

Potansiyel Zeytin Probiyotik Suşunun in vitro Sindirim Sistemindeki Canlılığının Araştırılması

Viability Investigation of a Potential Probiotic Olive Strain Using an in vitro Digestive System Model

Tarık ÖZTÜRK^{1,2,3}, Koen VENEMA*⁴, Zeynep Petek ÇAKAR^{1,2}, Mehlika BORCAKLI³

¹İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Maslak, İstanbul, Türkiye

²İstanbul Teknik Üniversitesi, Dr. Orhan Öcalgiray Moleküler Biyoloji, Biyoteknoloji ve Genetik Araştırma Merkezi (İTÜ-MOBGAM), İstanbul, Türkiye

³TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, Gıda Enstitüsü, Gebze, Türkiye

⁴Department of Microbiology & Systems Biology, The Netherlands Organization for Applied Scientific Research, Zeist, Utrecht, The Netherlands

*Şu anki adresi: Maastricht University – campus Venlo, School of Nutrition and Translational Research in Metabolism (NUTRIM), Faculty of Health, Medicine and Life Sciences, Department of Human Biology, PO Box 616, 6200 MD, Maastricht, The Netherlands.

Geliş tarihi: 01.12.2015

Kabul tarihi: 03.02.2016

Özet

Türkiye dünyanın üçüncü en büyük sofralık zeytin üreticisidir. Bir laktik asit bakterisi olan *Lactobacillus plantarum* T129 suşu Marmara Bölgesi'ndeki zeytin işleme havuzlarının salamuralarından izole edilmiştir. Probiyotikler uygun miktarda alındığında konakçısına sağlık faydaları sağlayan canlı organizmalar olarak tanımlanmıştır. Laktik asit bakterileri insan bağırsağında bulduklarından ve uzun yıllardır güvenle fermente gıdalarda kullanıldıklarından potansiyel probiyotik ürünlerin geliştirilmesinde aday olabilirler. Bu çalışmada, bir *in vitro* sindirim sistemi modeli kullanılarak, *L. plantarum* T129 suşunun canlılık yüzdesi belirlenmiştir. Çalışmada TIM-1, TNO *in vitro* Model 1 sistemi kullanılmıştır. TIM-1; insan sindirim sisteminin mide, onikiparmak bağırsağı, boş bağırsak ve kıvrım bağırsağı temsil eden dört bölmeden oluşan, bilgisayar kontrollü ve valide edilmiş *in vitro* bir modeldir. İki tekrarlı gerçekleştirilen çalışmada, T129 suşunun canlılığı %59.7±10.6 olarak tespit edilmiştir. Bu canlılık yüzdesi, yoğurt bakterilerinden yüksek ve *Bifidobacterium bifidum* ve *Lactobacillus acidophilus* gibi probiyotik bakteriler ile karşılaştırılabilir düzeydedir. Buna göre sofralık zeytinler, doğal probiyotik laktik asit bakterileri içeren süt ürünleri dışında bir alternatif probiyotik ürün olabilecektir.

Anahtar kelimeler: Sofralık zeytin, probiyotik, laktik asit bakterisi, *Lactobacillus plantarum*, TIM-1.

Abstract

Turkey is the third biggest table olive producing country. A lactic acid bacterium strain, *Lactobacillus plantarum* T129 was isolated from olive processing brine in Marmara Region of Turkey. Probiotics are defined as live microorganisms which confer a health benefit on the host when administered at adequate amounts. Lactic acid bacteria are potential candidates for probiotic products, due to their natural presence in human colon and long and safe use in food fermentations. In this study, the per cent viability (survival) of the *L. plantarum* T129 strain was determined by using an *in vitro* digestive system model. TIM-1 that was used in this study stands for TNO *in vitro* Model 1. TIM-1 is a computer controlled validated dynamic model that mimics the gastric, duodenal, jejunal and ileal compartments of human digestive system. The survival of T129 was determined as %59.7±10.6 in duplicate experiments. This survival is higher than those of common yoghurt bacteria and comparable with the survival of probiotic bacteria such as *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus*. Thus, table olives could be a natural non-dairy alternative source of potential probiotic lactic acid bacteria.

Keywords: Table olive, probiotics, lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum*, TIM-1

Giriş

Probiyotikler uygun miktarda uygulandığında konakçı organizmaya sağlık faydaları sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadırlar. (FAO/WHO 2002). Laktik asit bakterileri (LAB), uzun yıllardır gıda fermentasyonlarında kullanılmaları ve insan bağırsak mikrobiyotasının doğal bir bileşeni olmaları nedeni ile probiyotik ürünlerin geliştirilmesinde büyük bir etki potansiyeline sahiptir (Lebeer ve ark. 2008).

Probiyotik bakterilerin mide ve ince bağırsaktan geçişlerinde canlı kalmaları hayati önem taşımaktadır. Probiyotiklerin canlı kalma yüzdelerinin tür ve suşa bağlı değişiklik gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle her potansiyel probiyotik suşun canlı kalma özelliğinin belirlenmesi gerekmektedir.

TNO (Hollanda Bilimsel Uygulamalı Araştırmalar Merkezi) mide ve ince bağırsak *in vitro* modeli -1 (TIM-1) gibi mekanistik olarak valide edilmiş modellerin kullanımı probiyotik organizmaların canlılığını belirlemede faydalıdır. TIM-1 bilgisayar kontrolü ile insan sindirim sistemini dinamik bir biçimde doğru olarak taklit etmektedir (Minekus ve ark., 1995). Sistemdeki dört bölme mide, onikiparmak bağırsağı, boş bağırsak ve kıvrım bağırsağı temsil etmektedir. Sistemde vücut sıcaklığı, peristaltik hareket, besin boşaltım hızı ve her bölüme özgü spesifik pH, enzim ve elektrolit seviyeleri gerçek fizyolojik koşullara mümkün olduğunca benzer bir biçimde taklit edilmektedir. TIM-1 sistemi probiyotiklerin canlı kalma yüzdeleri dahil pek çok *in vivo* çalışma ile valide edilmiştir (Marteau ve ark. 1997). TIM-1 pek çok potansiyel probiyotiğin mide ve ince bağırsaktan geçişinde canlı kalma yüzdelerinin belirlenmesinde ve canlılığı sınırlayıcı faktörlerin ortaya konulmasında kullanılmıştır (Martinez ve ark. 2011).

Zeytin (*Olea europaea L.*) *Oleacea* familyasının bir üyesidir. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ni de içine alan Yukarı Mezopotamya ve Güney Ön Asya'nın, zeytinin anavatanı olduğu düşünülmektedir. Dünyadaki tüm zeytin ağaçlarının %98'i Akdeniz Bölgesi'nde yer almaktadır (Anon, 2010). Zeytin meyvesi, acı lezzette olan polifenoller, özellikle de

oleuropein bileşeni nedeni ile dalından koparıldığı hali ile tüketilememektedir. Zeytinin tüketilebilmesi için acılığı çeşitli yöntemler ile giderilmektedir. Acılık zeytinyağı elde edilmesi sırasında zeytinlerin ezilmesi işlemi ile sulu faza (zeytin kara suyu) alınarak kısmen giderilmekte veya bütün zeytin meyvesinin acılığı giderilerek sofralık zeytin elde edilmektedir (Papoff ve ark. 1996; Rivas ve ark. 2000).

Türkiye, sofralık zeytin üretiminde Avrupa Birliği'nin ardından Mısır ile yarışarak değişen yıllık üretimine göre dünyada 2. veya 3. sırada yer almaktadır (IOOC, 2011a; IOOC, 2011b). Türkiye'de üretilen zeytinin önemli bir bölümü sofralık zeytin için ayrılmaktadır. 2009-2010 yılları arasında üretilen 1227000 ton zeytinin 409000 tonu sofralık zeytine, 818000 tonu ise yağlığa ayrılmıştır (Anon, 2010).

Bu çalışmanın amacı, Marmara Bölgesi'ndeki zeytin işleme havuzlarının salamuralarından izole edilmiş olan ve ön taramalar sonucu probiyotik özellik potansiyeli gösteren *L. plantarum* T129 suşunun, valide edilmiş bir *in vitro* sindirim sistemi olan TIM-1'deki canlı kalma yüzdesinin belirlenmesidir.

Materyal ve Metot

Materyal

Çalışmada kullanılan *L. plantarum* T129 suşu, TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Gıda Enstitüsü tarafından Marmara Bölgesi'ndeki bir zeytin işleme suyundan izole edilmiştir. Çalışmalarda kullanılan bütün kimyasallar analitik saflıktadır.

Metot

Dinamik gastrointestinal model (TIM-1)

TIM-1 sistemi mide, onikiparmak bağırsağı, boş bağırsak ve kıvrım bağırsağı temsil eden dört bölümden oluşmaktadır. Her bölüm iki cam bölmeden oluşmaktadır. Bu cam bölmeler esnek bir duvarı kaplamakta ve bu esnek duvar sayesinde peristaltik hareket taklit edilebilmektedir. Bütün bölümler vücut sıcaklığı olan 37°C'de tutulmaktadır. Bölümlere verilen gastrik asit, gastrik enzim, pankreatik enzim bikarbonat ve safra tuzları fizyo-

lojik miktarlara uygundur. Boş bağırsak ve kıvrım bağırsaktaki emilim, diyaliz sistemi ile sağlanmaktadır. Bölümlerdeki kimüs (sindirim sisteminde yer alan ögün, enzim ve salgı karışımı) geçiş hızları eksponansiyel kuvvet serileri ile *in vivo* verilere göre ayarlanmıştır (Minekus ve ark., 1995; Marteau ve ark., 1997).

Deneyel Tasarım

Bakteri suşunun sindirim sisteminde canlı kalma yüzdesi, altı saatlik bir deney ile belirlenmiştir. Deneyde her saat, bir saat boyunca kıvrım bağırsak çıkışından buz üzerindeki kapta toplanan örnekler alınmış ve iki saat içinde bu örneklerin uygun dilisyonlarından 100er µl yayma plak yöntemi ile ekilmiştir. Altı saat sonunda midede kalan örnek ve bütün ince bağırsakta kalan örnek iki ayrı kaba toplanmıştır. Alınmış olan mide ve ince bağırsak örnekleri de alınmalarını takip eden iki saat içinde yayma plak yöntemi ile ekilmiştir. Deneyler iki tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Deney öncesi model bir dekontaminasyon protokolüne göre dezenfekte edilmiştir. Bu protokolün ilk aşamasında sistem sabun ve fırça yardımı ile yıkanmış ve bütün kirler uzaklaştırılmıştır. Kirlerin uzaklaştırılmasının ardından sistem su ile durulanmıştır. Durulanmış olan sistem 30 dakika yaklaşık %0.5 lik hipoklorit çözeltisinde bekletilmiş, ardından 0.5M HCl ile durulanmıştır. 0.5M HCl ile durulanan sistem, son olarak hacmen %70'lik etanol çözeltisi ile durulanmış ve kurumaya bırakılmıştır. Sistem çalıştırılmadan önce bütün tüpler hacmen %30 etanol ile durulanmış ve sistemdeki kapak ve pH elektrotları hacmen %70'lik etanolden geçirilmiştir.

Bakteri kültürleri 5ml steril fizyolojik peptonlu suda çözünmüş 150ml yarım yağlı süt, 70ml steril gastrik elektrolit çözeltisi ve 5ml'lik gastrik enzim çözeltisi ile karıştırılarak sisteme beslenecek ögün elde edilmiştir. Öğünden örnek alımından sonra öğünün pH'sı HCl ile 5.5'e ayarlanarak modele beslenmiştir (Minekus ve ark. 1995). Midenin pH'ı fizyolojik koşullara uygun olarak 2M HCl ile bilgisayar kontrollü olarak sağlanmıştır. Mide pH'sı deney başlangıcından 30 dakika sonra 4.2, 60 da-

kika sonra 2.9 ve 120 dakika sonra ise 1.7 olacak şekilde ayarlanmıştır. Onikiparmak bağırsağı, boş bağırsak ve kıvrım bağırsağın pH değerleri ise bikarbonat çözeltisi ilavesi ile sırasıyla 6.5, 6.8 ve 7.2'de sabit tutulmuştur.

Kimüs'ün modelden geçişi bölümler arası valf sistemi ile düzenlenmiştir. Mide boşaltım hızının yarı zamanı 40 dakika, bağırsak boşaltımının yarı zamanı ise 160 dakika olarak uygulanmıştır. Bölümlere verilen enzim ve salgılar, Minekus ve ark. (1995) tarafından açıklandığı gibidir. Ancak onikiparmak bağırsağına verilen safra tuzu konsantrasyonu ilk saat %4'lük, sonraki 5 saat ise %2'lik olarak düzenlenmiştir.

Örnekleme ve mikrobiyolojik metotlar

-80° C de depolanan 100µl stok kültür deney öncesinde 10 ml MRS besiyerine (De Man ve ark., 1960) aşılanmış ve 16 saat 37°C'de anaerobik olarak inkübe edilmiştir. Geliştirilen kültür santrifüj ile çöktürülmüş ve 5ml steril fizyolojik peptonlu suda çözündürülmüştür. Bakteri solüsyonu daha önce tanımlanan şekilde besine ilave edilmiştir. Kültürün besine ilavesinin ardından mikrobiyolojik sayım için 1ml örnek alınmış ve uygun dilisyonlarından 100er µl'si yayma plak yöntemi ile ekilmiştir.

Modelden alınan bütün örnekler eriyen buzun içinde toplanmış ve 60 dakika içinde Rogosa agarlı katı besiyerine ekilmiştir. Ekilen plaklar 37°C'de 48 saat boyunca anaerobik olarak inkübe edildikten sonra koloniler sayılmıştır.

Antimikrobiyal aktivite

Enterobakterlere karşı antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için T129 suşu ve pozitif kontrol olarak nisin ürettiği bilinen *Lactococcus lactis* TTC 03.0262 suşu 3µl'lik damlacıklar halinde MRS veya M17 (*L.lactis* suşu için) agarlı katı besiyerine ekilmiştir. 37°C'de anaerobik inkübasyon sonrası oluşan koloniler kloroform ile inaktive edildikten sonra, üzerlerine indikatör organizmalar ve negatif kontrol olarak T129 suşunun kendisini içeren yumuşak MRS agar (%0.75 agar içeren) dökülmüş ve

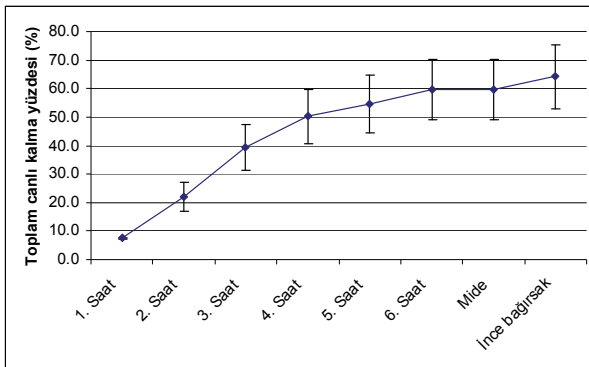
inkübasyona bırakılmıştır. 37°C’de anaerobik koşullarda 16 saat gece boyu inkübasyon sonrası oluşan inhibisyon zonlarının çapı ölçülerek antimikrobiyal aktivite belirlenmiştir.

Hesaplama ve istatistik

Bakterilerin canlı kalma yüzdeleri, sistemden çıkan canlı bakteri sayısının, sisteme beslenen öğündeki canlı bakteri sayısına oranlanması ile, koloni oluşturan birim (kob) bazında belirlenmiştir.

Bulgular ve Tartışma

TIM-1 modeli ile yapılan çalışma sonrası kullanılan sıvıların miktarı ölçülerek sisteme verilen sıvı miktarları tespit edilmiştir. Bulunan değer ile bilgisayarda okunan değerler bütün denemelerde uyumlu bulunmuş ve sistemin, bilgisayar kontrolü altında ilgili bölümlere gerekli çözeltileri fizyolojik koşullarda verdiği teyit edilmiştir. Bölümlerin pH’sı deney boyunca takip edilmiş ve fizyolojik koşullara uygun olarak belirlenen grafiği takip ettiği görülmüştür. Deney esnasında alınan saatlik örnekler ölçülerek sistemde öngörülen miktarlar ile karşılaştırılmış ve uyumlu oldukları tespit edilmiştir. Bu ölçümlerin uyumlu olması bilgisayar programına verilen geçiş hızlarının sistem tarafından doğru olarak uygulandığını belirlemiştir.



Şekil 1. *L. plantarum* T129 suşunun TIM-1 sistemindeki canlı kalma yüzdesi

TÜBİTAK *L. plantarum* T129 suşunun canlılığı %59.7±10.6 olarak belirlenmiştir. TÜBİTAK suşunun canlılığı Şekil 1’de verilmiştir. Suşun canlılığı fizyolojik koşullarda 240 dakikadan sonra düşüş göstermiştir. Bu düşüş daha önce yapılan çalışmalarda da gözlenmiştir. (Marteau ve ark.

1997). Ancak toplam canlı kalma oranı deneyin sonuna kadar artmaya devam etmiştir. Altı saatlik deney sonunda mide ve incebağırsak bölümlerinde kalan toplam bakteri sayısı toplam sayının %4.6±0.6’sı olmuştur. TIM-1 sisteminin *in vivo* canlı kalma yüzdeleri ile benzer canlılık değerleri verdiği daha önce yapılan karşılaştırmalı çalışmalar ile gösterilmiştir (Marteau ve ark. 1997). Farklı besin bileşimi ve mide boşaltım zamanları kullanılmış olsa da bu çalışmada zeytinden izole edilen *L. plantarum* T129 suşunun Marteau ve arkadaşlarının (1997) çalıştığı yoğurt bakterilerinden daha yüksek canlılığa sahip olduğu kesin olarak tespit edilmiştir. Suşun probiyotik olarak yoğurda ilave edilen *Bifidobacterium bifidum* ve *Lactobacillus acidophilus* suşları ile benzer canlı kalma oranlarına sahip olduğu tespit edilmiştir. (Marteau ve ark.1997)

Yayınlanmamış bir çalışmada iki *L. plantarum* suşunun aynı koşullardaki canlılıkları belirlenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda probiyotik olduğu bilinen bir *L. plantarum* suşunun canlı kalma oranı %61.3, bitkiden izole edilen bir *L. plantarum* suşunun canlılığı ise %32.1 olmuştur. *L. plantarum* T129 suşu, aynı koşullarda TIM-1 *in vitro* modelinde probiyotik etkisi bilinen bir *L. plantarum* suşuna yakın canlılık göstermiştir (TNO’dan alınan kişisel bilgi).

L. plantarum T129 suşunun antimikrobiyal aktivitesi de çalışılmıştır. *L. plantarum* T129 suşunun enterokoklara karşı antimikrobiyal aktivitesi Tablo 1’de verilmiştir. Buna göre, *L. plantarum* T129 suşunun test edilen enterokok suşlarından beşine karşı pozitif kontrolden daha etkili, diğer beş enterokok suşa karşı ise kontrole göre daha az etkili olduğu belirlenmiştir. Suşlar incelendiğinde, T129 suşunun antimikrobiyal aktivitesinin suş bazlı olduğu tespit edilmiştir.

L. plantarum türü görece fazla gene sahiptir ve pek çok farklı çevreye adapte olabileme yeteneğine sahiptir (de Vries ve ark. 2006). *L. plantarum* içeren sağlık ürünleri genellikle kapsül veya içecek olarak pazarlansa da pek çok fermente bitkisel ürün, süt ve et ürünlerinde bu bakterilere rastlamak mümkündür (de Vries ve ark. 2006). Bu özellik; *L. plantarum*’un zeytin dâhil pek çok fermente ürüne, ürün özellikleri değiştirilmeden kolayca adapte edilebilmesine yardımcı olacaktır.

Tablo 1. *L.plantarum* T129 suşunun enterokoklara karşı antimikrobiyal aktivitesi

Suş adı	Tür adı	TTC03.0262	T129
		<i>Lactococcus lactis</i> (pozitif kontrol), inhibisyon zon çapı (mm)	<i>Lactobacillus plantarum</i> inhibisyon zon çapı(mm)
TTC 98.0259	<i>Enterococcus faecalis</i>	3	5
TTC 99.0138	<i>Enterococcus hirae</i>	1.5	6
TTC 00.0173	<i>Enterococcus faecalis</i>	4	5
TTC 00.0251	<i>Enterococcus faecium</i>	3	0
TTC 00.0395	<i>Enterococcus faecalis</i>	5	2
TTC 00.0551	<i>Enterococcus faecium</i>	7	0
TTC 00.0632	<i>Enterococcus hirae</i>	2	0
2008.282	<i>Enterococcus faecalis</i>	1.5	10
2010.83	<i>Enterococcus pseudoavium</i>	6.5	0
2013.074	<i>Enterococcus faecium</i>	1.5	6
TTC 03.0262	<i>Lactococcus lactis</i>	0	-
T129	<i>L. plantarum</i> T129	-	0

L. plantarum'un uzun yıllardır insanlar tarafından güvenle tüketildiğine dair araştırmalar mevcuttur: *L. plantarum* 299v suşu ile Sprague-Dawley sıçanları üzerine yapılan bir çalışmada, damar yolu ile kanlarına *L. plantarum* 299v suşu enjekte edilen sıçanların kanlarında ve kalplerinde 96 saat sonra hiçbir *L. plantarum* hücresine rastlanmamıştır. Bu sonuç, *L. plantarum*'un bağırsak bariyerini geçse bile patojenik bir etki göstermeyeceğini göstermektedir (Adawi ve ark., 2002). *L.plantarum*'un farklı suşları yetişkin sağlıklı bireylerde farklı sağlık faydaları ile ilişkilendirilmiştir. Test edilen suşlar; dışkıdaki kısa zincirli yağ asitlerinde yükselme, fekal enterobakter sayımlarında altı kata kadar azalma ve LDL kolesterol ile fibrinojen miktarında düşüş ile ilişkilendirilmişlerdir (Johansson ve ark. 1998; Kingamkono ve ark. 1999, Naruszewicz ve ark. 2002).

L. plantarum T129 suşunun enterokok sayısını düşürebilme potansiyeli *in vitro* olarak gösterilmiş olup, *in vivo* çalışmalar ile bu etkinin teyit edilmesi gerekmektedir.

Kaynaklar

- Adawi, D., Molin, G., Ahrné, S., & Jeppsson, B. (2002). Safety of the probiotic strain *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 (= strain 299v) in an endocarditis animal model. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 14 (1), 50-53.
- Anonim, 2010. Zeytinyağı ve sofralık zeytin raporu, Sanayi ve Ticaret Bakanlığı.
- De Man, J.D., Rogosa, M., Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130-135.

Sonuç

Yapılan çalışmalarda farklı *L. plantarum* suşları farklı sağlık faydaları ile ilişkilendirilmiş ve bu çalışmada, *L. plantarum* T129 suşu TIM-1 *in vitro* sindirim sisteminde yüksek canlılık göstermiştir. Ancak *L. plantarum* T129 suşunun probiyotik etkisinin plasebo kontrollü çift kör çapraz klinik çalışmalar ile de gösterilmesi gerekmektedir. Bu suşun tuz direncinin artırılması ve sindirim sisteminden geçişinin iyileştirilmesi için tersine metabolik mühendislik çalışmaları da halen sürdürülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma, İstanbul Teknik Üniversitesi Doktora Tezlerini Destekleme Programı (proje no: 34418, yürütücü: Z.P. Çakar, doktora öğrencisi: T. Öztürk) ve AB FP7 NutraHealth projesi, (grant no. 316012, FP7/ REGPOT-2012-2013-1, yürütücü: Cesarettin Alaşalvar) tarafından desteklenmiştir.

- De Vries, M. C., Vaughan, E. E., Kleerebezem, M., & de Vos, W. M. (2006). *Lactobacillus plantarum* survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, 16 (9), 1018-1028.
- FAO/WHO (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food: Joint FAO/WHO Working Group meeting, London Ontario, Canada, 30 April-1 May 2002.
- International Olive Oil Council, 2011a. Olive oils production.
- International Olive Oil Council, 2011b. Table olives production.
- Johansson, M. L., Nobaek, S., Berggren, A., Nyman, M., Björck, I., Ahrne, S., & Molin, G. (1998). Survival of *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 (299v), and effect on the short-chain fatty acid content of faeces after ingestion of a rose-hip drink with fermented oats. *International Journal of Food Microbiology*, 42 (1), 29-38.
- Kingamkono, R., Sjögren, E., & Svanberg, U. (1999). Enteropathogenic bacteria in faecal swabs of young children fed on lactic acid-fermented cereal gruels. *Epidemiology and Infection*, 122 (01), 23-32.
- Lebeer, S., Claes, I. J., Verhoeven, T. L., Shen, C., Lambrichts, I., Ceuppens, J. L., & De Keersmaecker, S. C. (2008). Impact of luxS and suppressor mutations on the gastrointestinal transit of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (15), 4711-4718.
- Marteau, P., Minekus, M., Havenaar, R., & Huis In't Veld, J. H. J. (1997). Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *Journal of Dairy Science*, 80 (6), 1031-1037.
- Martinez, R.C., Aynaou, A.E., Albrecht, S., Schols, H.A., De Martinis, E.C., Zoetendal, E.G., Venema, K., Saad, S.M., and Smidt, H. (2011). *In vitro* evaluation of gastrointestinal survival of *Lactobacillus amylovorus* DSM 16698 alone and combined with galactooligosaccharides, milk and/or *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12. *International Journal of Food Microbiology* 149, 152-158.
- Minekus, M., Marteau, P., Havenaar, R., & Huis In't Veld, J. H. J. (1995). A multicompartamental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. *ATLA- Alternatives to Laboratory Animals*, 23 (2), 197-209.
- Naruszewicz, M., Johansson, M. L., Zapolska-Downar, D., & Bukowska, H. (2002). Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76 (6), 1249-1255.
- Papoff, C. M., Agabbio, M., Vodret, A., Farris, G. A., (1996). Influence of some biotechnological combinations on the sensory quality of manna green table olives. *Industria Alimentare*. 35: 375-381.
- Rivas, C. S., Espin, J. C., Wichers, H. J., (2000). Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80:1013-1023.

İLETİŞİM

Tarık Öztürk

İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Maslak, İstanbul, Türkiye

e-mail: tarik.ozturk@tubitak.gov.tr