molekülün 233 nm'de maksimum UV absorpsiyonu gösterdiği hipotezine dayanarak tanımlanmış tüm izomerler referans standart izomerizasyonundan elde edilenlerle eşdeğer bir şekilde ilişkilendirilmiştir (Sels and Philippaerts, 2014). Fakat *t,t*-, *c,t*- veya *t,c*- ve *c,c*-KLA izomerleri sırasıyla 230, 232 ve 234 nm'de yüksek oranda UV absorpsiyonuna sahip olmasa bile izomerlerin arasında küçük farklılıklar meydana gelebilmiştir.

Sonuç olarak referanslar kullanılarak her bir izomerin piki standart ve örnek pikleriyle karşılaştırılarak elde edilen yeni piklerle ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle KLA standardını temsil eden 1 ve 2 nolu pikler (Şekil 4.5) sırasıyla 232 ve 233 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyona sahiptirler. Örnek ve referans standart pik 1'ler özdeş absorpsiyon özelliğine sahip olup bu iki pik *trans-10 cis-12*-KLA izomeriyle aynı anda alıkondukları için aynı bileşiğe karşılık geldikleri değerlendirilmiştir. Örneklerin diğer pikleri, yani 3 ve 4 nolu pikler (Şekil 4.5) UV 233 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon göstermişlerdir. Banni et al. (2004) ve Melis et al. (2001)'un belirttiği UV absorpsiyon spektrumu ve elüsyon sırası dikkate alındığında standartta elde edilen pik 2'nin bakterilerde elde edilen pik 2 ve 3 ile eşleştiği kabul edilmiştir. Referans standardın açıklama kılavuzundan pik 2, *cis-9*, *trans-11*-KLA izomerine karşılık geldiği, 2 ve 3 nolu piklerin *cis-9*, *trans-11* ve *trans-9*, *cis-11*-KLA izomerleri karışımı olduğu tahmin edilmiştir.

Bununla birlikte literatürde değinilmiş olmasına rağmen *cis-9*, *trans-11*-KLA ve *trans-10*, *cis-12*-KLA'nın ayrıştırılması gümüş içermeyen HPLC kolonları vasıtasıyla bir iştir (Sels and Philippaerts, 2014) ve bu iki izomer Melis et al. (2001) tarafından yapılan çalışmada da ayıramamıştır. Bu tez çalışması kapsamında yapılan analizlerde ise ayırım gerçekleştirilebilmiştir. Çalışmada elde edilen değerlerin literatür verilerinden farklı olması, analizlerde kullanılan kolonların farklı olmasına bağlanabilir. Mesela Melis vd. (2001) çalışmalarında C-18 Inertsil ODS-2: 5 µm, 150 x 4,6 mm kolon kullanırken çalışmalarımızda C-18 Inertsil ODS-3: 5 µm, 250 x 4,6 mm kolon kullanılmıştır. Kullanılan kolonların uzunlukları farklıdır. Daha uzun kolon

kullanılan ve dolayısı ile daha uzun alıkonma süresine sahip olması beklenen çalışmamızdaki ayrımın daha iyi gerçekleşmiş olacağı düşünülmektedir.



Şekil 4. 5. Üretilmiş KLA ve referans standartların spektrumları. (Şekil 4.4. B’de referans standartların pik 1 ve 2 olarak verilen KLA pikleri spektrumda sırasıyla Spec. 1 ve 2 olarak; Örneklerin Şekil 4.4. A’da 1, 2 ve 3 olarak verilen KLA pikleri de sırasıyla Spec. 3, 4 ve 5 şeklinde isimlendirilmiştir)

4.4. LAB Tanımlama Sonuçlarının Karbonhidrat Fermantasyon Profili Kullanılarak Doğrulanması

Laktik asit bakteri izolatlarının 16S rRNA gen dizisine göre yüksek benzerlik derecelerine ($\geq 99\%$) sahip olanlar arasındaki farklılıkları görmek için karbonhidrat fermantasyon testi uygulanmıştır. Fermantasyon profilleri suşların aynı olmadığını göstermiş ve fenotipik grupları da dikkate alınarak genotipleri farklı olanlar yeniden doğrulanmıştır (Tablo 4.3). Sonuçlar izolatların biyokimyasal özellikleri baz alındığında Bergey'in Bakteriyoloji Belirleme kılavuzunda açıklananlar ile benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur (Logan and De Vos, 2009).. AFK_2-04 suşu, *Enterococcus faecium* LMG 11423^T (%99,63) ve *Enterococcus lactis* BT159^T (%99,23) ile benzerken; AFK_2-09 suşu, aynı sırayla bu suşlara %99,86 ve %99,6'ya varan bir benzerliğe sahiptir. Filogenetik ağacın ayrıntılı analizi, AFK_2-04 ve AFK_2-09 suşlarının *Enterococcus faecium* LMG 11423^T ile *Enterococcus lactis*

BT159^T tip suşlarından çok yakın olduğunu ortaya çıkarmıştır. Filogenetik ağaç, aynı koşullar altında AFK_2-01 suşunun da *Limosilactobacillus fermentum* CECT 562'ye yakın, *Limosilactobacillus gorillae* KZ01'den ise uzak olduğunu göstermektedir.

AFK_2-01 izolatının *Limosilactobacillus fermentum* CECT 562 ile yakın familya ilişkisi olmasına rağmen ve *Limosilactobacillus fermentum* CECT 562 LA'yı 100 µg/ml'ye kadar tolere ettiğinden AFK_2-01'la aynı olduğu anlamına gelmemektedir. Bir de *Limosilactobacillus gorillae*'nin LA'yı tolere edemediğini varsaymak da mümkün değildir çünkü bu yeteneğin olmadığını bildiren bir literatür mevcut değildir.

Tablo 4. 3. KLA üreten laktobasillerin karbonhidrat fermantasyon profili

İzolatlar	Karbonhidratlar									
	Glukoz	Galaktoz	Sorbitol	Ksiloz	Inulin	Sukroz	Laktoz	Trehaloz	L-Ramnoz	Gliserol
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK B7N	+	+	-	+	-	w	+	+	-	-
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK 1-7	+	+	-	-	-	w	+	v	-	-
<i>Lactobacillus</i> spp AFK 2-01	+	+	-	+	-	+	+	-	w	-
<i>Enterococcus faecium</i> AFK 2-04	+	+	-	v	-	w	+	+	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> AFK 2-09	+	+	-	v	v	+	-	+	-	w
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK L7	nd	+	-	+	-	+	+	+	-	-
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK M10	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK M26	+	+	-	+	-	v	+	-	-	-
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK S3	nd	+	-	+	-	+	+	+	w	w
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK SC1	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-

nd: belirlenmedi; w: zayıf; v: değişken; +:

Spesifik 16S rDNA gen dizilimi suşların tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmakta ve izolat kimlikleri hakkında faydalı bilgiler sağlamaktadır. Literatürde 16S rRNA gen sekansların sonucunun ilk göstergesi sağlayabileceği bildirilmesine rağmen suşların benzerliğinin %97'nin üzerinde olduğunda, bu suşları birbirinden daha iyi ayırabilmek için DNA-DNA hibridasyonu gibi ek moleküler testlerin yapılmasına gerek vardır (Moore et al., 2006; Tindall et al., 2010). Öte yandan bir bakteriyel izolat tanımının kesin olarak doğrulanması için daha fazla moleküler ve biyokimyasal özellik testinin yapılması gerekirse de aynı bakterinin sergilenen işlevsellikleri hakkında hiçbir endişe yoktur çünkü buradaki seçilen tüm bakteri izolatları LA'ya dirençli özelliklere sahiptir. Ek olarak, *Limosilactobacillus fermentum* spp'nin biyomedikal ve gıda güvenliği alanında kullanılması gibi sağlık üzerine

pekçok faydasının olduğu bildirilmiştir (Dahiya et al., 2018; Naghmouchi et al., 2019; Wayah and Philip, 2018). Bu nedenle insan tüketimine yönelik KLA alternatiflerini çeşitlendirmeye dönük bu suşların endüstriyel ve probiyotik özellikleri süt ürünleri dışında diğer gıdaların zenginleştirilmesinde önemlidir. Bu bakteri suşları düşük maliyetli bir substrat kullanılarak antiobezite özelliğine sahip *trans-10*, *cis-12* KLA izomeri ile temel bir gıdanın zenginleştirilmesine zemin hazırlamaktadır.

4.5. Konjuge Linoleik Asit Biyoaktif İzomerlerinin Miktarı

Seçilmiş olan suşlar tarafından en fazla üretilen KLA, *trans-10*, *cis-12* izomeridir. Sigma Aldrich KLA standardından oluşturulan standart eğri ($R^2 = 0,9998$; $y = 0,1566x + 0,017$) kullanılarak toplam KLA miktarını hesaplanmıştır. Cary 60 UV-vis spektrofotometre (Agilent, Palo Alto, CA) kullanılarak 233 nm dalga boyunda KLA standart seri konsantrasyonlarıyla (0-125 µg/ml) dört paraleli standart eğri elde edilmiştir. Tüm tespit edilebilen izomerler dahil toplam KLA miktarı 4,64 ila 5, µg/ml arasında değişmiştir (Tablo 4.4.).

Tablo 4. 4. %0,1 ayçiçek yağı içeren mMRS'de lactobasiller tarafından üretilen toplam KLA miktarı (µg/ml) (n = 3)

İzolatlar	Ortalama	Std. sapma
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK M10	4,90 ^a	0,32
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK M26	4,64 ^a	0,32
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK 1-7	5,01 ^a	0,07
<i>Lactobacillus_spp_2-01</i>	5,07 ^a	0,28
<i>Enterococcus faecium</i> AFK 2-04	4,85 ^a	0,23
<i>Enterococcus faecium</i> AFK 2-09	4,77 ^a	0,28
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK B7N	5,22 ^a	0,47
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK L7	5,03 ^a	0,12
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK S3	5,06 ^a	0,29
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK SC1	5,01 ^a	0,32

İstatistiksel bir fark olmamasına rağmen ($p > 0,05$), *L. fermentum* AFK_2-01, AFK-B7N AFK_S3 suşları diğer suşlardan daha fazla KLA üretmiştir. Tüm izolatların farklı oranlarda *cis-9*, *trans-11*-KLA'dan daha fazla *trans-10*, *cis-12*-KLA izomeri ürettiği tespit edilmiştir. İzolatlar arasındaki izomer üretme miktarı farkı literatürde bildirilen farktan fazla değildir (Andrade et al., 2012; Yang et al., 2017).

Laktik asit bakterileri substrat (serbest LA, soya sütü, soya, aspir veya hint yağı ve risinoleik asit) ve kültür türüne göre litrede 1 mg ila 40g arasında değişen oranlarda KLA üretmektedir. İlave olarak KLA üretiminde kullanılan hücrelere (yıkanmış veya çoğaltılmış) göre de KLA miktarı değişebilmektedir (Andrade et al, 2012).

Bifidobakteriler ve laktik asit bakterilerinin LA'yı KLA'ya dönüştürme özelliğine sahip oldukları yaygın olarak bilinmekle beraber, *L. fermentum* suşunun bu dönüşümü yapabilme özelliği nadiren bildirilmiştir (Dahiya and Puniya, 2017). Çalışmamızda ve literatürde bazı çalışmalarda *L. fermentum* ve *E. faecium*'un bu yeteneğe sahip oldukları tespit edilmiştir. *Limosilactobacillus fermentum*'un ilk olarak LA'yı KLA'ya dönüştürdüğü Ham et al. (2002) tarafından KLA üreten LAB'nin tarandığı bir çalışmada tespit edilmiştir. Aslında Ham et al. (2002) sağlıklı bebeklere ait 19 adet dışkı örneğinden izole ettiği 34 adet laktik asit bakterisinden sadece L7-2 izolatu API testi kullanılarak *Limosilactobacillus fermentum* olarak tanımlanmıştır. Herzallah (2013) 5 hafta boyunca tavukları *Limosilactobacillus fermentum* içeren yemle besleyerek yumurtalarını (0,53 mg KLA/gram yağ) ve piliç etlerini (0,85 mg KLA/g yağ) KLA ile zenginleştirmeyi başarmıştır.

Benzer şekilde Terán et al. (2015) laktik asit ve bifidobakterileri kullanarak LA'yı KLA'ya dönüştürebilen bazı kültürler izole etmişlerdir. Çalışmada *Limosilactobacillus fermentum* CRL574, CRL1446, EFL2 ve EFL3 dahil olmak üzere seçilmiş olan dört starter kültür farklı seviyelerde KLA üreticisi olarak belirlenmiştir. *Limosilactobacillus fermentum* CRL574 türü 16,61 µg/ml ile en fazla KLA üreten suş olmuştur. Terán et al. (2015) yaptıkları araştırmada laktik asit bakterilerinin farklı miktarda KLA izomerleri ürettiklerini bildirmişlerdir. LAB, bifidobakterilerle kıyasladığında daha düşük miktarda KLA ürettikleri fark edilmiştir.

Literatürde bildirildiği gibi *cis-9*, *trans-11* ve *trans-10*, *cis-12*-KLA izomerlerinin miktarının izolatların suşlarına göre değiştiği bu çalışmada da tespit edilmiştir. Sosa-Sosa-Castañeda et al. (2015) tarafından yağsız sütte yapmış oldukları çalışmalarda *Limosilactobacillus fermentum* J20 suşunun *trans-10*, *cis-12*-KLA (8,27 µg/ml) izomerine göre daha fazla *cis-9*, *trans-11*-KLA izomeri (42,63 µg/ml) üretildiği vurgulanmıştır. *Limosilactobacillus fermentum* J23 ile J20 kıyaslandığında *trans-10*, *cis-12*-KLA dan daha az *cis-9*, *trans-11*-KLA izomeri (11,25 vs. 7,73 µg/ml) üretmiştir. Son zamanlarda Dahiya and Puniya (2017) tarafından süt ürünleri, anne

sütü, sağlıklı kişilerin dışkıları ve koleksiyon kültürleri dahil olmak üzere çeşitli kaynaklardan elde edilen 283 laktobasiller kullanılarak yapılan bir çalışmada LA'yı KLA'ya dönüştürme kabiliyetleri değerlendirmiştir. Sonuç olarak 283 izolatlardan yalnızca 57 izolat litrede 0,5 mg LA içeren MRS ve yağsız süt MRS broth içerisinde 20 µg/ml'den fazla KLA üretmiştir. Toplam KLA *cis-9*, *cis-11*-KLA izomerinden daha fazla *trans-10*, *cis-12*-KLA'dan meydana gelmiş ve miktarı 20 ile 44,45 µg/ml arasında değişmiştir. Yukarıda bahsedilen çalışmaların aksine Jiang et al. (1998), Pariza and Yang (2000), Al-hindi et al. (2015) kültür koleksiyonlarından izole ettikleri *Limosilactobacillus fermentum* türlerinin LA'yı KLA'ya dönüştürme yeteneğine sahip olmadıklarını bildirmişlerdir.

Enterococcus faecium türlerinin LA'yı KLA'ya farklı oranlarda dönüştürdüğü bildirilmiştir (Abd El-Salam and El-Shibiny, 2014; Gursoy and Kinik, 2010; Jalç et al., 2010; Kishino, Ogawa, Ando, et al., 2002a; Kishino, Ogawa, Omura, et al., 2002; Ting et al., 2016; Xu et al., 2004). Xu et al. (2004) *Enterococcus faecium* M74'ün hidrolize soya sütünden 0,78 mg KLA /g yağı ürettiği bildirilmiş ancak 48 saatlik bir inkübasyon boyunca hidrolize olmayan soya sütü kullanıldığında önceki değerlere ulaşamadığı ifade edilmiştir. Bazı *Limosilactobacillus fermentum* ve *Enterococcus faecium* suşlarının LA'yı başarılı bir şekilde KLA'ya dönüştürme kabiliyeti sergilemeleri ile birlikte süt ürünü starter kültürü olarak kullanılan LAB'nın bitkisel yağlardaki LA'yı KLA'ya dönüştürme kapasitesine sahip olduğu bildirilmektedir.

İnsanların satın alabileceği uygun maliyetli linoleik asitçe zengin yağlar nihai ürünün fiyatını düşürmesi bakımından önemlidir. *Lactobacillus viridescens* ve *Limosilactobacillus lactis*'in %1'e kadar farklı konsantrasyonunda ayçiçek yağı içeren yağsız sütte LA'yı 9,22 mg/g KLA'ya kadar dönüştürdüğü tespit edilmiştir (Puniya et al. 2009).

Hosseini et al. (2015) KLA üretmek için alternatif bir kaynak olarak risinoleik asit (%90) ve linoleik asit (%55-70) bakımından zengin ayçiçek yağı kullanma olasılığını araştırmışlardır. *Limosilactobacillus fermentum* ATC8014 suşunun ayçiçek yağındaki LA'yı (8-12 mg/ml) KLA *cis-9*, *trans-11* (0,38 ve 0,29 mg /ml) ve *trans-10*, *cis-12* (0,42 ve 0,53 mg/ml) izomerlerine dönüştürdüğü tespit edilmiştir. Aynı şartlarda hint yağından elde edilen sonuçlar sırasıyla *cis-9*, *trans-11*-KLA (0,42 ve 0,73 mg/ml) ve *trans-10*, *cis-12* KLA (0,37 ve 0,10 mg/ml) olmuştur. Risinoleik asit

(RA) ve ayçiçek yağının, KLA üretimi için substrat olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Kishino, et al., 2002a; Puniya et al., 2009; Van Nieuwenhove et al., 2007).

Limosilactobacillus türlerinin haricinde diğer LAB suşları da LA'yı KLA'ya genellikle *cis-9, trans-11*-KLA baskın izomerler olarak dönüştürür. Örneğin, *Enterococcus faecium* M74'ün, 48 saatlik bir inkübasyon sonunda hidrolize soya yağından *trans-10, cis-12* izomerinden daha fazla *cis-9, trans-11*-KLA ürettiği bildirilmiştir (0,73 mg/g yağ'a karşı. 0,05 mg /g yağ). Farklı çalışmalar *trans-10, cis-12; cis-9, trans-11* ve *cis-11, trans-13*-KLA izomerleri dahil olmak üzere LAB'lerinin toplam KLA üretme yeteneğini vurgulamışlardır (Sieber et al. 2004).

Fermantasyon ortamında bakteri kültürlerinin kullanılmasının yanı sıra bakterilerin yıkanmış hücrelerinin de LA'yı KLA'ya konjuge ettiği bildirilmiştir. Ama üretilen izomerlerin türü, suşların LA'yı (asıl substratı) veya alternatif bir substratı KLA'ya dönüştürme yeteneği pek çok faktöre bağlı olarak değişmektedir. İlave olarak substrat tipi ve bakteri suşları oluşan izomer türlerini de etkilemektedir. Kishino et al., (2002a) tarafından yıkanmış *Lactiplantibacillus plantarum* AKU 1009a hücrelerinin risinoleik asidi *trans-10, cis-12*- KLA yerine *cis-9, trans-11*-KLA ve *trans-9, trans-11*-KLA karışımına dönüştürdüğü bildirilmiştir.

Pariza and Yang (2000) suşların bu reaksiyonu gerçekleştirme yeteneklerindeki farklılığın, inkübasyon süresi, izolatların LA toksisitesine duyarlılığı, detoksifikasyon mekanizması ve bakterilerin üretmiş oldukları linoleat izomeraz türleri gibi faktörlere bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada Pariza and Yang (2000) 36 saatlik *Limosilactobacillus reuteri* PYR8 kültürünün daha yüksek *cis-9, trans-11*-KLA oluşturması için 3 saatlik inkübasyon süresinin gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Bunun aksine 4 ila 24 saat arasında inkübasyon süresine çıkıldığında *trans-9, trans-11* izomer konsantrasyonu artmakta ve diğer önemli izomerlerin konsantrasyonu kademeli olarak düşmektedir. *Lactobasillerin* bitkisel yağdaki LA veya risinoleik asidi KLA'ya dönüştürme yeteneği literatür verileri ile uyumludur. Fakat önceki çalışmalarda bakterilerin *cis-9, trans-11*-KLA izomerini *trans-10, cis-12*-KLA izomerinden fazla ürettiği bildirilmiş olup çalışmamızda fazla *trans-10, cis-12* üretiminin bir farklılık olduğu kaydedilmiştir. *Trans-10, cis-12*-KLA izomer baskınlığı, ortama L-serin, glikoz, AgNO₃ veya NaCl ilavesi, daha uzun inkübasyon süresi ve daha az substrat konsantrasyonu kullanılması nedeni ile *trans-9, trans-11*-

KLA oluşumunu engellemiştir (Kishino et al. 2002b; Kishino et al. 2003). Fakat uzun süreli inkübasyonda (48 saat) Terán et al. (2015) starter kültürlerinden %36'sının *trans-10, cis-12*-KLA izomeri meydana getirmediğini bildirmiştir.

Sonuç olarak izomer oluşumunun bakteriyel suşlarla güçlü bir şekilde ilişkili olabileceği düşünülmektedir. KLA izomerlerinin oluşumunu etkileyen faktörler ve glikoz konsantrasyonunun hem *trans-10, cis-12* hem de *cis-9, trans-11*-KLA izomerlerinin oranı üzerindeki etkilerini anlayabilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Literatürde elde edilen KLA miktarları çalışmamızdakilerle karşılaştırıldığında; *Limosilactobacillus fermentum* spp ve *Enterococcus faecium* spp tarafından üretilen ortalama 4,64–5,22 µg KLA/ml ve %0,83-0,93 LA dönüşüm oranı, Sosa-Castañeda et al. (2015) tarafından elde edilen dönüşüm oranlarından (%0,41-0,56) daha yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte Terán et al. (2015) ve Dahiya and Puniya (2017) tarafından elde edilenlerden (%2,71-20) ise daha düşüktür. Bu çalışmada test edilen tüm suşlar *cis-9, trans-11*-KLA izomeri ile karşılaştırıldığında daha faydalı özelliklere sahip *trans-10, cis-12*-KLA daha fazla üretiyor. Anti-obezite aktiviteye sahip *trans-10, cis-12*-KLA izomeri üreten bakteri türlerinin *cis-9, trans-11*-KLA üretenlerden daha az yaygın olduğu bilindiğinden (Rosberg-Cody et al. 2011; Yang et al. 2017), bu çalışmada KLA üreten bakteriler obezite prevalansını azaltmayı amaçlayan araştırmalarda kullanılabilir.

Ayrıca *Limosilactobacillus fermentum* türlerinin biyomedikal, gıda güvenliği ve sağlık açısından önemli özelliklere sahip olduğu da tespit edilmiştir (Dahiya and Puniya, 2018; Naghmouchi et al., 2019; Wayah and Philip, 2018). Bu nedenle probiyotik suş özelliklerinin test edilmesine ve bunların insan tüketimine dönük KLA kaynaklarını çeşitlendirmek için süt ürünlerinden başka günlük tüketimi yaygın gıdaların KLA ile zenginleştirilme çalışmalarında kullanılmasına ihtiyaç vardır. Gerçekleştirilen bu araştırma ile ilk olarak *Limosilactobacillus fermentum* türlerinin ayçiçek yağındaki LA 'yı *trans-10, cis-12*-KLA izomerine dönüştürebildiğini göstermektedir. Bu sonuç bu bakteri türlerinin uygun maliyetli bir substrat kullanılarak gıdaların *trans-10, cis-12*-KLA ile zenginleştirilmesinde kullanılabileceğini gündeme getirmektedir.

4.6. Konjuge linoleik asit üretim standardizasyonu ve ortam pH'sının optimizasyonu

Limosilactobacillus fermentum ve *Enterococcus faecium* spp izolatları KLA üretim sonuçları Tablo 4.5 ve Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Genel olarak aşılınmış kültürün 24 saatlik inkübasyon süresinden sonra CaCO_3 ilave edilmesi pH değerlerini artırmıştır. Literatürde yapılan çalışmalara göre fermantasyon ortamına potasyum karbonat ilavesi Ca-asetat oluşumunu teşvik etmekte ve bu fermantasyon ortamının pH'sının yükseltmesini sağlamaktadır (Jenkins et al., 2014; Martin and Jenkins, 2002)

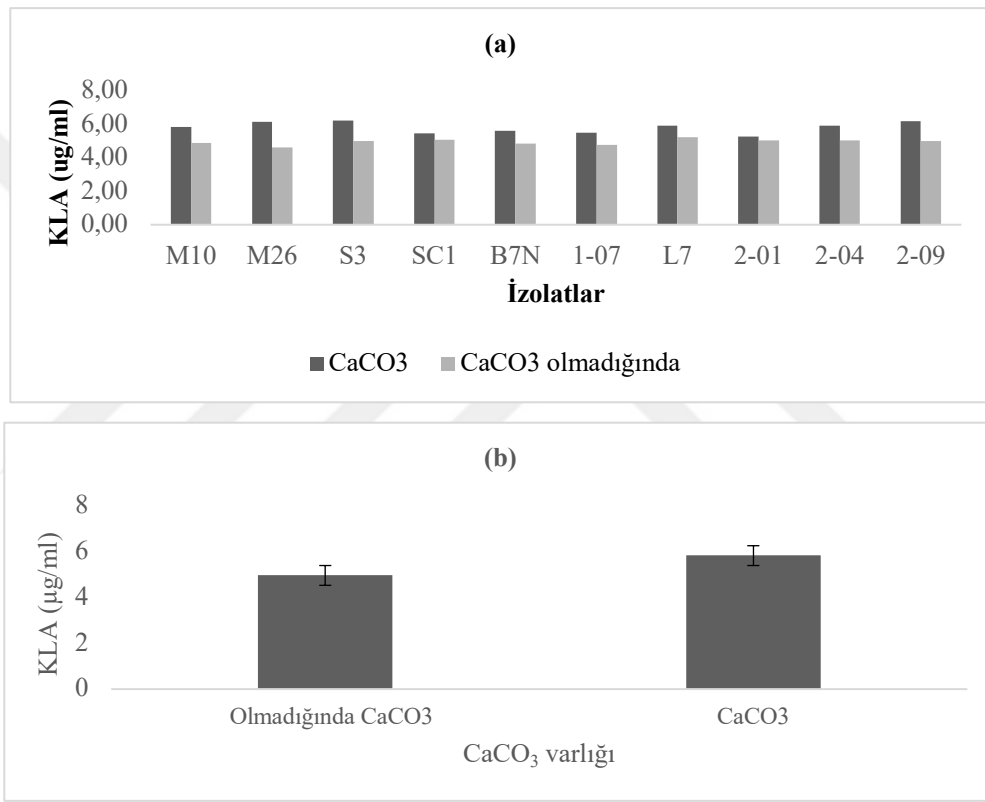
Tablo 4. 5. % 0,1 LA konsantrasyonda CaCO_3 varlığı ve yokluğunda izolatlar tarafından üretilen KLA değerleri

İzolatlar	N	KLA Üretimi ($\mu\text{g/ml}$)	
		CaCO_3 varlığında	CaCO_3 olmadığında
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK M10	5	5,85 $\pm$ 0,56 ^a	4,90 $\pm$ 0,32 ^b
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK M26	3	6,15 $\pm$ 0,72 ^a	4,64 $\pm$ 0,32 ^b
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK S3	4	6,23 $\pm$ 1,15 ^a	5,06 $\pm$ 0,29 ^b
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK SC1	3	5,46 $\pm$ 0,44 ^a	5,01 $\pm$ 0,32 ^b
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK B7N	3	5,64 $\pm$ 0,15 ^a	5,22 $\pm$ 0,23 ^b
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK 1-7	3	5,52 $\pm$ 0,21 ^a	5,01 $\pm$ 0,07 ^b
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK L7	4	5,91 $\pm$ 0,54 ^a	5,03 $\pm$ 0,12 ^b
<i>Lactobacillus</i> spp_2-01	4	5,29 $\pm$ 0,22 ^a	5,07 $\pm$ 0,28 ^b
<i>Enterococcus faecium</i> AFK 2-04	5	5,93 $\pm$ 0,53 ^a	4,85 $\pm$ 0,23 ^b
<i>Enterococcus faecium</i> AFK 2-09	3	6,21 $\pm$ 0,39 ^a	4,77 $\pm$ 0,28 ^b

Yapılan istatistik olarak analize göre %0,1 konsantrasyonda LA'yı KLA'ya dönüştürmesinde, CaCO_3 olup olmadığında izolatların performansı arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0,05$, Tablo 4.5). Tüm izolatlar LA'yı yaklaşık olarak aynı oranda KLA'ya dönüştürmektedir. Bununla birlikte CaCO_3 varlığında izolatlar tarafından üretilen KLA miktarı ile yokluğunda üretilen KLA miktarı arasında farklılık olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$, Tablo 4.5, Şekil 4.6'a). Elde edilen sonuç CaCO_3 katılmasının KLA üretimini teşvik ettiğini göstermektedir.

İzolatların CaCO_3 varlığında LA'yı KLA'ya konjuge etme performansı Şekil 4.6a'da izolatlar bazında ayrı ayrı; Şekil 4.6b'de de bileştirilmiş olarak gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre CaCO_3 takviyesi KLA üretimini önemli ölçüde artırmaktadır. Aynı

şekilde Jenkins et al. (2014) hayvanların yemlerine potasyum karbonat (KCO_3) ilavesinin sütün yağ miktarı üzerine etkisini ve hayvanın içkembesinde üretilen KLA türü üzerine etkisini araştırmışlardır. Hayvanların yemlerine KCO_3 ilavesinin *cis-9*, *trans-11*-KLA üretimini artırdığı ancak *trans-10*, *cis-12* KLA izomerini düşürdüğünü fark etmişlerdir. Aynı araştırmacılar tüm kültürlerin potasyum karbonata aynı şekilde tepki göstermediğini bildirmişlerdir. Üretilen KLA izomerlerinin türünün bakteri suşları, substrat çeşidi, fermentasyon koşulları ve inkübasyon süreleri dahil olmak üzere pek çok faktöre bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir (Lin, 2000; Martin and Jenkins, 2002).

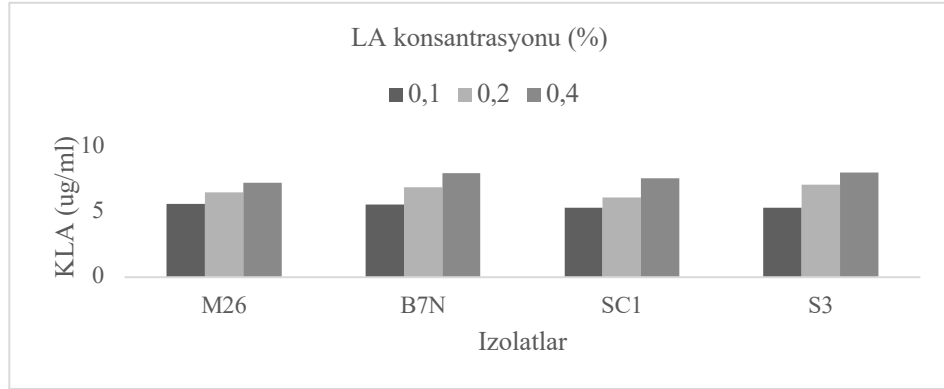


Şekil 4. 6. Kalsiyumun Karbonatın (CaCO_3) izolatların KLA üretimi üzerine etkisi: CaCO_3 içeren veya içermeyen İzolatların KLA üretim performansları (a), tüm bakterin toplu KLA üretim performansı (b).

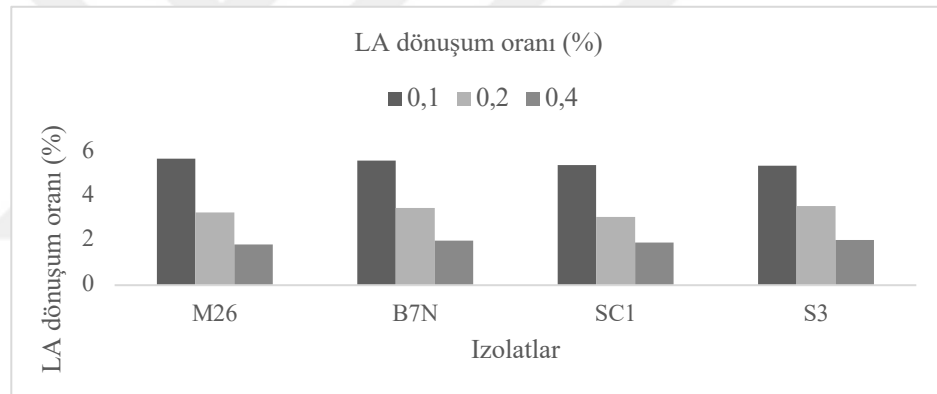
4.7. Linoleik Asit Konsantrasyonunun KLA Üretimi Üzerine Etkisi

Kültür ortamına ilave edilen LA miktarının KLA sentezi üzerine etkisi araştırılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.7 ve 4.8’de gösterilmiştir. Aynı koşullar altında kıyaslamalar yapılmasının gerekliliğinden dolayı KLA üretim kabiliyetlerine göre izolatların kökenleri de dikkate alınarak dört izolatları seçilip takip eden çalışmalar bunlarla yürütülmüştür. LA konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak daha

fazla KLA üretildiği ancak LA'nın KLA'ya dönüşüm oranının düştüğü belirlenmiştir. Bu sonucun KLA üretiminde kullanılan bakteri çoğalmasını etkileyen LA inhibisyonunun etkisinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Jiang et al., 1999).



Şekil 4. 7. Farklı LA konsantrasyonlarının KLA üretimi üzerine etkisi



Şekil 4. 8. Farklı LA konsantrasyonlarının KLA'ya dönüşüm oranı üzerine etkisi

Sonuç olarak, KLA üretim ortamına CaCO_3 ile takviye edilmesi, KLA üretimini iyileştirir, ancak KLA üreten bakterilerin çoğalmaları etkileyen LA inhibisyonu etkisini azaltmamıştır. Tüm bakteriler, CaCO_3 takviyesine eşit şekilde yanıt vermediğinden, yalnızca geniş LA konsantrasyonları aralığında belirli bir bakteri suşu CaCO_3 varlığında bakteri üzerine LA inhibisyonu değişimin tutarlı bir şekilde araştırılmasına ihtiyaç duyulur.

4.8. Konjuge Linoleik Asit ile zenginleştirilmiş Tarhana Üretimi

KLA ile zenginleştirilmiş tarhana üretimi %1 ayçiçek yağı ve starter kültür (KLA üretim kabiliyetlerine göre seçilen *Limosilactobacillus fermentum* AFKM26,

S3, 2-01, *Enterococcus faecium*_2-09 izolatları ile maya ve bunların karışımları) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Üretim prosesi boyunca starter kültürlerin fermente edilmiş yaş tarhana (Şekil 4.9) ve kurutularak öğütülmüş toz tarhanada (Şekil 4.10) bulunan KLA miktarı ile pH değerini nasıl etkilediği araştırılmıştır.



Şekil 4. 9. Fermente edilmiş tarhana (yaş tarhana)



Şekil 4. 10. Kurutulmuş tarhana (toz tarhana)

4.8.1. Tarhananın KLA İçeriği

Tarhananın KLA metodolojinde belirlendiği gibi ekstrate edilip ve toplam KLA miktarı, KLA standardından (Sigma Aldrich, MO, ABD) oluşturulan standart eğri ($R^2=0,9998$; $y=0,1566x + 0,017$) kullanılarak hesaplanmıştır. Toz tarhanada toplam KLA miktarı 12,33-13,44 $\mu\text{g/g}$ arasında bulunmuştur (Tablo 4.6).

Tablo 4. 6. %1 ayçiçek yağı ile zenginleştirilmiş tarhanada laktobasiller tarafından üretilen toplam KLA miktarı ($\mu\text{g/g}$ kurutulmuş tarhana) (n = 3)

İzolalar	N	Ortalama	Std. sapma
<i>Lactobacillus_ssp_I2-01</i>	3	13,07 ^b	0,66
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK M26	3	13,44 ^b	1,39
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK S3	3	12,41 ^b	0,99
<i>Enterococcus faecium</i> AFK 2-09	3	12,79 ^b	0,29
<i>Limosilactobacillus fermentum_ssp_MiX</i>	3	13,71 ^b	1,12
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK M26+Y	3	13,02 ^b	0,87
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK S3 +Y	3	13,42 ^b	0,23
<i>Enterococcus faecium</i> AFK 2-09+Y	3	13,21 ^b	1,12
<i>Limosilactobacillus fermentum_MiX+Y</i>	3	12,33 ^b	1,05
<i>Lactobacillus spp_I2-01+Y</i>	3	12,84 ^b	0,61
Kontrol (Standart tarhana)	3	4,24 ^a	0,28

Ktrl: Kontrol, Y: Maya (*Saccharomyces cerevisiae*),

Farklı starter kültür kullanılan örneklerin KLA içerikleri arasında istatistiki bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Yalnızca bakteriyel starter kültür kullanılarak elde edilen KLA miktarlarının genellikle maya kültürü ilavesinden sonra elde edilenlerle benzer bulunmuştur ($p>0,05$). Dolaysıyla üretim sürecinde maya ilavesi LA'yı KLA'ya dönüştürme oranını değiştirmemiştir. Bu nedenle tarhana örneklerinde bakteri suşları ile birlikte maya kullanılması KLA bakımından insan tüketimi için risk oluşturmamaktadır. Fakat daha önce literatürde aktarılan verilerden KLA'nın maya özellikle *Saccharomyces cerevisiae* tarafından kullanıldığı veya bozulma mekanizmasının izomerlere güçlü bir şekilde bağımlı olduğu bildirilmişlerdir. Bu enzimlerin yağ asidi beta-oksidasyonunda yer alan bazı maya suşlarında sıklıkla bulunduğu rapor edilmiştir (Einerhand et al, 1993; Filipits et al., 1993). Gurvitz et al. (2001) KLA ortamında çoğaltılan *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinin *trans-10*, *cis-12*-KLA izomerinden yararlandığını ancak karşılık gelen *cis-9*, *trans-11* izomerini kullanmadığını bildirmiştir. Bu çalışmada kullanılan starter kültürler tarafından büyük oranda *trans-10*, *cis-12*-KLA izomeri üretildiği için Gurvitz et al. (2001) tarafından bildirilen *trans-10*, *cis-12*-KLA izomerinin mayalar tarafından kullanıldığı bilgisi desteklenmemiştir. Aynı zamanda, Hiltunen and Qin (2000) tarafından doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunun genellikle yardımcı enzimlerle ilişkili olduğu ve *cis* veya *trans* çift bağın açıl- zincirinin çift veya tek konumunda olmasına bağlı olduğu bildirilmiştir. Yukarıdaki gözlemlerle ilgili olarak maya tarafından KLA izomerlerinin

kullanımı suş özgüllüğü ile mi yoksa oluşan açıl-CoA ara metabolitleriyle mi ilişkili olduğunu değerlendirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

KLA ile gıdaların zenginleştirilmesi, bu gıda maddesinin insanlar tarafından günlük kullanımının gerçekleştirilebilmesi nedeniyle araştırmacıları cezbetmiştir. Araştırmalar hem yetersiz beslenme hem de fazla kilo, obezite ve diyetle ilgili bulaşıcı olmayan rahatsızlıkların üstesinden gelmek için bu yola odaklanmışlardır. Birçok çalışma geleneksel ürünlerde KLA düzeyini veya süt ürünlerindeki miktarını artırmaya odaklanmıştır (Abo El-Nor and Khatlab, 2012; Herzallah et al., 2005; Shinn et al., 2017; Van Nieuwenhove et al., 2007).

Gıda maddelerinin KLA düzeyini artırmaya yönelik girişimler göz önüne alındığında unlu mamullerin veya bitki bazlı gıdaların KLA ile zenginleştirilmesi konusunda çok daha az çalışmanın var olduğu görülmektedir. Vahvaselkä et al. (2004, 2006) tarafından yapılan çalışmada yulaf yağında bulunan LA, mikrobiyal izomerizasyon ve hidroliz işlemleri ile başarılı bir şekilde KLA'ya dönüştürülerek yulaf KLA ile zenginleştirilmiştir. Kısaca ayçiçek yağı (%5) ile takviye edilmiş yulaf yağının LA içeriği izomerize edildikten sonra 50 saat fermente edilmiştir. KLA içeriği yaklaşık 22,3 mg/g kuru madde veya 118 mg/g lipit olarak tespit edilmiştir. KLA ile zenginleştirilmiş gıda maddelerinin üretimi farklı zorluklar içermektedir. Bu nedenle daha iyi, daha ucuz veya daha etkin bir KLA üretmek ve tüketici isteklerini yerine getirmek için rekabetçi ve uygun maliyetli KLA ile zenginleştirilmiş bitkisel, pazarlanabilir ve uygun fiyatlı ürün geliştirilmesi gerekmektedir.

Gursoy and Kinik (2010) starter kültür olarak *Enterococcus faecium* kullanılarak peyniri KLA ile başarılı bir şekilde zenginleştirmişlerdir. KLA ile gıda maddelerinin zenginleştirilmesine yönelik yaklaşımlarda başarı faktörleri substratta bulunan yağın önceden hidroliz ve izomerize edilmesi ve sonrasında tüketiciler için uygun maliyetli bir son ürün haline dönüştürülmesini kapsamalıdır. Ancak literatürden aktarılan sonuçların aksine *Limosilactobacillus* ve *Enterococcus spp* kullanılarak substratın enzimatik hidrolizasyonu yapılmadan fermantasyon yoluyla KLA'lerce bitki bazlı zenginleştirilmiş gıda üretmek mümkündür. Sonuç olarak toz tarhananın toplam KLA içeriği 12,33 ila 13,44 µg/g arasında değişmiştir. *L. fermentum* izolatlarından AFK_M26 ve AFK_S3+Y'ün tüm deneylerde diğer suşlardan daha fazla miktarda KLA ürettiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen bakteriler kullanılarak KLA'ca

zengin tarhananın insanlarda obeziteyi azaltmak amaçlı kullanılabilmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

4.8.2. Tarhananın pH Değeri

Bu çalışmada üretilen tarhananın organoleptik özelliklerini ve raf ömrünü değerlendirmek için yaş ve toz halindeki tarhananın pH değişimi için 4 g tarhanaya 6 ml su ilave edilip pH'sı ölçülmek suretiyle kontrol edilmiş ve yaygın olarak kullanılmayan starter kültürlerle mayanın aynı anda kullanılmasının tarhananın pH değerini nasıl etkilediği saptanmıştır. Tarhana örneklerinin pH değerinin 3,4-4,9 arasında değiştiği literatürlerde bildirilmiştir (Ibanoglu et al., 1995; Daglioglu 2000; Koca et al., 2002).

Fermantasyon başlangıcında, fermantasyondan 48 saat sonra, fermantasyondan sonra 7. gününde ve oda sıcaklığında 6 ay depolamadan sonra tarhana örneklerinin pH değeri ölçülmüştür. Sonuçlara göre pH' değerleri fermantasyon ve kurutma da dahil olmak üzere tüm süreçlerde 5,76–3,35 arasında değişmiştir (Tablo 4.7). Fermantasyon süresi arttıkça tüm numunelerin pH değeri önemli ölçüde düşmüştür.

Sonuçlarımız önceki bulgularıyla uyumlu olup depolama süreci boyunca pH'ın düşüşü gözlemlenmiştir (Ibanoglu et al., 1995; Daglioğlu, 2000; Tarakçi et al., 2004). Diğer çalışmalarda gözlemlendiği gibi pH'da düz bir düşüş (5,76'ten 3,35'e) gözlenmiştir. Asitliğin yüksek olması uzun bir depolama süresi sağlamaktadır (Erbaş et al., 2006). Hızlı pH düşüşü çoğunlukla bu çalışmada kullanılan starter kültürlerin (*Enterococcus faecium* AFK 2-09 hariç) genel olarak aktif bir şekilde yoğurttan gelen laktozu fermente etmesiyle ilgili olabilir. LAB karbonhidratları fermente edip laktik aside dönüştürerek pH düşüşüne neden olmaktadır. Fermantasyon süresince oluşan organik asitler ile düşen pH Daglioglu (2000) tarafından belirtildiği gibi düşük nem içeriği (%6-10) ile birleşerek patojenler ve saprofit mikroorganizmalar için olumsuz bir ortam oluşturur.

Tablo 4. 7. Depolama süresince Tarhananın pH'ında meydana gelen değişiklikler.

Tip	İzolatlar	0. saat	48 saat	7. gün	6. ay
-Y	<i>Lactobacillus_spp_I2-01</i>	5,54	3,47	3,49	3,80
	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK M26	5,65	3,54	3,60	3,95
	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK S3	5,62	3,49	3,50	3,89
	<i>Enterococcus faecium</i> AFK 2-09	5,44	3,42	3,43	3,90
	İzolatların Karışımı (Mix)	5,74	3,70	3,76	4,16
	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK M26	5,53	3,54	3,56	3,94
	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK S3	5,69	3,53	3,44	3,92
	<i>Enterococcus faecium</i> AFK 2-09	5,55	3,47	3,40	3,93
	İzolatların Karışımı (Mix)	5,46	3,48	3,42	3,99
	<i>Lactobacillus_spp_I2-01</i>	5,40	3,47	3,44	3,87
	<i>Lactobacillus_spp_I2-01</i>	5,47	3,49	3,45	3,86
	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK M26	5,56	3,55	3,50	4,04
	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK S3	5,76	3,48	3,41	3,91
	<i>Enterococcus faecium</i> AFK 2-09	5,34	3,35	3,40	3,87
	İzolatların Karışımı (Mix)	5,67	3,64	3,74	3,90
+Y	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK S3	5,61	3,68	3,77	4,26
	<i>Enterococcus faecium</i> AFK 2-09	5,44	3,68	3,68	4,17
	İzolatların Karışımı (Mix)	5,56	3,66	3,76	4,17
	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK M26	5,60	3,70	3,83	4,23
	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK S3	5,65	3,51	3,76	4,28
	<i>Enterococcus faecium</i> AFK 2-09	5,5	3,67	3,42	4,18
	İzolatların Karışımı (Mix)	5,69	3,66	3,72	4,16
	<i>Lactobacillus_spp_I2-01</i>	5,53	3,61	3,82	4,35
	<i>Lactobacillus_spp_I2-01</i>	5,37	3,66	3,81	4,28
	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK M26	5,53	3,67	3,73	4,31
	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK S3	5,76	3,69	3,77	4,25
	<i>Enterococcus faecium</i> AFK 2-09	5,34	3,67	3,70	4,14
	İzolatların Karışımı (Mix)	5,80	3,65	3,74	4,26
	<i>Lactobacillus_spp_I2-01</i>	5,44	3,68	3,82	4,22
	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> AFK M26	5,56	3,69	3,77	4,45
	Kontrol	5,49	3,67	4,27	4,42

Kontrol: kontrol, +Y: Mayalı, -Y: Mayasız

5. SONUÇ VE PERSPEKTİFLER

Bu çalışmada farklı bölgelerden toplanan kaşar peyniri, fermente sosis- sucuk, fermente *Chloroscombrus chrysurus* balığı ve keçi rümenlerinden izole edilen toplam 538 izolatlardan 30'ü 100 µg/ml LA eklenmiş MRS agarında çoğalmıştır. Bu 30 izolatları 16S rRNA gen dizi analizi gerçekleştirilmiş ve bunların tamamı ayçiçek yağındaki LA'yı kullanılarak KLA üretmiştir. Bu 10 izolatların karbonhidrat fermentasyonu profili ve filogenetik ağaç kullanılarak da tanımlanmıştır. *Limosilactobacillus fermentum* ve *Enterococcus faecium* türleri olarak tanımlanan 21 izolat ile çalışmada tanımlanan 10 izolatın çoğunluğunun *trans-10*, *cis-12*-KLA izomerini ürettiği tespit edilmiştir. Üretilen KLA miktarının en az %85'ini *trans-10*, *cis-12*-KLA izomerleri oluşturmuş ve üretim miktarı 4,64 -5,22 µg/ml arasında değişmiştir.

KLA üretilen ortama CaCO₃ ilave edilmesiyle KLA üretimi artmıştır. Tüm bakteriler CaCO₃ takviyesine aynı şekilde yanıt vermediğinden geniş LA konsantrasyonları aralığında LA inhibisyonu araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada en fazla miktarda elde edilen *trans-10*, *cis-12*-KLA izomeri birçok potansiyel sağlık yararı nedeniyle *L. fermentum* ve *E. faecium* suşlarının ayçiçek yağındaki LA'yı KLA'ya dönüştürerek geleneksel bir ürün olan tarhananın KLA'ca zenginleştirilmesinde kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Oda sıcaklığında 6 ay depolama süresinden sonra da tarhana örneklerinin pH değerinin 4,45–3,35 arasında olduğu için patojen bakterilerin gelişmelerini engelleyebilir. Bundan sonraki çalışmalarda elde edilen KLA'ca zenginleştirilmiş tarhananın bileşen ve yağ asidi analizlerinin yapılması; proste yer alan laktik asit bakterilerinin güvenliğinin araştırılması uygun olacaktır. Uygun sonuçlara ulaşılması durumunda izole edilen LAB kültürleri ile KLA bakımından zenginleştirilmiş tarhana endüstriyel ölçekte üretilebilecektir.

6. KAYNAKÇA

- Abd El-Salam M. H, El-Shibiny S (2014). Conjugated linoleic acid and vaccenic acid contents in cheeses: An overview from the literature. *Journal of Food Composition Analysis*, 33:117–126 <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.08.004>.
- Abdollahi M., Abdolghaffari A. H, Gooshe M, Ghasemi-Niri F, Lara-villoslada Federico, Olivares M, Xaus Jordi (2015). Safety of Probiotic Bacteria in *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion*, First editions. Elsevier Inc..
- Abo El-Nor S. A. H, Khattab M. S. A. (2012). Enrichment of milk with conjugated linoleic acid by supplementing diets with fish and sunflower oil. *Pakistan Journal Biological Science*, 15:690–693 . <https://doi.org/10.3923/pjbs.2012.690.693>.
- AbuGhazaleh A. A., Felton D. O., Ibrahim S. A. (2007). Milk conjugated linoleic acid response to fish oil and sunflower oil supplementation to dairy cows managed under two feeding systems. *Journal of Dairy Science*, 90:4763–4769. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0163>.
- Al-hindi R. R., Abd S., Ghani E. (2015). Production of Free Conjugated Linoleic Acid by Fermentation Performed Using *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium bifidum*. *Global Veteinaria*, 14:720–728 . <https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2015.14.05.94272>.
- Albers R., van der Wielen R. P. J., Brink E. J., Hendriks H. F. J., Dorovska-Taran V. N., Mohede I. C. M. (2003). Effects of cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA) isomers on immune function in healthy men. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57:595–603 . <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601585>.
- Alonso L., Cuesta E. P., Gilliland S. E. (2003). Production of free conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human intestinal origin. *Journal of Dairy Science*, 86:1941–6 . [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73781-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73781-3).
- Andrade J. C., Ascensão K., Gullón P., Henriques S. M. S., Pinto J. M. S., Rocha-Santos T. A. P., Freitas A. C., Gomes A. M. (2012). Production of conjugated linoleic acid by food-grade bacteria: A review. *International Journal of Dairy Technology*, 65:467–481 . <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2012.00871.x>.
- Asha, Gayathri D. (2012). Antagonistic potential of *Lactobacillus* spp against enteropathogenic bacteria; purification and characterization of their bacteriocins. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 4:265–269.
- Atlas R., (2010). Handbook of Microbiological Media, Fourth Edition.
- Baars T., Wohlers J., Rohrer C., Lorkowski S., Jahreis G. (2019). Patterns of Biodynamic Milk Fatty Acid Composition Explained by A Climate-Geographical Approach. *Animals* 9:111 . <https://doi.org/10.3390/ani9030111>.
- Badis A., Guetarni D., Moussa-Boudjemâa B., Henni D. E., Tornadijo M. E., Kihal M. (2004). Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiology*, 21:343–349 . [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00072-8](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00072-8).
- Banni S., Carta G., Angioni E., Murru E., Scanu P., Melis M. P., Bauman D. E., Fischer S. M., Ip C. (2001). Distribution of conjugated linoleic acid and metabolites in different lipid fractions in the rat liver. *Journal of Lipid Research*, 42:1056–1061.
- Banni S., Petroni A., Blasevich M., Carta G., Angioni E., Murru E., Day W. B., Melis M. P., Spada S., Ip C. (2004). Detection of conjugated C16 PUFAS in rat tissues as possible partial beta-oxidation products of naturally occurring conjugated linoleic acid and its metabolites. *Biochimica Biophysica Acta*, 1682:120–127.

- Barrett E., Ross R. P., Fitzgerald G. F., Stanton C. (2007). Rapid screening method for analyzing the conjugated linoleic acid production capabilities of bacterial cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:2333–2337 . <https://doi.org/10.1128/AEM.01855-06>.
- Bauman D. E., Baumgard L. H., Corl B., Griinari J. M. (1999). Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *Proceedings of the American Society of Animal Science*, 77:1-ae-15 . [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(05\)50006-8](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(05)50006-8).
- Belury M. A. (2002). Dietary conjugated linoleic acid in health: Physiological effects and mechanisms of action. *Annual Review of Nutrition*, 22:505–531 . <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.021302.121842>.
- Beukers A. G., Zaheer R., Goji N., Amoako K. K., Chaves A. V., Ward M. P., McAllister T. A. (2017). Comparative genomics of *Enterococcus* spp. isolated from bovine feces. *BMC Microbiology*, 17:1–18 . <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0962-1>.
- Blandino A., Al-Aseeri M. E., Pandiella S. S., Cantero D., Webb C. (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International*, 36:527–543 . [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00009-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00009-7).
- Balıkçılık Ve Su Ürünleri Genel Müdürlüğü, BSÜGM. (2018). Su ürünleri istatistikleri, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. 21.
- Chajès V., Lavillonnière F., Maillard V., Giraudeau B., Jourdan M. L., Sébédio J. L., Bougnoux P. (2003). Conjugated linoleic acid content in breast adipose tissue of breast cancer patients and the risk of metastasis, *Nutrition Cancer*, 45:17–23 . https://doi.org/10.1207/S15327914NC4501_2.
- Chin S. F., Liu W., Storkson J. M., Ha Y. L., Pariza M. W. (1992). Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *Journal of Food Composition Analysis*, 5:185–197 . [https://doi.org/10.1016/0889-1575\(92\)90037-K](https://doi.org/10.1016/0889-1575(92)90037-K).
- Chun J. (1995). Computer assisted classification and identification of actinomycetes. PhD thesis, University of Newcastle upon Tyne.
- Collomb M., Bütikofer U., Sieber R., Jeangros B., Bosset J. O. (2002). Composition of fatty acids in cow's milk fat produced in the lowlands, mountains and highlands of Switzerland using high-resolution gas chromatography. *International Dairy Journal*, 12:649–659 . [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00061-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00061-4).
- Cook ME, Miller CC, Park Y, Pariza M (1993) Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression. *Poultry Science*, 72:1301–1305 . <https://doi.org/10.3382/ps.0721301>.
- Cruz-Hernandez C., Kramer J. K. G., Kraft J., Santercole V., Or-Rashid M., Deng Z., Dugan M. E., Delmonte P., Yurawecz M. P. (2006). Advances in Conjugated Linoleic Acid Research Volume 3.
- Daglioglu O. (2000). Tarhana as a traditional Turkish fermented cereal food. Its recipe, production and composition. *Nahrung* 44:85–88 . [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3803\(20000301\)44:2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3803(20000301)44:2).
- Dahiya D. K., Puniya A. K. (2017). Isolation, molecular characterization and screening of indigenous lactobacilli for their abilities to produce bioactive conjugated linoleic acid (CLA). *Journal of Food Science and Technology*, 54:792–801 . <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2523-x>.
- Dahiya D. K., Puniya A. K. (2018). Optimisation of fermentation variables for conjugated linoleic acid bioconversion by *Lactobacillus fermentum* DDHI27 in modified skim

- milk. *International Journal of Dairy Technology*, 71:46–55 .
<https://doi.org/10.1111/1471-0307.12375>.
- De Vuyst L., Schrijvers V., Paramithiotis S., Hoste B., Vancanneyt M., Swings J., Kalantzopoulos G., Tsakalidou E., Messens W. (2002). The Biodiversity of Lactic Acid Bacteria in Greek Traditional Wheat Sourdoughs Is Reflected in Both Composition and Metabolite Formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:6059–6069. .
<https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6059>.
- De Vuyst L., Vancanneyt M. (2007). Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 24:120–127 . <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.005>.
- Delmonte P., Roach J. A. G., Mossoba M. M., Losi G., Yurawecz M. P. (2004). Synthesis, isolation, and GC analysis of all the 6,8-to 13,15- cis/trans conjugated linoleic acid isomers. *Lipids* 39:185–191 . <https://doi.org/10.1007/s11745-004-1218-2>.
- Demir A. S., Talpur F. N. (2010.) Chemoenzymatic conversion of linoleic acid into conjugated linoleic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58:1646–1652 .
<https://doi.org/10.1021/jf903521b>.
- den Hartigh LJ (2018) Conjugated linoleic acid effects on cancer, obesity, and atherosclerosis: A review of pre-clinical and human trials with current perspectives. *Nutrients* 11:1–29 .
<https://doi.org/10.3390/nu11020370>.
- Derakhshande-Rishehri S. M., Mansourian M., Kelishadi R., Heidari-Beni M. (2015). Association of foods enriched in conjugated linoleic acid (CLA) and CLA supplements with lipid profile in human studies: A systematic review and meta-analysis. *Public Health Nutrition*, 18:2041–2054 . <https://doi.org/10.1017/S1368980014002262>.
- Dhar Dubey K. K., Sharma G., Kumar A. (2019). Conjugated Linolenic Acids: Implication in Cancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67:6091–6101 .
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01379>.
- Dilzer A., Park Y. (2012). Implication of Conjugated Linoleic Acid (CLA) in Human Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52:488–513 .
<https://doi.org/10.1080/10408398.2010.501409>.
- Domingos-Lopes M. F. P., Stanton C., Ross P. R., Dapkevicius M. L. E., Silva C. C. G. (2016). Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food Microbiology*, 63:178–190 .
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.014>.
- Duchemin S., Bovenhuis H., Stoop W. M., Bouwman A. C., van Arendonk J. A. M., Visker M. H. P. W (2013). Genetic correlation between composition of bovine milk fat in winter and summer, and DGAT1 and SCD1 by season interactions. *Journal of Dairy Science*, 96:592–604 . <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5454>.
- European Food Safety Authority, EFSA (2015).Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to an equimolar mixture of the CLA isomers c9,t11 and t10,c12 (marketed as Clarinol® and Tonalin®) and “contributes to a reduction in body fat mass” pursuant to Article 13(5) of Regulation. EFSA J 13: .
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3953>.
- Einerhand A.W.C, Kos W.T, Distel B, Tabak H.F (1993) Characterization of a transcriptional control element involved in proliferation of peroxisomes in yeast in response to oleate. *European Journal of Biochemistry*, 214:323–331 . <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17927.x>.
- Erbaş M., Kemal Uslu M., Ozgun Erbaş M., Certel M. (2006). Effects of fermentation and storage on the organic and fatty acid contents of tarhana, a Turkish fermented cereal

- food. *Journal of Food Composition Analysis*, 19:294–301 .
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.12.002>.
- Eulitz K, Yurawecz M. P., Sehat N., Fritsche J., Roach J. A. G., Mossoba M. M., Kramer J. K. G., Adlof R. O., Ku Y. (1999). Preparation, separation, and confirmation of the eight geometrical cis/trans conjugated linoleic acid isomers 8, 10- through 11, 13-18:2. *Lipids* 34:873–877 . <https://doi.org/10.1007/s11745-999-0435-z>
- Food and Agricultural Organisation, FAO (2019). Food Security and Nutrition in the World.
- Filipits M., Simon M. M., Rapatz W., Hamilton B., Ruis H. (1993). A *Saccharomyces cerevisiae* upstream activating sequence mediates induction of peroxisome proliferation by fatty acids. *Gene*, 132:49–55 . [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90513-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90513-3).
- Fritsche S., Fritsche J. (1998). Occurrence of conjugated linoleic acid isomers in beef. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 75:1449–1451 . <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0199-0>
- Fuller R. (1992). Probiotics: The scientific basis.
- Gorissen L., Leroy F., De Vuyst L., De Smet S., Raes K. (2015). Bacterial Production of Conjugated Linoleic and Linolenic Acid in Foods: A Technological Challenge. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55:1561–1574 .
<https://doi.org/10.1080/10408398.2012.706243>.
- Gorissen L., Raes K., De Smet S., De Vuyst L., Leroy F. (2012). Microbial production of conjugated linoleic and linolenic acids in fermented foods: Technological bottlenecks. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114:486–491 .
<https://doi.org/10.1002/ejlt.201100239>.
- Gorissen L., Raes K., Weckx S., Dannenberger D., Leroy F., De Vuyst L., De Smet S. (2010). Production of conjugated linoleic acid and conjugated linolenic acid isomers by *Bifidobacterium* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87:2257–2266 .
<https://doi.org/10.1007/s00253-010-2713-1>.
- Gorissen L., Weckx S., Vlaeminck B., Raes K., De Vuyst L., de Smet S., Leroy F. (2011). Linoleate isomerase activity occurs in lactic acid bacteria strains and is affected by pH and temperature. *Journal of Applied Microbiology*, 111:593–606 .
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05087.x>.
- Gursoy O., Kinik O. (2010). Incorporation of adjunct cultures of *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* and *Bifidobacterium bifidum* into white cheese. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 8:107–112.
- Gurvitz A., Hamilton B., Ruis H., Hartig A., Hiltunen J. K. (2001). Degradation of conjugated linoleic acid isomers in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1533:81–85 .
[https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(01\)00148-2](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(01)00148-2).
- Ha Y.L., Grimm N. K., Pariza M. W. (1987). Anticarcinogens from fried ground beef: Heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*, 8:1881–1887 .
<https://doi.org/10.1093/carcin/8.12.1881>.
- Ham J. S., In Y. M., Jeong S. G., Kim J. G., Lee E. H., Kim H. S., Yoon S. K., Lee B. H. (2002). Screening of conjugated linoleic acid producing lactic acid bacteria from fecal samples of healthy babies. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 15:1031–1035 .
<https://doi.org/10.5713/ajas.2002.1031>.
- Hanchi H., Mottawea W., Sebei K., Hammami R. (2018). The genus *Enterococcus*: Between probiotic potential and safety concerns-an update. *Frontiers in Microbiology*, 9:1–16 .
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01791>.

- Hawkes C., Ruel M. T., Salm L., Sinclair B., Branca F. (2020). Double-duty actions: seizing programme and policy opportunities to address malnutrition in all its forms. *Lancet* 395:142–155.
- Hayaloglu A. A., Guven M., Fox P. F. (2002). Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish White cheese “Beyaz Peynir.” *International Dairy Journal*, 12:635–648 . [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00055-9](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00055-9).
- Herzallah S. (2013). Enrichment of conjugated linoleic acid (CLA) in hen eggs and broiler chickens meat by lactic acid bacteria. *British Poultry Science*, 54:747–752 . <https://doi.org/10.1080/00071668.2013.836734>.
- Herzallah S.M., Humeid M. A., Al-Ismaïl K. M. (2005). Effect of Heating and Processing Methods of Milk and Dairy Products on Conjugated Linoleic Acid and Trans Fatty Acid Isomer Content. *Journal of Dairy Science*, 88:1301–1310 . [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(05\)72796-x](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(05)72796-x).
- Hiltunen J. K., Qin Y. M. (2000). β -Oxidation - Strategies for the metabolism of a wide variety of acyl-CoA esters. *Biochimica Biophysica Acta - Molecular Cellular Biology Lipids*, 1484:117–128 . [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00013-5](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00013-5).
- Hosseini E. S., Kermanshahi R.K., Hosseinkhani S., Shojaosadati S. A., Nazari M. (2015). Conjugated linoleic acid production from various substrates by probiotic *Lactobacillus plantarum*. *Annal of Microbiology*, 65:27–32 . <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0832-0>.
- Houseknecht K. L., Vanden Heuvel J. P., Moya-Camarena S. Y., Portocarrero C. P., Peck L. W., Nickel K. P., Belury M. A. (1998). Erratum: Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat (*Biochemical and Biophysical Research Communications* (1998) 244, 3 (678-682)). *Biochem Biophys Res Commun* 247:911 . <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8840>.
- Ibanoglu S., Ainsworth P., Wilson G., Hayes G. D. (1995). The effect of fermentation conditions on the nutrients and acceptability of tarhana. *Food Chemistry*, 53:143–147 . [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)90779-7](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)90779-7).
- International Food Policy Research Institute, IFPRI (2016). From Ending Malnutrition By 2030.
- Ip C., Singh M., Thompson H. J., Scimeca J. A. (1994). Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. *Cancer Research*, 54:1212–1215.
- Jalč D., Váradyová Z., Lauková A. (2010). Effect of inoculated corn silage enriched with sunflower oil on rumen fermentation and lipid metabolism in an artificial rumen . *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90:78–84 . <https://doi.org/10.1002/jsfa.3783>.
- Jenkins T. C., Bridges W. C., Harrison J. H., Young K. M. (2014). Addition of potassium carbonate to continuous cultures of mixed ruminal bacteria shifts volatile fatty acids and daily production of biohydrogenation intermediates. *Journal of Dairy Science*, 97:975–984 . <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7164>.
- Jiang J., Björck L., Fondén R. (1998). Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. *Journal of Applied Microbiology*, 85:95–102 . <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00481.x>.
- Jiang J., Wolk A., Vessby B. (1999). Relation between the intake of milk fat and the occurrence of conjugated linoleic acid in human adipose tissue. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70:21–27 . <https://doi.org/10.1093/ajcn/70.1.21>.

- Juanéda P., Cordier O., Grégoire S., Sébédio J. L. (2001). Conjugated linoleic acid (CLA) isomers in heat-treated vegetable oils. *OCL - Ol Corps gras Lipides* 8:94–97 . <https://doi.org/10.1051/ocl.2001.0094>.
- Kaban G., Kaya M. (2008). Identification of lactic acid bacteria and Gram-positive catalase-positive cocci isolated from naturally fermented sausage (Sucuk). *Journal of Food Science*, 73:385–388 . <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00906.x>.
- Kanmani P., Satish Kumar R., Yuvaraj N., Paari K. A., Pattukumar V., Arul V. (2013). Probiotics and Its Functionally Valuable Products—A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53:641–658 . <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.553752>.
- Kemal Seçkin A., Gursoy O., Kinik O., Akbulut N., Seçkin A. K., Gursoy O., Kinik O., Akbulut N. (2005). Conjugated linoleic acid (CLA) concentration, fatty acid composition and cholesterol content of some Turkish dairy products. *LWT - Food Science and Technology*, 38:909–915 . <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.09.011>.
- Khaskheli A. A., Talpur F. N., Demir A. S., Cebeci A., Jawaaid S. (2013). A highly selective whole cell biocatalysis method for the production of two major bioactive conjugated linoleic acid isomers, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2:328–332 . <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.06.004>.
- Khosravi A., Safari M., Khodaiyan F., Gharibzahedi S. M. T. (2015). Bioconversion enhancement of conjugated linoleic acid by *Lactobacillus plantarum* using the culture media manipulation and numerical optimization. *Journal of Food Science and Technology*, 52:5781–5789 . <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1699-6>.
- Kiliç G. B., Karahan A. G. (2010). Identification of lactic acid bacteria isolated from the fecal samples of healthy humans and patients with dyspepsia, and determination of their pH, bile, and antibiotic tolerance properties. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 18:220–229 . <https://doi.org/10.1159/000319597>.
- Kishino S., Ogawa J., Ando A., Iwashita T., Fujita T., Kawashima H., Shimizu S. (2003). Structural analysis of conjugated linoleic acid produced by *Lactobacillus plantarum*, and factors affecting isomer production. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 67:179–182 . <https://doi.org/10.1271/bbb.67.179>.
- Kishino S., Ogawa J., Ando A., Omura Y., Shimizu S. (2002a). Ricinoleic acid and castor oil as substrates for conjugated linoleic acid production by washed cells of *Lactobacillus plantarum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66:2283–2286 . <https://doi.org/10.1271/bbb.66.2283>.
- Kishino S., Ogawa J., Omura Y., Matsumura K., Shimizu S. (2002b). Conjugated linoleic acid production from linoleic acid by lactic acid bacteria. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79:159–163 . <https://doi.org/10.1007/s11746-002-0451-4>.
- Koca A. F., Yazici F., Anil M. (2002). Utilization of soy yoghurt in tarhana production. *European Food Research and Technology*, 215:293–297 . <https://doi.org/10.1007/s00217-002-0568-0>.
- Koffi-Nevry R., Ouina T. S. T., Koussemon M., Brou K. (2011). Chemical composition and lactic microflora of Adjuevan, A traditional Ivorian fermented fish condiment. *Pakistan Journal of Nutrition*, 10:332–337.
- Kozaki M., Uchimura T., Okada S. (1992). Experimental Manual of Lactic Acid Bacteria. In: *Asakurasyoten*, Tokyo, pp 29–72.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35:1547–1549 . <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.

- Ledoux M., Chardigny J., Darbois M., Soustre Y., Sébédio J-L, Laloux L. (2005). Fatty acid composition of French butters, with special emphasis on conjugated linoleic acid (CLA) isomers. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18:409–425 . <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.01.001>.
- Lee K. N., Kritchevsky D., Pariza M. W. (1994). Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 108:19–25 . [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(94\)90034-5](https://doi.org/10.1016/0021-9150(94)90034-5).
- Lin T. Y. (2000). Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and additives. *Food Chemistry*, 69:27–31 . [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00218-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00218-6).
- Lock A. L., Bauman D. E. (2004). Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids* 39 (12):1197–206.
- Martin SA, Jenkins TC (2002) Factors affecting conjugated linoleic acid and trans-C18:1 fatty acid production by mixed ruminal bacteria. *J Anim Sci* 80:3347–3352 . <https://doi.org/10.2527/2002.80123347x>.
- Mele M. C., Cannelli G., Carta G., Cordeddu L., Melis M. P., Murru E., Stanton C., Banni S. (2013). Metabolism of c9,t11-conjugated linoleic acid (CLA) in humans. *Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids*, 89:115–119.
- Melis M. P., Angioni E., Carta G., Murru E., Scanu P., Spada S., Banni S. (2001). Characterization of conjugated linoleic acid and its metabolites by RP-HPLC with diode array detector. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103:617–621. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200109\)103:9](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200109)103:9).
- Mühling M., Woolven-Allen J., Murrell J. C., Joint I. (2008). Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *The ISME Journal*, 2:379–392 . <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.97>.
- Naghmouchi K., Belguesmia Y., Bendali F., Spano G, Seal B. S., Drider D. (2019). *Lactobacillus fermentum*: a bacterial species with potential for food preservation and biomedical applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0:1–13 . <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1688250>.
- Nielsen D. S., Teniola O. D., Ban-Koffi L., Owusu M., Andersson T. S., Holzapfel W. H. (2007). The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 114:168–186 . <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.010>.
- Norris L. E., Collene A. L., Asp M. L., Hsu J. C., Liu L. F., Richardson J. R., Li D., Bell D., Osei K., Jackson R. D., Belury M. A. (2009). Comparison of dietary conjugated linoleic acid with safflower oil on body composition in obese postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90:468–476 . <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.27371>.
- Nudda A., Battacone G., Neto O. B., Cannas A., Helena A., Francesconi D., Atzori A. S., Pulina G. (2014). Invited Review Feeding strategies to design the fatty acid profile of sheep milk and cheese. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 43:445–456.
- Nudda A., Mereu A., Fancellu S., Cappio-Borlino A. (2007) Meta-analysis of nutritional effects on conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat of dairy cows. *Italian Journal of Animal Science*, 6:330–332 . <https://doi.org/10.4081/ijas.2007.1s.330>.
- O'Donnell A. M., Barbano D. M., Bauman D. E. (2011). Survey of the fatty acid composition of retail milk in the United States including regional and seasonal variations. *Journal Dairy Science*, 94:59–65 . <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3571>.

- O'Shea M., Bassaganya-Riera J., Mohede I. C. M. (2004). Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79:1199–1206 . <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.6.1199s>.
- Organisation for Economic Cooperation and Development, OECD (2017). Meat consumption (indicator). doi: 10.1787/fa290fd0 (Accessed on 02 September 2018).
- Ogawa J., Kishino S., Ando A., Sugimoto S., Mihara K., Shimizu S. (2005). Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100:355–364 . <https://doi.org/10.1263/jbb.100.355>.
- Ogawa J., Matsumura K., Kishino S., Omura Y., Shimizu S. (2001). Conjugated linoleic acid accumulation via 10-hydroxy-12 octadecaenoic acid during microaerobic transformation of linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:1246–1252 . <https://doi.org/10.1128/AEM.67.3.1246>.
- Örmeci Kart Ç. M., Demircan V. (2014). Dünyada ve Türkiye’de Süt ve Süt Ürünleri Üretimi ,Tüketimi ve Ticaretindeki Gelişmeler. *Akad Gıda* 12:78–96.
- Ozdemir S., Gocmen D., Kumral A. Y. (2007). A traditional Turkish fermented cereal food: Tarhana. *Food Reviews International*, 23:107–121 . <https://doi.org/10.1080/87559120701224923>.
- Pariza M., Park Y., Cook M. E. (2001). The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progres in Lipid Research*, 40:283–298 . [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(01\)00008-X](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(01)00008-X).
- Pariza M. W., Yang X-Y (2000). Method of producing conjugated fatty acids. 1–12
- Parodi P. W. (1999). Conjugated Linoleic Acid: The Early Years in Advances in Conjugated Linoleic Acid Research.
- Parodi P. W. (2003). Conjugated Linoleic Acid in Food. In (Eds.), *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, Vol 2 (pp.123-145). AOCS Press, Champaign, Illinois.
- Paszczyk B., Borejszo Z., Łuczyńska J. (2012). Conjugated linoleic acid (CLA) and *trans* isomers of C18 : 1 and C18 : 2 acids in mould cheeses. *Polish J Nat Sci* 27:93–101.
- Popkin B. M , Corvalan C., Grummer-Strawn L. M. (2019). Dynamics of the double burden of malnutrition and the changing nutrition reality. *Lancet* (London, England). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32497-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32497-3).
- Puniya A. K., Chaitanya S., Tyagi A. K., De S., Singh K. (2008). Conjugated linoleic acid producing potential of lactobacilli isolated from the rumen of cattle. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35:1223–1228 . <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0429-3>.
- Puniya A. K., Reddy C. S., Kumar S., Singh K. (2009). Influence of sunflower oil on conjugated linoleic acid production by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*. *Animal Microbiology*, 59:505–507 . <https://doi.org/10.1007/BF03175138>.
- Raes K., De Smet S., Demeyer D. (2004). Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 113:199–221 . <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2003.09.001>.
- Raff M., Tholstrup T., Basu S., Nonboe P., Sørensen M. T., Straarup E. M. (2008). A Diet Rich in Conjugated Linoleic Acid and Butter Increases Lipid Peroxidation but Does Not Affect Atherosclerotic, Inflammatory, or Diabetic Risk Markers in Healthy Young Men. *Journal Nutrition*, 138:509–514 . <https://doi.org/10.1093/jn/138.3.509>.
- Raigar R., Mishra H. (2015). *Nutrition and Food Technology: Open Access Physicochemical*

- , Nutritional and Functional Properties of Selected Material used for the Production of Ready-to-Eat Health Foods for Malnourished Children. *Nutrition Food Technology*, 1:1–5 . <https://doi.org/10.16966/2470-6086.109>.
- Rainio A., Vahvaselkä M., Suomalainen T., Laakso S. (2002). Production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. *Lait*, 82:91–101 . <https://doi.org/10.1051/lait:2001008>.
- Reaney M. J. T. (2002). Method for commercial preparation of conjugated linoleic acid using recycled alkali transesterification catalyst. US Patent No. 6409649 B1.
- Reiner Ž., Tedeschi-Reiner E. (2013). Prevalence and types of persistent dyslipidemia in patients treated with statins. *Croatian Medical Journal*, 54:339–345 . <https://doi.org/10.3325/cmj.2013.54.339>.
- Reiser R. (1951). Hydrogenation of polyunsaturated fatty acids by the ruminant. *Fed Proceedings Fed Am Soc Exp Biol* 10:236.
- Rosberg-Cody E., Stanton C., O'Mahony L., Wall R., Shanahan F., Quigley E. M., Fitzgerald GF, Ross R. P. (2011). Recombinant lactobacilli expressing linoleic acid isomerase can modulate the fatty acid composition of host adipose tissue in mice. *Microbiology*, 157:609–615 . <https://doi.org/10.1099/mic.0.043406-0>.
- Rule D. C., Broughton K. S., Shellito S. M., Maiorano G. (2002). Comparison of muscle fatty acid profiles and cholesterol concentrations of bison, beef cattle, elk, and chicken. *Journal of Animal Science*, 80:1202–1211 . <https://doi.org/10.2527/2002.8051202x>.
- Ryder J. W., Portocarrero C. P., Song X. M., Cui L., Yu M., Combatsiaris T., Galuska D., Bauman D. E., Barbano D. M., Charron M. J., Zierath J. R., Houseknecht K. L. (2001). Isomer-Specific Antidiabetic Properties of Conjugated Linoleic Acid. *Diabetes* 50:1149–1157.
- Schmid A., Collomb M., Sieber R., Bee G. (2006). Conjugated linoleic acid in meat and meat products: A review. *Meat Sciences*, 73:29–41 . <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.10.010>.
- Schoonees A., Lombard M., Musekiwa A., Nel E., Volmink J. (2013). Ready-to-use therapeutic food for home-based treatment of severe acute malnutrition in children from six months to five years of age: Review Summary Of Findings For The Main Comparison. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009000.pub2>. www.cochranelibrary.com
- Sels B., Philippaerts A. (2014) Conjugated Linoleic Acids and Conjugated Vegetable Oils. Royal Society of Chemistry.
- Shinn S. E., Ruan C. M., Proctor A. (2017). Strategies for Producing and Incorporating Conjugated Linoleic Acid-Rich Oils in Foods. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8:181–204 . <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030216-025703>.
- Shorland F. B., Weenink R. O., Johns A. T. (1955). Effect of the rumen on dietary fat. *Nature* 175:1129–1130 . <https://doi.org/10.1038/1751129a0>.
- Sieber R., Collomb M., Aeschlimann A., Jelen P., Eyer H. (2004). Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products - A review. *International Dairy Journal*, 14:1–15 . [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00151-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00151-1).
- Siurana A., Calsamiglia S. (2016). A metaanalysis of feeding strategies to increase the content of conjugated linoleic acid (CLA) in dairy cattle milk and the impact on daily human consumption. *Animal Feed Science and Technology*, 217:13–26 . <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.04.013>.

- Sosa-Castañeda J., Hernández-Mendoza A., Astiazarán-García H., García H. S., Estrada-Montoya M. C., González-Córdova A. F., Vallejo-Cordoba B. (2015). Screening of *Lactobacillus* strains for their ability to produce conjugated linoleic acid in milk and to adhere to the intestinal tract. *Journal of Dairy Science*, 98:6651–6659 . <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8515>.
- Stoop W. M., Bovenhuis H., Heck J. M. L., van Arendonk J. A. M. (2009). Effect of lactation stage and energy status on milk fat composition of Holstein-Friesian cows. *Journal Dairy Science*, 92:1469–1478 . <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1468>.
- Suteebut N., Chanthachum S., Intarapichet K., Cadwallader K. R., Miller M. (2016). Factors affecting conjugated linoleic acid production by *Lactobacillus plantarum* GSI 303. *International Food Research Journal*, 23:1739–1746.
- Tarakçı Z., Dogan I. S., Koca A. F. (2004). A traditional fermented Turkish soup, tarhana, formulated with corn flour and whey. *Institute of Food Science and Technology*, 39:455–458 . <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.00803.x>.
- Türkiye Diyabet Vakfı, TDV. (2000). Diyabet Hakkında Herşey - Diyabet Nedir. URL: <https://www.turkdiab.org/diyabet-hakkinda-hersey.asp?lang=TR&id=46>. Accessed on 12 Nisan 2020.
- Terán V., Pizarro P. L., Zacarías M. F., Vinderola G., Medina R., Van Nieuwenhove C. P. (2015). Production of conjugated dienoic and trienoic fatty acids by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Functional Foods*, 19:417–425 . <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.046>.
- Ting Y. S., Saad W. Z., Chin S. C., Wan H. Y. (2016). Characterization of conjugated linoleic acid-producing lactic acid bacteria as potential probiotic for chicken Yong. *The Malaysian Journal of Microbiology*, 12:15–23.
- Tormo H., Ali Haimoud Lekhal D., Roques C. (2015). Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk and effect of farming practices on the dominant species of lactic acid bacteria. *International Journal of Dairy Technology*, 210:9–15 . <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.002>.
- Trigueros L., Barber X., Sendra E. (2015). Conjugated linoleic acid content in fermented goat milk as affected by the starter culture and the presence of free linoleic acid. *International Journal of Dairy Technology*, 68:198–206 . <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12177>.
- Troegeler-Meynadier A., Nicot M. C., Bayourthe C., Moncoulon R., Enjalbert F. (2003). Effects of pH and Concentrations of Linoleic and Linolenic Acids on Extent and Intermediates of Ruminal Biohydrogenation in Vitro. *Journal Dairy Science*, 86:4054–4063 . [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)74017-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)74017-X).
- Turkish Standards Institution, TSI. (2004). Official methods of analysis.
- Tyagi A. K., Choudhury P. K., Tyagi B., Tyagi N. (2020). Conjugated linoleic acid producing potential of lactobacilli isolated from goat (AXB) rumen fluid samples. *Asian-Australasian Journal Animal Science*, 1–9.
- Ulusal Süt Konseyi, USK. (2016) Süt Raporu Dünya ve Türkiye’de Süt Sektör İstatistikleri. 1–37.
- Vahvaselkä M., Lehtinen P., Laakso S. (2006). Microbially safe utilization of non-inactivated oats (*Avena sativa* L.) for production of conjugated linoleic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:963–967 . <https://doi.org/10.1021/jf052161y>.
- Vahvaselkä M., Lehtinen P., Sippola S., Laakso S. (2004). Enrichment of Conjugated Linoleic Acid in Oats (*Avena sativa* L.) by Microbial Isomerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:1749–1752 . <https://doi.org/10.1021/jf034996j>.

- Van Nieuwenhove C. P., Oliszewski R., González S. N., Pérez Chaia A. B. (2007). Influence of bacteria used as adjunct culture and sunflower oil addition on conjugated linoleic acid content in buffalo cheese. *Food Research International*, 40:559–564 . <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.08.003>.
- Van Nieuwenhove C. P., Terán V., González S. N. (2012). Conjugated Linoleic and Linolenic Acid Production by Bacteria : Development of Functional Foods. *INTECH*, Sao Paulo State University.
- Voorrips L. E., Brants H. A. M., Kardinaal A. F. M., Hiddink G. J., Van Den Brandt P. A., Alexandra Goldbohm R. (2002). Intake of conjugated linoleic acid, fat, and other fatty acids in relation to postmenopausal breast cancer: The Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76:873–882 . <https://doi.org/10.1093/ajcn/76.4.873>.
- Wayah S. B., Philip K. (2018). Characterization, yield optimization, scale up and biopreservative potential of fermencin SA715, a novel bacteriocin from *Lactobacillus fermentum* GA715 of goat milk origin. *Microbial Cell Factories*, 17:1–18 . <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0972-1>.
- World Food Programme, WFP. (2009). Food Security Assessment Handbook - Second Edition Emergency, 2009. 296.
- Xu H., Lee H. Y., Hwang B., Nam J. H., Kang H. Y., Ahn J. (2008). Kinetics of microbial hydrogenation of free linoleic acid to conjugated linoleic acids. *Journal of Applied Microbiology*, 105:2239–2247 . <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03937.x>.
- Xu S., Boylston T. D., Glatz B. A. (2004). Effect of lipid source on probiotic bacteria and conjugated linoleic acid formation in milk model systems. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists Society*, 81:589–595 . <https://doi.org/10.1007/s11746-006-0946-z>.
- Yang B., Gao H., Stanton C., Paul Ross R., Zhang H., Chen Y. Q., Chen H., Chen W. (2017). Bacterial conjugated linoleic acid production and their applications. *Progres in Lipid Research*, 68:26–36 . <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.09.002>.
- Yoon S.H., Ha S.M., Kwon S., Lim J., Kim Y., Seo H., Chun J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67:1613–1617 . <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>.
- Zamfir M., Vancanneyt M., Makras L., Vaningelgem F., Lefebvre K., Pot B., Swings J., De Vuyst L. (2006). Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Systematic and Applied Microbiology*, 29:487–495. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.10.002>.
- Zhang F., Jiang M., Wan C., Chen X., Tao X., Shah N. P., Wei H. (2016). Screening probiotic strains for safety: Evaluation of virulence and antimicrobial susceptibility of enterococci from healthy Chinese infants. *Journal of Dairy Science*, 99:4282–90 . <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10690>.
- Zongo K., Krishnamoorthy S., Moses J. A., Yazici F., Çon A. H., Anandharamakrishnan C. (2021). Total conjugated linoleic acid content of ruminant milk: The world status insights. *Food Chemistry*, 334:1–21 . <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127555>.

7. EKLER

ÖZ GEÇMİŞ

Koka ZONGO Daloa Modern ve Klasik II Lisesi'ni bitirdikten sonra Félix Houphouët BOIGNY Üniversitesi Biyobilimleri fakültesinde 2010 yılında Biyokimya Lisans ve 2014 yılında Gıda Biyoteknoloji Yüksek Lisans mezun oldu. 2010-2015 yıllarında biyoloji ve jeoloji bilimleri lise öğrencilerine öğretti. 2016 yılından beri Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Doktora 'ya girdi. Mezuniyetinden ve yana olarak öğretmen görev yapmış olan **Koka ZONGO** iyi derecede İngilizce, Fransızca ve Türkçe bilmektedir (04.04.2021).

İletişim Bilgileri

Öğrenci No : 15210386

ORCID ID : <https://orcid.org/0000-0003-1872-9847>

Yayınlanmış Çalışmalar:

1. **Koka Zongo**, Srinivasan Krishnamoorthy, Jeyan A. Moses, Fehmi Yazici, Ahmet Hilmi Çon, C. Anandharamakrishnan. Total conjugated linoleic acid content of ruminant milk: The world status insights. Food Chemistry 334 (2021): 1–6
2. Srinivasan Krishnamoorthy, **Koka Zongo**, Elna M Buys, Jeyan A. Moses, C. Anandharamakrishnan. Emerging microbiome, pathobiome, and resistome trends in food safety and nutrition: Future perspectives. Virtual National Conference on Food Microbiology from 5th-6th October 2020, organized by the Indian Institute of Food Processing Technology (IIFPT).

Kazanılan Ödüller, Teşvikler ve Burslar

1. April 2019: Grant NPYO.MUH.1904.19.006 for Ph.D. research; Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Türkiye Cumhuriyeti.
2. 2017: CV Raman International Fellowship for African Researchers 2016; Hindistan Cumhuriyeti.
3. 2015: Türkiye Bursları, Türkiye Cumhuriyeti