



FARKLI KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLMİŞ LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİ VE KOLESTEROL ASİMİLASYON YETENEKLERİNİN BELİRLENMESİ

Duygu Alp,* Hakan Kuleaşan

¹Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta, Türkiye

Geliş / *Received*: 04.06.2018; Kabul / *Accepted*: 09.02.2019; Online baskı / *Published online*: 26.02.2019

Alp, D., Kuleaşan, H. (2019). Farklı kaynaklardan izole edilmiş laktik asit bakterilerinin ekzopolisakkarit üretimi ve kolesterol asimilasyon yeteneklerinin belirlenmesi. *GIDA* (2019) 44 (2): 191-201 doi: 10.15237/gida.GD18059

Alp, D., Kuleaşan, H. (2019). Determination of exopolysaccharide production and cholesterol assimilation abilities of lactic acid bacteria isolated from different sources. GIDA (2019) 44 (2): 191-201 doi: 10.15237/gida.GD18059

ÖZ

Bağırsak sistemimizde yer alan yararlı mikroorganizmaların önemli özelliklerinden birisi gastrointestinal sistemdeki farklı koşullara karşı direnç gösterebilmeleridir. Bu koşullar arasında safra tuzlarına karşı direnç ve düşük pH'da gelişim yer almaktadır. Gastrointestinal sistemde canlılıklarını sürdürebilmek için yararlı bakteriler spesifik enzim sentezi veya ekzopolisakkarit üretimi gibi çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bu çalışmada çeşitli fermente gıdalardan ve bitkilerden izole edilmiş laktik asit bakterilerinin safra tuzu dirençleri, düşük pH'da gelişim özelliklerinin yanı sıra, ekzopolisakkarit üretimleri ve kolesterol asimilasyon yetenekleri belirlenmiştir. Ekzopolisakkarit (EPS) üretimlerinin 11.9 ile 1.1 mg/L arasında değiştiği belirlenirken toplam kolesterol asimilasyon yüzdeleri % 60.71 ile % 16.71 arasında değişim göstermiştir. Kolesterol asimilasyon yetenekleri ile EPS üretimleri arasında bir bağlantı bulunamamıştır.

Anahtar kelimeler: Kolesterol asimilasyonu, ekzopolisakkarit, düşük pH, safra tuzu direnci

DETERMINATION OF EXCOPOLISACCHARIDE PRODUCTION AND CHOLESTEROL ASSIMILATION ABILITIES OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM DIFFERENT SOURCES

ABSTRACT

One of the most important features of the intestinal flora is resistance to many conditions in the gastrointestinal tract. These include resistance to bile salt and growth at low pH. Bacteria have developed various defense mechanisms, such as specific enzymes, exopolysaccharide production, against Gastrointestinal system, In our study, strains of lactic acid bacteria isolated from various fermented foods and plants and all the strains were determined of their bile salt and low pH resistance. The strains were also tested for their exopolysaccharide production and total cholesterol assimilation properties. EPS production was observed at rations between 11.9 to 1.1 mg/L, and total cholesterol assimilation percentages ranged from 60.71 to 16.71. There was no relevance between cholesterol assimilation ability and their EPS production.

Keywords: Cholesterol assimilation, exopolysaccharide, low pH, bile salt resistance.

* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*

✉ duygualp1@gmail.com

☎ (+90) 543 587 6811

☎ (+90) 246 211 1542

GİRİŞ

Kan dolaşımındaki yüksek kolesterol miktarı insanlarda kalp-damar sistemi hastalıkları için risk faktörü oluşturmaktadır. Kalp-damar sistemi hastalıkları, kanda aşırı kolesterol bulunması ile yakın ilişkili olan ve gelişmiş ülkelerdeki ölüm sebepleri içerisinde en yüksek orana sahip olanlardan birisidir (Ahn vd., 2003; Xie vd., 2011; Ahire vd., 2012; Castorena-Alba vd., 2017). Dünya sağlık örgütü (WHO), 2030 yılına kadar kardiyovasküler hastalıkların dünyada yaklaşık 23.6 milyon insanı etkileyen önemli bir ölüm nedeni olacağını öngörmektedir (Ahire vd., 2012; Alp ve Ertürkmen, 2017). Yüksek seviyede toplam kolesterol ve özellikle kabul edilir sınırların üzerinde olan düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterol, hiperkolesterolemiye neden olmaktadır (Burhan vd., 2017). Vücudumuzda kolesterol sentez hızı ile kolesterol atılım hızı farklı olabilmektedir. Bu nedenle dengenin sağlanabilmesi için bazı düzenleyici mekanizmalar mevcuttur. Kolesterol vücudumuzdan iki şekilde atılmaktadır. İlk yol feçesle atılan safra asitlerine dönüştürülmesi şeklinde olup, ikinci yol ise safra içine salgılanarak atılabilmesi için bağırsaklara ulaştırılması şeklindedir (Ulukaya, 1997). Bu iki yoldan ikincisi olan yani, safra içerisine salgılanması şeklinde gerçekleşen yol kolesterolün, vücuttan atılması için izlenen en önemli yoldur. Serbest kolesterol, sulu çözeltilerde neredeyse hiç çözünmez, fakat safrada, safra asitleri ve lesitin gibi lipitler vasıtasıyla çözünebilir hale gelir (Tok, 2007). Safra asitleri çok basamaklı bir metabolik yol izleyerek karaciğer tarafından sentezlenirler. Oluşan bileşikler “primer” safra asitleri olarak adlandırılan kolik asit ve kenodeoksikolik asittir. *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides* ve *Lactobacillus* gibi bağırsak bakterileri glisin ve taurin aminoasitlerini safra tuzlarından, safra tuzu hidrolaz (BSH) enzimini kullanarak ayrırabilmektedirler. Bu olaya “dekonjugasyon” adı verilir (Ulukaya, 1997). Safra asitlerinin deterjan etkisi, konjuge safra tuzlarına kıyasla daha azdır. Bu nedenle dekonjuge olmuş (serbest) safra asitleri, kolesterolün emiliminde, konjuge safra tuzları kadar etkili değildirler. Bu sebepten dolayı safra tuzu dekonjugasyonunun, kolesterolün çözünürlüğünü azalttığı, dolayısıyla bağırsaklardan

emilimini ve ayrıca enterohepatik döngüyle karaciğere dönen safra asidi miktarını azalttığı bundan dolayı da, karaciğerdeki safra asidi üretimini arttırdığı düşünülmektedir (Hofmann vd., 1983; Gilliland vd., 1985; Ulukaya 1997; Ahn vd., 2003; Tok, 2007; Tok ve Aslım 2010; Anila vd., 2016). Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) probiyotik özellik gösterebilmesi için ağız yoluyla alındığında mide asitliği ve safraya karşı tolerans, safra tuzu hidrolaz aktivitesi, bağışıklık sistemi modülasyonu, patojenler ile rekabet gibi özelliklere sahip olması gerekmektedir (Ünal ve Erginkaya, 2010; Öztürk ve Tiryaki Gündüz, 2018). Ayrıca bazı probiyotik suşların kandaki yüksek kolesterol seviyesini düşürebilme yeteneklerinden dolayı son yıllarda bu amaçla kullanımları gündeme gelmiştir (Pinto vd., 2006; Tok, 2007; Moal ve Servin, 2014; Iranmanesh vd., 2014; Özden Tuncer ve Tuncer, 2014; Arief vd., 2015; Chang-Qing ve Rong 2015; Syah vd., 2017; Burhan vd., 2017). Çalışmalar, plazma kolesterolü ve düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterolü düşürmek için bazı kültürleri içeren süt ürünlerinin tüketiminin faydalı olabileceğini göstermiştir. İnsan, fare, domuz ve sığanlarda yapılan çalışmalar sonucu LAB'nin serum kolesterolünü azaltmada önemli bir etki gösterebileceği görülmüştür. Özellikle *Lactobacillus* cinsine ait bazı türlerin potansiyel hipokolesterolemik aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle probiyotik içeren süt ürünlerinin tüketimi, serum kolesterolü düşürmek için tavsiye edilmektedir (Wang vd., 2014). Probiyotiklerin hangi mekanizma ile serum kolesterol düzeylerini düşürdüğü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Düşünülen olası mekanizmalar arasında kolesterolün bakteri hücresi tarafından asimilasyonu, bakteriyel asit hidrolazlar ile safra asitlerinin dekonjugasyonu, kolesterolün bakteri duvarına bağlanması, hepatik kolesterol sentezinin inhibisyonu veya kolesterolün plazmadan karaciğere doğru yön değiştirmesi vardır (Noh vd., 1997; Kopp-Hoolihan vd., 2001; Kaur vd., 2002; Gill ve Guarner, 2004; Coşkun, 2006; Belviso vd., 2009;).

MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmada çeşitli fermente gıdalardan ve bitkilerden izole edilerek 16S rRNA dizi analizi ile

tür düzeyinde tanımlamaları yapılmış (GEN Plaza Biyoteknoloji Merkezi, Ankara) 15 adet laktik asit bakterisi kullanılmıştır (Alp, 2018).

İzolatların Safra Tuzu, Düşük pH Dayanımları

Denemeler MRS (DeMan-Rogosa-Sharpe, Merck, Almanya) sıvı besiyerinde 30°C'de 18 saat geliştirilen bakteri kültürleri kullanılarak yapılmıştır. Gelişmenin ardından kültürler safra tuzuna karşı direnç özelliğinin belirlenmesi amacıyla % 1 oranında safra tuzu içeren Fosfat Tamponu Çözeltisi (PBS) içerisine % 1 oranında

$$\text{Canlılık (\%)} = \frac{\text{Canlı kalan hücre sayısı (kob/mL)}}{\text{Başlangıçta inoküle edilen hücre sayısı (kob/mL)}} \times 100 \quad (1)$$

Kültürlerin düşük pH koşullarına dayanımlarının belirlenmesi amacıyla kullanılan pH derecesi ve inkübasyon süresi, besinler insan sindirim sisteminden geçerken midede kalma süresi baz alınarak belirlenmiştir. Besinlerin genel olarak midede kalma süresi 3 saat olup bu süre içerisinde midenin pH'sı 1 ile 4 arasında değişmektedir (Vinderola vd., 2000). Bu amaçla kültürler, MRS sıvı besiyerinde 30°C'de 18 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra PBS tamponun pH'sı 3.0 olacak şekilde ayarlanmıştır. pH'sı ayarlanan PBS tampona aktif kültürlerden % 1 oranında aşularak, 37°C'de 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun başlangıç, 1. ve 3. saatlerinde örneklerden alınan numunelerin sayımları seri dilüsyon sonrası damla kültür yöntemi ile MRS katı besiyerlerine 3 paralel olacak şekilde yapılmıştır. 37°C'de 48 saat yapılan inkübasyonun ardından kontrol ve deneme gruplarındaki koloniler sayılarak değerler eşitlik (1)'e göre hesaplanmıştır (Eryılmaz, 2011; Horáčková vd., 2011; Sahadeva vd., 2011; Jamaly vd., 2011; Soliman vd., 2015).

İzolatların Ekzopolisakkarit Üretimleri

İzolatların farklı karbonhidrat kaynaklarını kullanarak ekzopolisakkarit üretimlerinin belirlenmesi amacıyla MRS besiyeri modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla hem standart MRS besiyeri, hem de bileşiminde yer alan glukoz yerine fruktoz, laktöz ve sükroz % 2 olacak şekilde kullanılmıştır. Çalışma öncesinde EPS üreticisi olabilecek suşların belirlenmesi için kültürler önce

ilave edilmiştir. 37°C'de yapılan inkübasyonun başlangıç, 4. ve 24. saatlerinde örneklerden alınan numunelerin sayımları seri dilüsyonlar sonrası damla kültür yöntemi ile MRS katı besiyerlerine 3 paralel olacak şekilde yapılmıştır. 37°C'de 48 saat yapılan inkübasyonun ardından kontrol ve deneme gruplarındaki koloniler sayılarak değerler eşitlik (1)'e göre hesaplanmıştır (Eryılmaz, 2011; Horáčková vd., 2011; Sahadeva vd., 2011; Jamaly vd., 2011; Xiao vd., 2014; Tokathı vd., 2015; Soliman vd., 2015).

farklı şekerler içeren MRS katı besiyerinde 30°C'de 3 gün inkübe edilmişlerdir. İnkübasyonun sonunda mukoz yapıda koloni oluşturan izolatlar muhtemel ekzopolisakkarit üreticisi olarak seçilmişlerdir. Seçilen koloniler aynı şeker bileşiminde hazırlanmış MRS sıvı besiyerine alınarak tekrar 30°C'de 3 gün inkübe edilmişlerdir. İnkübasyonun sonunda örnekler 10 dakika 100°C'de kaynatılmış, ardından 900µL % 85'lik TCA ve 900µL örnek olacak şekilde darası alınmış 2 mL'lik santrifüj tüplerine alınarak 10.000 rpm'de 25 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası üstte kalan süpernatanttan 500 µL alınmış üzerine 1500 µL soğuk etanol eklenerek 1 gece -18°C'de bekletilmiştir. Daha sonra tekrar 10.000 rpm'de 25 dakika santrifüjlenmişlerdir. Santrifüj sonrası süpernatant dökülmüş etanolün uzaklaştırılması için 60°C'de 1 gece bekletilmiştir. Kurutulan tüpler sürenin sonunda tekrar tartılmış ve sonuçlar mg/L olacak şekilde hesaplanmıştır (Smitinont, vd., 1999; Feng vd., 2012). Elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirmesinde Minitab versiyon 16 programı kullanılmıştır

İzolatların Kolesterol Asimilasyonu

İzolatların kolesterol asimilasyon özelliklerinin belirlenmesi amacıyla Anandharaj ve Sivasankari (2014) çalışmalarında kullandığı yöntem modifiye edilmiştir. MRS besiyeri % 0.3 safra tuzu (Merck) ve 110.70 mg/dL kolesterol (Sigma Aldrich) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Aktif kültürlerden % 1 oranında aşılama yapıldıktan sonra anaerob ortamda 37°C'de 18 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun sonunda izolatların MRS besiyerinde kalan toplam kolesterol miktarı Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesinde Beckman Coulter AU5800 model analizör ile belirlenmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Safra Tuzuna Karşı Gelişim

Çalışmamızda 15 adet laktik asit bakterisinin % 1 safra tuzuna karşı 0., 4 ve 24 saat sonundaki

gelişimleri belirlenmiştir. % 1 safra tuzuna karşı 24 saat sonunda izolatların hepsi canlılıklarını korumuştur. Canlılık yüzdeleri % 104.23 ile % 88.73 arasındadır. Çizelge 1’de safra tuzuna karşı 0., 4. ve 24. saat sonundaki gelişen mikroorganizmaların logaritmik sonuçları, canlılık oranları ve izolasyon kaynakları verilmiştir.

Çizelge 1. İzolatların safra tuzunda 0., 4. ve 24. saat inkübasyon sonundaki canlılık oranları

Table 1. Viability of isolates at the end of 0,4 and 24 hours of incubation in bile salt solution

Mikroorganizma izolasyon kaynağı Isolation source of microorganism	Mikroorganizma Microorganism	0. h	4. h	24. h	0-4. h Canlılık Oranı (%) 0-4. h Viability Ratio (%)	0-24. h Canlılık Oranı (%) 0-24. h Viability Ratio (%)
Tulum Peyniri Tulum Cheese	<i>L. casei</i> DA4	7.50 ± 0.37	7.33 ± 0.59	7.22 ± 0.40	97.73 ± 3.96	96.26 ± 2.53
Bergama Tulumu Bergama Tulum Cheese	<i>W. cibaria</i> DA8	7.98 ± 0.40	7.61 ± 0.70	7.88 ± 0.44	95.36 ± 5.02	98.74 ± 2.75
Tulum Peyniri Tulum Cheese	<i>W. cibaria</i> DA28	7.34 ± 0.06	7.34 ± 0.13	7.26 ± 0.13	100.00 ± 1.36	98.91 ± 1.36
Turşu Pickle	<i>L. plantarum</i> DA100	7.05 ± 0.04	6.93 ± 0.24	6.81 ± 0.00	98.29 ± 1.77	96.59 ± 1.00
Beyaz Peynir White-Brined Cheese	<i>L. fermentum</i> DA134	8.49 ± 0.12	8.40 ± 0.52	8.40 ± 0.50	98.93 ± 3.38	98.93 ± 3.38
Ezine Peyniri Ezine Cheese	<i>L. plantarum</i> DA135	7.79 ± 0.50	7.33 ± 0.90	8.12 ± 0.47	94.09 ± 8.04	104.23 ± 2.95
Tulum Peyniri Tulum Cheese	<i>L. plantarum</i> DA140	7.18 ± 0.09	7.18 ± 0.16	7.12 ± 0.11	100.00 ± 1.45	99.16 ± 1.30
Fermente Sucuk Turkish Dry Fermented Sausage	<i>L. plantarum</i> DA199	8.25 ± 0.52	7.82 ± 0.43	7.88 ± 0.43	94.78 ± 2.75	95.51 ± 2.70
Fermente Sucuk Turkish Dry Fermented Sausage	<i>L. plantarum</i> Da218	7.69 ± 0.61	7.81 ± 0.18	7.51 ± 0.48	101.56 ± 1.54	97.65 ± 3.08
Fermente Sucuk Turkish Dry Fermented Sausage	<i>L. plantarum</i> DA225	7.85 ± 0.52	7.70 ± 0.28	7.90 ± 0.63	98.08 ± 1.93	100.63 ± 4.27
Zeytin Olive	<i>L. plantarum</i> DA245	8.11 ± 0.39	7.89 ± 0.18	7.61 ± 0.20	97.28 ± 5.38	93.83 ± 1.61
Kara Dut Black Mulberry	<i>L. plantarum</i> DA255	7.90 ± 0.53	7.61 ± 0.39	7.62 ± 0.51	96.32 ± 2.50	96.45 ± 3.29
Biberiye Rosemary	<i>L. coryniformis</i> DA256	7.41 ± 0.86	7.52 ± 0.30	7.52 ± 0.30	101.48 ± 2.03	101.48 ± 2.02
Turunç Bitter Orange	<i>L. coryniformis</i> DA263	7.36 ± 0.09	7.18 ± 0.02	7.22 ± 0.03	97.55 ± 1.05	98.09 ± 1.08
Yeni dünya Japanese Medlar	<i>L. lactis</i> DA268	8.17 ± 0.14	7.52 ± 0.23	7.25 ± 0.36	92.04 ± 1.71	88.73 ± 2.29

Eryılmaz, (2011) çalışmasında vajinal sekresyondan izole etmiş olduğu laktik asit bakterilerinin % 0.3 % 0.5 ve % 1 oranında safra tuzuna karşı dirençliliğini tespit etmiştir. *L. brevis* OZV suşunun 4. saatte % 0.3'lük konsantrasyonda canlılık oranını % 95.98 olarak tespit etmiştir. Suş, % 0.5 ve % 1'lik konsantrasyonlarda da yine bu rakamlara

ulaşmıştır. Jamally vd. (2011) çalışmalarında Fas'a özgü süt ürünlerinden izole ettikleri *L. plantarum*, *L. paracasei* ve *L. brevis* suşlarının % 0.2, % 0.3, % 0.5 ve % 1 oranında safra tuzuna karşı 0., ve 24., saatlerdeki dirençliliklerini tespit etmiştir. İzolatlar % 0.2 ve % 0.3 safra tuzunda iyi gelişim gösterirken % 1 safra tuzuna karşı canlılık değerleri düşük çıkmıştır. İzolatların % 1 safra

tuzuna karşı en yüksek canlılık oranı % 65.20 olarak belirlenmiştir. Sharma vd. (2016) geleneksel süt ürünlerinden elde ettiği laktik asit bakterilerinin % 0.3, 0.7, 1.0, 1.5 ve % 2 safra tuzuna karşı 24. saat sonundaki dirençliliklerini tespit etmiştir. *L. casei* suşlarının bu oranların tamamında yaklaşık % 90-95 aralığında canlılık gösterdiğini tespit etmişlerdir. Wang vd. (2014) hardaldan izole ettikleri 50 adet laktik asit bakterisinin % 0.5 ve % 1 safra tuzuna dirençlilik özelliklerini incelemişlerdir. Mikroorganizmalardan sadece *Lactobacillus* suşları safra tuzuna dirençlilik gösterebilmiştir. Anandharaj ve Sivasankari (2014) yaptıkları çalışmada *Lactobacillus* ve *Weissella* suşlarının % 0.3 ve % 0.5 oranında safra tuzuna karşı dirençliliğini tespit etmişlerdir. % 0.3'lük safra tuzunda *Lactobacillus* suşları ortalama % 81 *Weissella* suşları ise % 84 oranında canlılık göstermişlerdir. % 0.5'lik safra tuzunda ise bu oranlar % 30'lara kadar inmiştir. Uraipan ve Hongpattarakere (2015) çalışmalarında laktik asit bakterileri ve bifidobakterlerin gıda kaynaklı patojen mikroorganizmalara karşı antogonistik etkilerini incelemişlerdir. Bu amaçla izolatların % 0.3 safra tuzuna karşı direncini incelemişlerdir. Suşlardan en iyi canlılığı *B. longum* NIF7AN2 % 95.80, *L. plantarum* CIF17AN8 % 80.03 olarak göstermiştir. Yapılan çalışmalarda ağırlıklı olarak % 0.3 ve % 0.5 oranında safra tuzu ile çalışıldığı görülmüştür.

Çalışmamızda ise % 1 oranında safra tuzu ile deneme yapılmıştır. Çalışmada mikroorganizmaların vücudumuzda gelişmelerini destekleyici herhangi bir ortam olmadan safra tuzları ile karşılaştıkları düşünülerek zengin besin içeriği ve tamponlama özelliği olan MRS besiyeri yerine PBS'de yapılmış ve bu durum göz önüne alındığında elde edilen sonuçların iyi bir canlılık oranı olduğu düşünülmüştür.

Düşük pH'da Gelişim

Mide pH'sı 1-4 arasında değişmektedir ve besinler midede en az 90 dakika kalmaktadır. Bu nedenle mikroorganizmaların uygulanan pH ve süreye dayanıp dayanamadıklarını belirleyebilmek amacıyla *in vitro* tolerans testleri uygulanmaktadır (Castorena-Alba vd., 2017). Çalışmamızda da bu amaçla 15 adet laktik asit bakterisinin pH 3.0'de 0., 1. ve 3. saatlerdeki canlılık oranları belirlenmiştir. Asit direnci suşlar arasında farklılık göstermiş ve 8 adet izolat 3. saatin sonunda canlılığını yitirmiştir. Suşlar arasında farklı illerden alınmış tulum peynirinden izole edilen *W. cibaria* DA8 ve *W. cibaria* DA28 suşları 3. saatin sonunda oldukça iyi bir canlılık yüzdesi göstermişlerdir. 3. saatin sonunda canlılığını koruyan diğer bir grup ise fermente sucuk izolatları olan *L. plantarum* DA199, *L. plantarum* DA218 ve *L. plantarum* DA225'dir. Çizelge 2'de Mikroorganizmaların pH 3.0'e karşı 0., 1. ve 3. saat sonundaki gelişme durumları ve canlılık oranları verilmiştir.

Çizelge 2. Mikroorganizmaların pH 3.0'e karşı canlılık sonuçları
Table 2. The viability results of microorganisms against pH 3.0

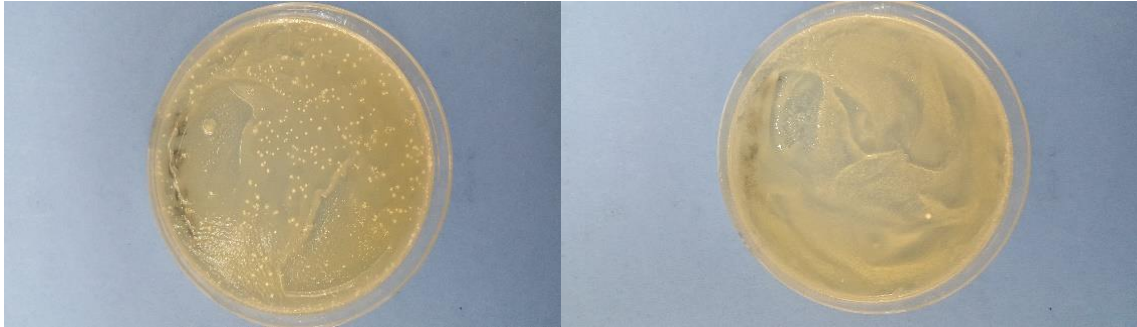
Mikroorganizma Microorganism	0. h	1. h	3. h	0-1. h Canlılık (%) 0-1. h Viability (%)	0-3. h Canlılık (%) 0-3. h Viability (%)
<i>L. casei</i> DA4	7.20 ± 0.26	6.91 ± 0.37	7.13 ± 0.65	95.97 ± 2.33	99.02 ± 4.48
<i>W. cibaria</i> DA8	7.03 ± 0.49	7.57 ± 0.11	7.50 ± 0.82	107.68 ± 1.30	106.68 ± 6.61
<i>W. cibaria</i> DA28	8.28 ± 0.39	7.91 ± 0.50	8.35 ± 0.51	95.53 ± 3.17	100.84 ± 3.26
<i>L. plantarum</i> DA100	8.42 ± 0.33	7.49 ± 0.43	0.00	88.95 ± 2.69	0.00
<i>L. fermentum</i> DA134	8.50 ± 0.46	5.73 ± 0.20	4.55 ± 0.02	67.41 ± 1.57	53.52 ± 1.05
<i>L. plantarum</i> DA135	8.13 ± 0.31	7.68 ± 0.33	0.00	94.46 ± 2.12	0.00
<i>L. plantarum</i> DA140	8.02 ± 0.23	5.06 ± 0.10	0.00	63.92 ± 1.27	0.00
<i>L. plantarum</i> DA199	8.32 ± 0.50	8.18 ± 0.42	8.04 ± 0.40	98.31 ± 2.61	96.63 ± 2.54
<i>L. plantarum</i> DA218	8.32 ± 0.22	7.90 ± 0.27	6.74 ± 0.23	94.95 ± 1.84	81.00 ± 1.68
<i>L. plantarum</i> DA225	8.69 ± 0.34	7.84 ± 0.28	6.54 ± 0.21	90.21 ± 1.92	75.25 ± 1.63
<i>L. plantarum</i> DA245	8.59 ± 0.27	7.96 ± 0.14	0.00	92.66 ± 1.38	0.00
<i>L. plantarum</i> DA255	7.63 ± 0.47	7.60 ± 0.14	0.00	72.08 ± 1.38	0.00
<i>L. coryniformis</i> DA256	8.19 ± 0.02	7.04 ± 0.34	0.00	85.95 ± 2.18	0.00
<i>L. coryniformis</i> DA263	7.83 ± 0.16	7.60 ± 0.00	0.00	97.06 ± 1.00	0.00
<i>L. lactis</i> DA268	8.12 ± 0.18	0.00	0.00	0.00	0.00

Horáčková vd. (2011) çalışmalarında farklı *Lactobacillus* şuşlarının gastrointestinal sistemdeki canlılıklarını belirlemişlerdir. Düşük pH'ya karşı dayanım testinde sindirim koşullarını oluşturmak için pH 2.0'de 0., 2., ve 3. saatlerde canlılık tespiti yapmışlardır. Mikroorganizmalar 3. saatin sonunda ortalama 1-2 logaritma düzeyinde düşüş göstermişlerdir. Soliman vd. (2015) *L. acidophilus*, *L. casei* ve *L. plantarum* şuşlarının probiyotik olma özelliklerini incelemişlerdir. Bu amaçla pH 2.0 ve pH 3.0'de canlılıklarını belirlemişlerdir. *L. acidophilus* pH 2.0'de canlılık gösterebilirken diğer iki mikroorganizma bu asit değerinde canlı kalamamışlardır. Dixit vd. (2013) üç farklı *L. acidophilus* şuşunun probiyotik olma özelliklerini incelemişlerdir. Bu amaçla yaptıkları düşük asite

direnc testinde MRS besiyerinin pH'sını 2.5'e ayarlamış ve 2. ve 4. saatlerdeki canlılıklarını belirlemişlerdir. Şuşlar pH 2.5'de 4 saat sonunda % 34, % 52 ve % 75 oranında canlılık göstermişlerdir.

Ekzopolisakkarit Üretimi

Ekzopolisakkarit üretimini belirlemek amacıyla yapılan analiz sonucunda 15 adet izolattan 9 tanesi sakkaroz içeren MRS katı besiyerinde parlak, mukoz bir yapı üretmişlerdir. Şekil 1'de *L. plantarum* DA255 ve *L. coryniformis* DA263 izolatlarının sakkaroz içeren MRS katı besiyerinde oluşturdukları parlak, mukoz yapı gösterilmektedir.



Şekil 1. *L. plantarum* DA255 ve *L. coryniformis* DA263 şuşlarının oluşturduğu parlak, mukoz yapı
Figure 1. Glossy, mucous structure of *L. plantarum* DA255 and *L. coryniformis* DA263

İzolatların ürettiği EPS miktarı 11.9 ile 1.1 mg/L arasında belirlenmiştir. Dut bitkisinden izole edilen *L. plantarum* DA255 şuşu 11.9 mg/L ile en yüksek EPS üreticisi olarak belirlenmiştir. Ardından turşudan izole edilen *L. plantarum* DA100 izolatu 9 mg/L verirken en düşük miktar beyaz peynirden izole edilen *L. fermentum* DA134 şuşunda 1.1 mg/L olarak belirlenmiştir. Aşağıda çizelgede (Çizelge 3) izolatların EPS miktarları mg/L olarak verilmiştir.

Feng vd. (2012) çalışmasında Çin'e özel çeşitli geleneksel fermente gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin ekzopolisakkarit (EPS) üretimlerini belirlemişlerdir. En yüksek EPS üretim kapasitesi (0.859 g/L) *L. plantarum* (HQ259238) şuşundan elde etmişlerdir. Van Geel-Schutten vd. (1998) çalışmalarında 182 adet *Lactobacillus* şuşundan 60 tanesinin EPS ürettiğini,

bunlardan 17 şuşun EPS üretiminin 100 mg/L'den fazla olduğu belirlenmiştir. Ayrıca çalışma sonunda EPS üretimi için en uygun bileşenin sakkaroz olduğunu kaydetmişlerdir. Dilna vd. (2015) çalışmasında laktik asit bakterilerinin uygun koşullar sağlandığında EPS üretimi için yararlı olacağını düşünmüşlerdir. Bu amaçla yaptıkları çalışmada *L. plantarum* RJF4, şuşu, yapısında glukoz ve mannoz içeren bir heteropolisakkariti 3.5 g/L düzeyinde üretmiştir. Wang vd. (2015) çalışmasında kefirde izole ettikleri *L. plantarum* YW32 şuşunun EPS üretimini ve yapısını belirlemişlerdir. *L. plantarum* YW32 tarafından üretilen EPS, yaklaşık sırasıyla 8.2:1: 4.1:4.2'lik mol oranında mannoz, fruktoz, galaktoz ve glukozdan oluşmuştur. Ayrıca oluşan EPS'nin 1.03×10^5 Da'lık bir molekül ağırlığına sahip olduğunu belirlemişlerdir. Üretilen EPS'nin yüksek sıcaklığa (283.5°C), ksidroksil ve

süperoksit radikallerine karşı antioksidan aktiviteye ve bazı patojen bakteriler üzerinde antibiyofilm aktivitesi ile insan HT-29 hücrelerine karşı antitümör aktivitesine sahip olduğunu belirlemişlerdir. Demir vd. (2017) yoğurttan izole ettikleri laktik asit bakterilerinin EPS üretimlerini belirlemişler ve bakterilerin EPS üretim miktarları 5.89 ile 134.60 mg/L arasında tespit etmişlerdir.

Çizelge 3. İzolatların ürettiği EPS miktarları (mg/L)

Mikroorganizma <i>Microorganism</i>	EPS miktarı (mg/L) <i>EPS amount (mg/L)</i>
<i>W. cibaria</i> DA8	2.95 bc
<i>W. cibaria</i> DA28	2.40 bc
<i>L. plantarum</i> DA100	9.00 ab
<i>L. fermentum</i> DA134	1.10 c
<i>L. plantarum</i> DA140	2.40 bc
<i>L. plantarum</i> DA199	2.80 bc
<i>L. plantarum</i> DA245	5.00 abc
<i>L. plantarum</i> DA255	11.90 a
<i>L. coryniformis</i> DA263	4.90 abc

^{a, b, c} Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır ($P < 0.05$) ^{a, b, c} Different letters in same column are statistically different ($P < 0.05$).

Kolesterol Asimilasyonu

Bazı laktobasil veya bifidobakterleri içeren fermente süt ürünlerinin tüketilmesinin, insanlarda serum kolesterol düzeylerini düşürdüğü iddia edilmektedir (Burhan vd., 2017). Çalışmamızda da probiyotik olma potansiyeline sahip olduğu düşünülen 15 adet laktik asit bakterisinin kolesterol asimilasyon yetenekleri belirlenmiştir. İzolatların toplam kolesterol asimilasyon yüzdeleri % 60.71 ile % 16.71 arasında değişmektedir. EPS üreticisi olmayan *L. lactis* DA268 % 60.71 ile en yüksek asimilasyonu sağlamıştır. *L. plantarum* DA245 suşu ise iyi bir EPS üreticisi olmasına karşın kolesterol asimilasyon yüzdesi % 16.71 olarak bulunmuştur. Çizelge 4'te izolatların kolesterol asimilasyon yüzdeleri ve miktarları verilmiştir. Anandharaj ve Sivasankari (2014) çalışmalarında anne sütünden izole ettikleri *Lactobacillus* suşlarının farklı

kolesterol miktarlarında ve safra tuzu varlığında/yokluğunda asimilasyon özelliklerini belirlemişlerdir. Suşlar safra tuzu yokluğunda 23.28-35.41 mg/mL aralığında kolesterol asimile ederken % 0.3 safra tuzu varlığında en yüksek değer 61.05 mg/mL olarak belirlenmiştir. Burhan vd. (2017) 6 farklı *L. fermentum* suşunun kolesterol asimilasyon yeteneğini belirlemişlerdir. Suşlar 100 mg/mL toplam kolesterol bulunan MRS besiyerine 10^{10} kob/mL olacak şekilde aşılınmış ve 24 saat anaerobik koşullarda inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda suşlar % 4.1 ve % 8.1 oranında asimilasyon göstermişlerdir. Castorena-Alba vd. (2017) çalışmasında farklı laktobasil ve bifidobakter suşlarının % 0.2 ve % 0.4 safra tuzu varlığındaki kolesterol asimilasyon yeteneklerini belirlemişlerdir. *B. lactis* DSM10140 suşu % 0.2 safra tuzu varlığında % 0.08 asimilasyon gösterirken % 0.4 safra tuzu varlığında bu yüzde % 18.69 olmuştur. Lertcanawanichakul vd. (2015) *P. plantarum* L14/1, *P. acidilactici* L25, *L. plantarum* L26, *L. Pentosus*, *E. faecium* N 15, suşlarının kolesterol asimilasyon özelliklerini belirlemişlerdir. Suşlar % 0.3 safra tuzu varlığında iyi bir düşüş göstermişlerdir. *E. faecium* N 15 suşu safra tuzu varlığında % 64.88 düşüş sağlarken safra tuzu yokluğunda bu oran % 17.12'ye düşmüştür. Safra asitleri yüzey gerilimini azaltıcı etkileri ile suda çözünmeyen lipidlerin emülsiyonlaşmasını böylece enzimlerin bağırsak lümenindeki lipitlere daha iyi etki yapmalarının yanı sıra safra içerisindeki kolesterolün çökmesini engellerler. Bu nedenle yapılan çoğu *in vitro* kolesterol asimilasyon çalışmalarında safra tuzu ortama eklenerek etkisi incelenmektedir. Bu nedenle çalışmamızda yapılan kolesterol asimilasyon denemesinde MRS besiyeri içerisine 110.70 mg/dL kolesterolün yanı sıra % 0.3 safra tuzu eklenmiştir. 18 saat inkübasyon sonunda belli bir miktar kolesterol oluşan pH değişimi ile çökmüş olma ihtimali de bulunmaktadır. Ancak elde edilen asimilasyon yüzdeleri suşların bu yetenekleri hakkında öngörü sahibi olmamıza katkıda bulunmuştur.

Çizelge 4. İzolatların kolesterol asimilasyon yüzdeleri

Table 4. Cholesterol assimilation percentages of isolates

Mikroorganizma Microorganism	Total Kolesterol Asimilasyonu (%) Total Cholesterol Assimilation (%)
<i>L. casei</i> DA4	16.91
<i>W. cibaria</i> DA8	32.15
<i>W. cibaria</i> DA28	36.31
<i>L. plantarum</i> DA100	34.14
<i>L. fermentum</i> DA134	33.51
<i>L. plantarum</i> DA135	30.50
<i>L. plantarum</i> DA140	43.27
<i>L. plantarum</i> DA199	42.18
<i>L. plantarum</i> Da218	50.63
<i>L. plantarum</i> DA225	55.50
<i>L. plantarum</i> DA245	16.71
<i>L. plantarum</i> DA255	41.19
<i>L. coryniformis</i> DA256	50.52
<i>L. coryniformis</i> DA263	36.22
<i>L. lactis</i> DA268	60.71

SONUÇ

Mikroorganizmaların, gastrointestinal sistemden rahatça geçebilmesi için safra tuzuna ve düşük pH'ya karşı dirençli olmaları gerekmektedir. Mide pH'sı 1-4 arasında değişmekte ve besinlerin midede kalma süresi ortalama 3 saattir. Bu nedenle çalışmamızda pH 3.0'de 0., 1., ve 3. saatlerde mikroorganizmaların canlılık miktarları belirlenmiştir. 15 izolattan 7 tanesi 3. saatin sonunda canlı kalmayı başarabilmişlerdir. % 1 safra tuzu denemesinde ise izolatların tamamı 24 saat sonunda yüksek bir canlılık oranı göstermişlerdir. Alp ve Aslım (2010) çalışmasında anne sütü ile beslenen bebeklerin dışkılarından izole ettikleri 31 *Bifidobacterium* spp.'nin safra tuzlarına ve düşük pH'ya karşı direnç ile ekzopolisakkarit üretimlerini belirlemiş ve EPS üretimi ile safra tuzlarına karşı direnç ve düşük pH'ya karşı direnç arasında pozitif bir korelasyon bulmuşlardır ($p < 0.01$). EPS üreticisi bazı laktobasil suşlarının safra tuzlarının da yardımı ile kolesterolü asimile edebildiği birçok *in vitro* çalışma ile gösterilmiştir (Horáčková vd., 2017). Tok ve Aslım (2010) çalışmalarında yüksek EPS üretimi olan suşların daha iyi bir kolesterol asimilasyonu sağladığını belirlemişlerdir. Ancak

bizim çalışmamızda EPS üretimi ile kolesterol asimilasyonları arasında kuvvetli bir bağlantı bulunamamıştır. Yüksek miktarda EPS üretimi olan *L. plantarum* DA255 suşu % 41.19 oranında kolesterol asimilasyonu gösterirken *L. lactis* DA268 suşu EPS üreticisi olmamasına rağmen % 60.71'lik bir kolesterol asimilasyonu göstermiştir. Bu durum izolatların kolesterol asimilasyonunu EPS üretiminden farklı mekanizmalar ile sağladığı sonucunu düşündürmektedir. Laboratuvar ortamında yapılan deneme sonuçları ile suşların *in vivo* ortamda gösterebilecekleri kolesterol asimilasyon yetenekleri hakkında öngörü sahibi olunmuştur. Ancak bu suşların safra tuzu hidrolaz, HMG CoA redüktaz enzimi aktivitesi gibi bazı özellikleri, kolesterol seviyesini düşürdüğü mekanizma (mekanizmalar) ve uygun suşları seçmek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje No:4439-D1-15) tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

Ahire, J., Bhat, A., Thakare, J., M., Pawar, P., B., Zope, D., G., Jain, R., M., Chaudhari, B. L. (2012). Cholesterol assimilation and biotransformation by *Lactobacillus helveticus*. *Biotechnol Lett*, 34: 103–107, doi: 10.1007/s10529-011-0733-2.

Ahn, Y., T., Kim, G., B., Lim, K., S., Baek, Y., J., Kim, H.U. (2003). Deconjugation of bile salts by *Lactobacillus acidophilus* isolates. *Int Dairy J*, 13: 303–311, doi: 10.1016/S0958-6946(02)00174-7.

Alp, D. (2018). Doğal kaynaklardan izole edilen laktik asit bakterilerinin bazı probiyotik özelliklerinin araştırılması ve *in vitro* bağırsak modelinde patojenlerin tutunmasını engelleme özelliklerinin belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi, Isparta, Türkiye, 124 s.

Alp, D., Ertürkmen, P. (2017). Probiyotik olarak kullanılan *Lactobacillus* spp. suşlarının kolesterol düşürücü etkileri ve olası mekanizmalar. *Makü Febed*, 8(1): 108-113.

- Alp, G., Aslım, B. (2010). Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (eps) production of *Bifidobacterium* spp. isolated from infants feces and breast milk. *Anaerobe*, 16: 101–105.
- Anandharaj, M., Sivasankari, B. (2014). Isolation of potential probiotic *Lactobacillus* oris HMI68 from mother's milk with cholesterol-reducing property. *J Biosci Bioeng*, 118 (2): 153-159, doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.01.015.
- Anila, K., Kunzes, A., Bhalla, T.C. (2016). *In vitro* cholesterol assimilation and functional enzymatic activities of putative probiotic *Lactobacillus* ssp. isolated from fermented foods/beverages of North West India. *J Nutr Food Sci*, 6 (2), doi:10.4172/2155-9600.1000467.
- Arief, I.I., Jenie, B.S., Astawan, M., Kazuhito, F., Witarto, A.B. (2015). Identification and probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from Indonesian local beef. *Asian-Australas J Anim Sci*, 9(1): 25-36, doi:10.3923/ajas.2015.25.36.
- Belviso, S., Giordano, M., Zeppa, P.D.G. (2009). *In vitro* cholesterol-lowering activity of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paracasei* strains isolated from the Italian Castelmagno PDO Cheese. *Dairy Sci Technol*, 89: 169–176, doi: 10.1051/dst/2009004.
- Burhan, H.S.A., Priyambada, E., Arief, I.I. (2017). Potential of lactic acid bacteria isolated from Dangke and Indonesian Beef as Hypocholesterolaemic Agent. *J Anim Sci Technol*, 40 (2):136-142, doi: 10.5398/medpet.2017.40.2.136.
- Castorena Alba, M.M., Vázquez Rodríguez, J.A., López Cabanillas Lomelí, M., González Martínez, B.E. (2017). Cholesterol assimilation, acid and bile survival of probiotic bacteria isolated from food and reference strains. *CyTA*, 1(16):36–41, doi: 10.1080/19476337.2017.1335347.
- Chang Qing, Y., Li Rong, L. (2015). Cloning and expression of bile salt hydrolase gene from *Lactobacillus plantarum* M1-Uvs29, (Eng. ed.) Volume 2, *J Northeast Agric Univ*, 60-66.
- Coşkun, T. (2006). Pro-pre ve sinbiyotikler. *CŞHD*, 49: 128-148.
- Demir, E., Kaygusuz, E., Kılıç, G., Yüce, S., Soyuçok, A. (2017). Yoğurt örneklerinden izole edilmiş laktik asit bakterilerinin moleküler yöntemlerle tanımlanması ve ekzopolisakkarit üretimlerinin belirlenmesi. *Makü Febed*, 8(1): 262-267.
- Dilna, S.V., Surya, H., Aswathy, R.G., Varsha, K.K., Sakthikumar, D.N., Pandey, A., Nampoothiri, K.M. (2015). Characterization of an exopolysaccharide with potential health benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. *Food Sci Technol Int*, 64: 1179-1186, doi:10.1016/j.lwt.2015.07.040.
- Dixit, G., Samarth, D., Bhadekar, R. (2013). Comparative studies on potential probiotic characteristics of *Lactobacillus acidophilus* strains. *Eurasia J Biosci*, 7: 1-9, doi: 10.5053/ejobios.2013.7.0.1.
- Eryılmaz, F. (2011). Vajinal Sekresyondan izole edilen laktik asit bakterilerine ait bazı suşların potansiyel probiyotik özelliklerin belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara, Türkiye, 95 s.
- Feng, M., Chen, X., Li, C., Nurgul, R., Dong, M. (2012). Isolation and identification of an exopolysaccharide-producing lactic acid bacterium strain from chinese paocai and biosorption of Pb(II) by its exopolysaccharide. *J Food Sci*, 77:(6)11-117, doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02734.x.
- Gill, H.S., Guarner, F. (2004). Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgrad Med J*, 80:516-526, doi: 10.1136/pgmj.2003.008664.
- Gilliland, S.E., Nelson, C.R., Maxwell, C. (1985): Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol*, 49: 377.
- Hofmann, A.F., Molino, G., Milanese, M., Belforte, G. (1983). Description and simulation of a physiological pharmacokinetic model for the metabolism and enterohepatic circulation of bile acids in man compartmental model of cholic acid in man. *Eur J Clin Invest* 71: 1003-1022.
- Horáčková, S., Plocková, M., Demnerová, K. (2017). Importance of microbial defence systems to bile salts and mechanisms of serum cholesterol

- reduction. *Biotechnol*, 36:(3)682-690, doi:10.1016/J.Biotechadv.2017.12.005.
- Horáčková, S., Žaludová, K., Plocková, M. (2011). Stability of selected *Lactobacilli* in the conditions simulating those in the gastrointestinal tract czech. *Czech J Food Sci*, 29: 30–35.
- Iranmanesh, M., Ezzatpanah, H., Mojgani, N. (2014). Antibacterial activity and cholesterol assimilation of lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian dairy products. *Food Sci Technol Int*, 58: 355-359, doi: 10.1016/j.lwt.2013.10.005.
- Jamaly, N., Benjouad, A., Bouksaim, M. (2011). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from known popular traditional moroccan dairy products. *Br Microbiol Res J*, 1(4): 79–94.
- Kaur, I., P., Chopra, K., Saini, A. (2002). Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Eur J Pharm Sci*, 15: 1–9, doi: 10.1016/S0928-0987(01)00209-3.
- Kopp Hoolihan, L. (2001). Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *J Am Diet Assoc*, 101: 229-241, doi: 10.1016/S0002-8223(01)00060-8.
- Lertcanawanichakul, M., Kannai, J., Wongmuang, P., Tharaporn, S. (2015). Cholesterol-lowering potentials of lactic acid bacteria with potential probiotic properties. *Int J Pharmtech Res*, 7(3): 463-470.
- Moal, V.L., Servin, A.L. (2014). Anti-infective activities of *Lactobacillus* strains in the human intestinal microbiota: from probiotics to gastrointestinal anti-infectious biotherapeutic agents. *Clin Microbiol Rev*, 27(2): 167–199, doi: 10.1128/CMR.00080-13.
- Noh, D.O., Kim, S.H., Gilliland, S.E. (1997). Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *J Dairy Sci*. 80:(12) 3107-3113.
- Öztürk, Z., Tiryaki Gündüz, G. (2017). Gıda kaynaklı patojenlerin inhibisyonunda probiyotik mikroorganizmaların kullanımı. *GIDA*, 43 (4): 533-548, doi: 10.15237/gida.GD17112.
- Pinto, M.G.V., Franz, C.M.A.P., Schillinger, U., Holzapfel, W.H. (2006). *Lactobacillus* spp. with *in vitro* probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Int J Food Microbiol*, 109:205–214, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.029.
- Sahadeva, R.P.K., Leong, S.F., Chua, K.H., Tan, C.H., Chan, H.Y., Tong, E.V., Wong, S.Y.W., Chan, H.K. (2011). Survival of commercial probiotic strains to ph and bile. *Int Food Res J*, 18(4):1515–1522.
- Sharma, K., Sharma, N., Sharma, R. (2016). Identification and evaluation of *in vitro* probiotic attributes of novel and potential strains of lactic acid bacteria isolated from traditional dairy products of North-West Himalayas. *J Clin Microbiol Biochem Technol* 2(1): 018–025, doi: 10.17352/jcmbt.000011.
- Smitinont, T., Tansakul, C., Tanasupawat, T., Keeratipibul, S., Navarini, L., Bosco, M., Cescutti, P. (1999). Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. *Int J Food Microbiol*, 51:105–111, doi: 10.1016/S0168-1605(99)00094-X.
- Soliman A.H.S., Sharoba, A.M., Bahlol, H.E.M., Soliman, A.S., Radi, O.M.M. (2015). Evaluation of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* for probiotic characteristics. *JMEAST*, 5:(1) 10–18.
- Syah, S.P., Sumantri, C., Arief, I.I., Taufik, E. (2017). Isolation and identification of indigenous lactic acid bacteria by sequencing the 16S rRNA from Dangke, a traditional cheese from Enrekang, South Sulawesi. *Pak. J. Nutr*, 16(5):384-392. doi: 10.3923/pjn.2017.384.392.
- Tok, E. (2007). Probiyotik olarak kullanılabilircek bazı laktik asit bakterilerinin kolesterol giderimi özellikleri ve safra tuzu dekonjugasyonu etkilerinin araştırılması. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Türkiye, 95s.
- Tok, E., Aslım, B. (2010). Cholesterol removal by some lactic acid bacteria that can be used as probiotic. *Microbiol Immunol*, 54: 257–264, doi: 10.1111/j.1348-0421.2010.00219.x.

- Tokatlı, M., Gülgör, G., Elmacı, S., Arslanköz, N., Özçelik, F. (2015). *In vitro* properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles *BioMed Res Int.* ID 315819. s 8, doi: 10.1155/2015/315819.
- Özden Tuncer, B., Tuncer, Y. (2014). Exopolysaccharide producer *Streptococcus thermophilus* St8.01 strain; a potential probiotic culture. *GIDA* 39 (4):195-202.
- Ulukaya, E. (çeviri ed.) 1997. *Biyokimya. Biochemistry.* 2. baskıdan çeviri, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, Türkiye. 205.
- Uraipan, S., Hongpattarakere, T. (2015). Antagonistic characteristics against food-borne pathogenic bacteria of lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from feces of healthy thai infants. *Jundishapur J Microbiol*, 8(6):18264, doi: 10.5812/jjm.8(6)2015.18264.
- Ünal, E., Erginkaya, Z. (2010). Probiyotik mikroorganizmaların mikroenkapsülasyonu. *GIDA*. 35 (4): 297-304.
- Van Geel-Schutten, G.H., Flesch, F., Brink, B., Smith, M.R., Dijkhuizen, L. (1998). screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol*, 50: 697-703.
- Vinderola, C.G., Prosello, W., Ghiberto, D., Reinheimer, J.A. (2000). Viability of probiotic *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* and nonprobiotic microflora in Argentinian Fresco Cheese. *J Dairy Sci*, 83: 1905-1911, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(00)75065-X.
- Wang, S.C., Chang, C.K., Chan, S.C., Shieh, J.S., Chiu, C.K., Duh, P. (2014). Effects of lactic acid bacteria isolated from fermented mustard on lowering cholesterol. *Asian Pac J Trop Biomed*, 4(7): 523-528, doi: 10.12980/APJT.B.4.201414B54.
- Wang, J., Zhao, X., Tian, Z., Yang, Y., Yang, Z. (2015). Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydr Polym*, 125: 16–25, doi: 10.1016/j.jbiomac.2014.12.006.
- Xiao, K. (2014). Bile resistance in *Lactobacillus rhamnosus* GG: Stability and mechanisms. Master Dissertation, Helsinki University, Finland, 72p.
- Xie, N., Cui, Y., Yin, Y.N., Zhao, X., Yang, W., Wang, Z., Fu, F., Tang, Y., Wang, X., Liu, X., Wang, C., Lu, F. (2011). Effects of two *Lactobacillus* strains on lipid metabolism and intestinal microflora in rats fed a high-cholesterol diet. *BMC Complement Altern Med*, 11:53.