



KOLESTEROL DÜŞÜRÜCÜ ETKİLERE SAHİP LACTOBACILLUS SPP. SUŞLARININ PEYNİRDE BAŞLATICI KÜLTÜR OLARAK KULLANIMI

Beste Fırıncioğulları*, Zübeyde Öner

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

Geliş / Received: 21.11.2021; Kabul / Accepted: 01.03.2022; Online baskı / Published online: 18.03.2022

Fırıncioğulları, B., Öner, Z. (2022). Kolesterol düşürücü etkilere sahip *Lactobacillus* spp. suşlarının peynirde başlatıcı kültür olarak kullanımı. GIDA (2022) 47 (2) 266-276 doi: 10.15237/gida.GD21141

Fırıncioğulları, B., Öner, Z. (2022). Use of *Lactobacillus* spp. strains with cholesterol-lowering effects as starter culture in cheese. GIDA (2022) 47 (2) 266-276 doi: 10.15237/gida.GD21141

ÖZ

Fermente süt ürünlerinde çok sayıda probiyotik mikroorganizma kullanılmaktadır. Bunlar içerisinde en yaygın olarak kullanılan laktik asit bakterileri (LAB), serum kolesterol seviyesinin düşürülmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada tulum peynirinden izole edilmiş *Lactobacillus* spp. suşlarının kolesterol asimilasyon yetenekleri belirlenmiş ve toplam kolesterol asimilasyonu %12.19 ile %68.22 arasında değişim göstermiştir. Kolesterol asimilasyon yeteneği yüksek olan LAB'ların safra ve asit dayanımları safra tuzu dekonjugasyonları incelenmiş ve MALDI TOF MS ile tanımlamaları yapılmıştır. Bunlar arasından seçilen mikroorganizmalarla başlangıç kültür kombinasyonları oluşturulmuş ve bu kombinasyonlardan peynir üretimleri gerçekleştirilmiştir. Peynir gruplarının 90 günlük depolama süresince ticari başlangıç kültürü ile üretilen kontrol peynirine kıyasla kolesterol asimilasyon yeteneklerindeki değişim HPLC ile aroma maddeleri üretimleri GC-MS ile belirlenmiştir. 90 günlük depolamanın sonunda kolesterol asimilasyonu 1. grup peynirde %52.85, 2. grup peynirde %33.12 ve kontrol peynirinde %30.02 olarak tespit edilmiştir. Çoğunlukla peynirde aroma maddesi olarak 2.3 bütandion, asetoin, asetik asit, kaprilik asit ve etanol olduğu belirlenmiştir. **Anahtar kelimeler:** Laktik asit bakterileri, *Lactobacillus* spp., probiyotikler, kolesterol, peynir

USE OF LACTOBACILLUS SPP. STRAINS WITH CHOLESTEROL-LOWERING EFFECTS AS STARTER CULTURE IN CHEESE

ABSTRACT

Many probiotic microorganisms are used in fermented dairy products. Lactic acid bacteria (LAB), which is the most widely used among these, plays an important role in lowering the serum cholesterol level. In this study, cholesterol assimilation abilities of the *Lactobacillus* spp. isolated from Tulum cheese were determined and total cholesterol assimilation percentages varied between 68.22% and 12.19%. Bile and acid resistance and bile salt deconjugation of LAB, which have high cholesterol assimilation ability, were examined and their definitions were made with MALDI TOF MS. Starter culture combinations were created with selected microorganisms and cheese were produced. The cholesterol assimilation abilities in cheese were determined by HPLC and aroma compounds production were determined by GC-MS during 90 days of storage. At the end of 90 days of storage, cholesterol assimilation was determined as 52.85% in 1st group cheese, 33.12% in 2nd group cheese and 30.02% in control cheese. It was determined 2.3 butanedione, acetoin, acetic acid, caprylic acid and ethanol as flavoring agents in cheese groups.

Keywords: Lactic acid bacteria, *Lactobacillus* spp., probiotics, cholesterol, cheese

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉: bestefrnc@gmail.com

☎: (+90) 530 945 3135

Beste Fırıncioğulları; ORCID no: 0000-0001-5209-6970

Zübeyde Öner; ORCID no: 0000-0003-2557-0731

GİRİŞ

Son yıllarda sağlığın beslenme ile korunması konusunda yapılan çalışmalar fonksiyonel gıda arayışına ve yeni ürünlerin gelişmesine neden olmaktadır. Diyetle alınan kolesterol miktarı ile koroner kalp rahatsızlıkları arasında ilişkinin tespit edilmesinden sonra kolesterolü gıda tüketimi azalmış ve kolesterolü düşük gıdaların üretimine yönelim olmuştur (Zhang vd., 2019). Yapılan bazı çalışmalarda serum kolesterolünde olan %1'lik azalmanın bile koroner kalp hastalık riskini %2-3 oranında azaltabileceğini göstermiştir (Liong ve Shah 2005; Albano vd., 2018). Dünya Sağlık Örgütü doymuş yağ, trans yağ, kolesterol ve tuz açısından yüksek olan gıdaların kardiyovasküler hastalıkları artırdığını bildirmiştir (Puska vd., 2011).

Uzun yıllardan beri laktik asit bakterilerinin (LAB) probiyotik olma özellikleri incelenmektedir. LAB'ların laktoz intoleransında iyileşme sağladığı, gastro intestinal sistemde bulaşıcı hastalıklara karşı direnç oluşturduğu ve daha iyi sindirime neden olduğu bilinmektedir (Clarke vd., 2012; Kanmani vd., 2013; Jeong vd., 2016). *Lactobacillus* türlerinin yanı sıra bazı mayalarında kolesterol seviyesini azaltıcı etkilere sahip olduğu çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir (Nguyen vd., 2007; Ooi ve Liong, 2010; Jitpakdee vd., 2020). Fermente bir süt ürünü olan peynir, kendine özgü özelliklerinin yanı sıra sağlık üzerine etki eden önemli bir LAB kaynağıdır. Özellikle süt ürünlerinde kolesterolü düşürmek için uygulanan kimyasal ve fiziksel işlemlere potansiyel bir alternatif olarak LAB'ları kullanma konusunda yapılan çalışmalar oldukça azdır (Albano vd., 2018). Fonksiyonel ürünlerin geliştirilmesi gıda sektörü için önemlidir. Ayrıca bu tip gıdaların üretilmesi süt endüstrisinde küresel pazarda yer bulması açısından da önemlidir.

Bu çalışmada, süt kökenli LAB'ların, kolesterol asimilasyon yetenekleri ile bu bakteriler tarafından kolesterol asimilasyonunda safra tuzu dekonjugasyonu etkisinin belirlenmesi hedeflenmiş ve kolesterol asimilasyon yeteneği bulunan LAB suşları ile başlangıç kültür kombinasyonları oluşturularak fonksiyonel beyaz peynir üretimi gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Süleyman Demirel Üniversitesi süt laboratuvarı kültür koleksiyonunda yer alan Tulum peynirinden izole edilmiş ve fenotipik tanımlamaları yapılmış 46 adet *Lactobacillus* türü bu çalışmada materyal olarak kullanılmıştır.

Kültürlerin aktifleştirilmesi

Araştırmada kullanılmak üzere seçilen suşlar ön aktifleştirmeye tabi tutulmuştur. Bu amaçla, MRS sıvı besiyerine (Sigma) inoküle edilen suşların anaerobik jar (Merck) içerisinde Anaerocult A (Merck) ile 37°C'de 24 saat inkübe edilerek gelişmeleri sağlanmıştır.

Başlatıcı kültür olarak seçilen suşlar steril koşullar altında Skim Milk (%11) besiyerine inoküle edilmiş ve peynir üretiminde kullanılmış olan başlatıcı kültürler elde edilmiştir.

Mikroorganizmaların kolesterol asimilasyonunun belirlenmesi

İzolatların kolesterol asimile etme yetenekleri Rudel ve Morris (1973) tarafından açıklanan yöntemlere göre yapılmıştır. 150mg/L oranında kolesterol (Sigma) içeren MRS-THİO sıvı besiyerine 18 saatlik aktif kültürden %1 oranında aşılama yapılmış ve 24 saat süresince 37°C'de anaerobik şartlarda (anaerobik jar içerisinde anaerocult A kiti ıslatılarak hazırlanan ortamda) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücreler 10 dakika 12.000×g' de 1°C'de santrifüj edilmiştir. Aynı miktarda destile su pelet üzerine ilave edilerek tekrar süspansiyon haline getirilmiştir. Her bir örnekten 0.5 mL temiz bir test tüpüne alınmış ve üzerine önce 3 mL %95'lik etanol sonra 2 mL %50'lik potasyum hidroksit ilave edilmiş ve tüpler karıştırılmıştır. Tüpler 10 dakika 60°C'lik su banyosuna tutulmuştur. Soğuduktan sonra üzerlerine 5 mL hekzan ilave edilmiştir. Tüp karıştırıcıda 20 saniye süre ile 5 kez karıştırılmış ve üzerine 3 mL destile su ilave edilerek karıştırma işlemi tekrarlanmıştır. Tüpler 15 dakika oda sıcaklığında faz ayrımı için bekletilmiştir. Her bir tüpteki hekzan 60°C'de evapore edilmiş ve hekzan uçurulmuştur. Tüplerin üzerilerine mililitresinde 0.5 mg *o-phthalaldehyde* olacak asetik asitte hazırlanan 4 mL *o-phthalaldehyde* (Sigma) çözeltisi

ilave edilmiştir. Tüpler 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve 2 mL konsantre sülfürik asit yavaşça tüpün kenarından ilave edilmiş ve tüp karıştırıcıda tekrar karıştırılmıştır. 40°C su banyosunda bekletilen tüplerin 550 nm'de kontrole (su) karşı Shimadzu UV-1601 model spektrofotometrede okunması yapılmıştır. Absorbans değerleri kolesterol miktarını belirlemek amacıyla standart kurve ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar µg/mL olarak belirtilmiştir. Aynı işlemler 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 µg kolesterol içeren örneklerde de uygulanarak standart kurve çizilmiştir.

Kolesterolü azaltma yüzdesi aşağıdaki formülden hesaplanmıştır:

$$(1) A=100-[(B/C)\times 100],$$

A=yüzde kolesterolü azaltma oranı,

B=hücreleri içeren kısımda kolesterol miktarı (µg),

C=hücreleri içermeyen kısımdaki kolesterol miktarı (µg) (Öner ve Aloglu, 2005).

Mikroorganizmaların asit toleransının belirlenmesi

Kolesterol asimile etme oranları yüksek olduğu belirlenen suşların asit toleransı Pereira ve Gibson (2002)'de belirtilen yöntemle analiz edilmiştir.

Mikroorganizmaların safra tuzuna dayanıklılık testi

Seçilen LAB'nin safra tuzuna dayanıklılık testi Walker ve Gilliland (1993)'de belirtilen yöntemle gerçekleştirilmiştir.

Mikroorganizmaların safra tuzlarını dekonjuge etme özelliklerinin belirlenmesi

Seçilen LAB'ın safra tuzlarını dekonjuge etme özelliklerinin belirlenmesinde safra tuzu içeren MRS agarların (Sigma) hazırlanması için taurokolik asitin (TCA) ve glikolik asitin (GCA) sodyum tuzları (Sigma) 1 mM olacak şekilde %0.3 safra tuzu içeren MRS agara (Sigma) ayrı ayrı ilave edilmiştir. Ek olarak 0.37 g/L CaCl₂ ilave edilmiştir. Kontrol besiyerine safra tuzu ilave edilmemiştir. 10 µL damla kültür yöntemi ile ekim yapılmıştır. 37°C'de 72 saat süresince anaerobik olarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında

opak tanecikli beyaz kolonilerin etraflarında zon oluşturma özelliklerine göre değerlendirme yapılmıştır.

Mikroorganizmaların MALDI-TOF MS biotyper sistemi ile identifikasyonu

Kolesterol asimile etme yüzdeleri yüksek olan 15 adet izolatin kütle spektrometrik analizi Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Endüstriyel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezinde yapılmıştır. Analiz için MALDI TOF/TOF-MS Biotyper System (Bruker Autoflex Speed) kullanılmıştır.

Peynir üretimi

Peynirler, Isparta Cebeci Süt ve Süt Ürünleri fabrikasında pastörize inek sütünden üretilmiştir. Lb3, Lb9 ve Lb16 kodlu izolatlardan 1. başlatıcı kültür kombinasyonu, *L. plantarum* Lb25, *L. paracasei* Lp5 ve *L. paracasei* Lp6 kodlu izolatlardan ise 2. başlatıcı kültür kombinasyonu oluşturulmuş ve 1.grup ve 2. grup peynir üretimlerinde kullanılmıştır. Çalışmada kontrol grup peynir örnekleri için başlatıcı kültür olarak Chr. Hansen firmasına ait proteolitik aktivitesi yüksek olan White Classic 200 (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) ve proteolitik aktivitesi düşük olan R 608 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis*) kullanılmıştır.

Peynirde kolesterol tayini

Peynirdeki kolesterol analizinde ters faz Shimadzu LC-20 AT serisi HPLC, Zorbax 300 SB-C8 monomerik kolon (250 x 9,4 mm i.d., 6.5 µm partikül büyüklüğü, 300 A0 por çapı, Agilent, Waldbronn, Almanya) cihazı kullanılmıştır. Albuquerque vd. (2016), çalışmalarında kullandığı yöntem uygulanmıştır. Kolesterol tanımlaması, kolesterol standardının alıkonma süresi ve UV spektrumuna göre yapılmıştır. Daha sonra pik alan hesaplamaları dikkate alınarak kolesterol azalma oranları hesaplanmıştır.

Peynirlerde GC-MS ile aroma maddelerinin belirlenmesi

Deneme peynir gruplarının uçucu bileşenlerinin belirlenmesi SPME sistemi kullanılarak Gaz Kromatografisi Kütle Spektroskopisi (GC-MS) ile

Süleyman Demirel Üniversitesi Yenilikçi Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır. Analiz için, Gaz Kromatografisi Kütle Spektroskopisi (GC-MS) Shimadzu GC-2010 Plus Shimadzu GC-MS QP2010 SE kullanılmıştır. Kolon dedektör sıcaklığı 250°C'dir. Fırın sıcaklığı 40°C de 2 dakika bekletildikten sonra her dakikada 4°C artırılarak 250°C'de 5 dakika bekletilerek analiz gerçekleştirilmiştir.

İstatiksel değerlendirme

Çalışmada üzerinde durulan özellikler bakımından elde edilen sonuçlar faktöriyel düzende tekrarlanan ölçümlü varyans analizi tekniği ile Minitab 16 programı kullanılarak analiz edilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Materyal olarak kullanılan ve fenotipik yöntemlerle tanımlamaları yapılan 46 adet LAB'nin kolesterol asimile etme yetenekleri incelenmiştir. Kolesterol asimilasyon oranları yüksek olarak belirlenen 15 adet laktobasilin asit ve safra dayanımları ve ayrıca safra tuzu dekonjugasyon özellikleri belirlenmiştir. Laktobasiller arasından seçilen 6 adet laktobasilden 2 farklı başlatıcı kültür kombinasyonları oluşturulmuş ve peynir üretimleri gerçekleştirilmiştir. 90 günlük depolamanın sonunda peynir gruplarının kolesterol asimilasyon değerleri ve aroma bileşenleri incelenmiştir.

Kolesterol asimilasyonunun belirlenmesi

Tulum peynirinden izole edilmiş olan 46 adet *Lactobacillus* spp. suşunun kolesterol asimilasyon oranları Çizelge 1'de verilmiştir. 46 laktobasil içerisinden 20 adetinin kolesterol asimilasyon değerleri %45'ten büyük bulunmuştur. 20 laktobasil içerisinden seçilen 15 adedi MALDI TOF MS ile tanımlamaları yapılmış ve 5 adedi *Lacticaseibacillus paracasei*, 10 adedi ise *Lactiplantibacillus plantarum* olarak belirlenmiştir. *Lactobacillus* cinsi bakterilerin farklı suşları üzerine çeşitli çalışmalarda genellikle bu bakterilerin kolesterol asimilasyon yeteneği olduğu gözlemlenmiştir. Ancak Çizelge 1'de de görüldüğü gibi bazı bakterilerin kolesterol asimilasyon oranları düşük bulunmuştur. Sonuç olarak *Lactobacillus* cinsi bakterilerin kolesterol asimilasyon oranları suş düzeyinde değişkenlik

göstermiştir. Yapılan istatistik analiz sonucunda bakterilerin, kolesterol asimile etme yetenekleri arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P < 0.01$).

Choi vd. (2015a), LAB'nin kolesterol azaltıcı etkisini incelemek üzerine yapmış oldukları bir çalışmada, *L. plantarum* EM, *L. sakei* DC1, *L. acidophilus* ATCC 43121 suşları arasından en yüksek kolesterol asimilasyonunun sırasıyla *L. plantarum* EM (%88.12), *L. acidophilus* ATCC 43121 (%80.69), *L. sakei* DC1 (%6.44) olduğunu gözlemlenmişlerdir. Abushelaibi vd. tarafından (2017), deve sütünden izole edilen LAB'nin kolesterol asimilasyonu incelenmiştir. Çalışma sonucunda *L. lactis* KX881768, *L. plantarum* KX881772, *L. lactis* KX881782 ve *L. plantarum* KX881779'un %30'un üzerinde kolesterol azaltıcı etki sergilediği belirlenmiştir. Yapılan bir başka çalışmada *L. plantarum* CAAS 18008 suşu kolesterol asimilasyon yetenekleri açısından incelenmiş ve toplam kolesterolü %21.7 düşürdüğü gözlemlenmiştir (Ma vd., 2019). Öner ve Aslım (2012) tarafından, 20 adet *Lactobacillus* cinsi bakterilerin kolesterol asimilasyon oranları incelenmiştir. Çalışma sonucunda bakterilerin besi ortamındaki kolesterolü asimile oranlarının %4.8 ile %22.5 arasında olduğu gözlemlenmiştir. Farklı türler arasındaki en yüksek kolesterol asimilasyonuna sahip suşun *L. plantarum* GD2 (%23.1±0.3) olduğu belirlenmiştir.

Asit toleransı bulguları

Mikroorganizmaların asidik ortama dirençleri probiyotik olma özelliklerinin başında gelir. Midenin pH değerinin 2.0 civarında olması nedeni ile mikroorganizmaların bu asitliğe dayanmaları önemlidir. Bu nedenle düşük pH'ya dayanma sürelerini belirlemek için in vitro tolerans testleri yapılmalıdır (Castorena-Alba vd., 2017).

Çalışmamızda kolesterol asimilasyonu yüksek olan suşlar arasından seçilen 15 adet mikroorganizmanın pH 2'de gelişme durumları incelenmiştir. 15 adet mikroorganizma içerisinden 7 adedi 120 dakikalık inkübasyon süresinde canlılıklarını yitirirken 8 adedi canlılığını sürdürmüştür. 120 dk sonunda en yüksek canlı bakteri sayısı %91.8 ile *L. plantarum* Lb9 suşunda tespit edilmiştir. *L. plantarum* Lp4, *L. plantarum*

Lp5, *L. plantarum* Lb36'nın pH 2'de 120 dakikalık inkübasyon sonunda sırasıyla %87.87, %78.88 ve %68.22 canlılık gösterdiği belirlenmiştir. Huang vd. (2013) tarafından verilen literatür verileri

çalışma sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Çizelge 2'de mikroorganizmaların pH 2.0'ye karşı 0., 1. ve 2. saat sonundaki gelişme durumları verilmiştir.

Çizelge 1. MRS THIO sıvı besiyerinde azalan kolesterolün ölçüm bulguları
Table 1. Measurement findings of decreased cholesterol in MRS THIO broth

| LAB | Azalan Kolesterol Reduced Cholesterol (%) | LAB | Azalan Kolesterol Reduced Cholesterol (%) |
|------|--|------|--|
| Lb1 | 29.80±0.77 | Lb20 | 30.81±0.82 |
| Lb2 | 50.20±0.77 | Lb21 | 36.58±1.68 |
| Lb3 | 49.21±1.41 | Lb22 | 36.58±1.68 |
| Lp1 | 56.71±0.63 | Lb23 | 39.13±0.58 |
| Lb4 | 27.61±0.03 | Lb24 | 43.49±0.22 |
| Lb5 | 44.37±1.35 | Lb25 | 51.89±0.67 |
| Lb6 | 56.48±1.20 | Lb26 | 68.22±0.20 |
| Lb7 | 37.26±0.81 | Lb27 | 25.47±1.61 |
| Lb8 | 58.36±1.41 | Lp5 | 65.55±0.33 |
| Lb9 | 52.92±0.77 | Lb28 | 12.19±1.22 |
| Lb10 | 27.32±0.91 | Lb29 | 29.89±0.92 |
| Lb11 | 14.72±2.12 | Lb30 | 44.94±0.86 |
| Lb12 | 13.34±1.12 | Lb31 | 40.02±0.80 |
| Lb13 | 44.38±1.58 | Lp6 | 49.86±0.52 |
| Lb14 | 52.59±0.94 | Lb32 | 21.87±1.95 |
| Lb15 | 25.56±1.08 | Lb33 | 49.83±1.01 |
| Lp2 | 45.55±1.10 | Lb34 | 19.16±0.85 |
| Lp3 | 53.39±1.18 | Lb35 | 45.68±0.81 |
| Lb16 | 63.66±1.90 | Lb36 | 51.85±0.57 |
| Lp4 | 63.05±1.92 | Lb37 | 50.24±0.42 |
| Lb17 | 41.82±0.79 | Lb38 | 52.17±0.55 |
| Lb18 | 41.20±1.23 | Lb39 | 28.86±0.44 |
| Lb19 | 37.04±0.31 | Lb40 | 41.30±1.05 |

Safra toleransı bulguları

Probiyotik bakterilerin safra varlığında canlılığını koruyabilmesi önemli bir özelliktir. Kolesterol asimilasyonu yüksek olan suşlar arasından seçilen 15 adet mikroorganizmanın hepsi safraya yüksek dayanım göstermiştir (Çizelge 3).

Yapılan bir çalışmada, *L. plantarum* P25Lb1 suşu, %0.3 safra konsantrasyonundaki direnci test edilmiştir. Çalışmada sonucunda P25Lb1 izolatu 4 saatlik inkübasyondan sonra %97 canlılık göstermiştir (Ait Seddik vd., 2017). Kahraman vd.

(2020), sağlıklı bireylerin dışkı örneklerinden izole ettikleri 82 suşun probiyotik olma özelliklerini incelemişlerdir. Yapılan çalışmada %0.3 safra tuzuna dayanımın incelenmesi sonucunda, suşların tamamının canlılıklarını koruyabildiği tespit edilmiştir. 82 suştan 77 adedi (%94), %0.3 safra tuzuna karşı yüksek dayanım, diğerlerinin ise düşük dayanım gösterdiği gözlemlenmiştir. Çalışmamızda kolesterol asimilasyon oranı yüksek olan suşlardan seçilen 15 suştan 15 adedinin de (%100) safra tuzuna karşı yüksek dayanım gösterdiği gözlemlenmiştir.

Çizelge 2. Mikroorganizmaların pH 2'de gelişme durumları (log kob/mL)
 Table 2. Development status of microorganisms at pH 2 (log cfu/mL)

| Bakteriler <i>Bacteria</i> | 0. dk <i>0. min</i> | 60. dk <i>60. min</i> | 120. dk <i>120. min</i> | 0-120. dk'da dayanma oranları <i>Resistance rates at 0- 120 min (%)</i> |
|-------------------------------|------------------------|--------------------------|----------------------------|---|
| Lb3 | 8.17±0.07 | 7.79±0.02 | 5.00±0.07 | 61.19 |
| Lp1 | 7.80±0.13 | 7.24±0.05 | 0 | 0 |
| Lb6 | 7.49±0.13 | 6.96±0.01 | 0 | 0 |
| Lb8 | 7.89±0.22 | 7.36±0.02 | 0 | 0 |
| Lb9 | 7.81±0.11 | 7.58±0.01 | 7.17±0.02 | 91.80 |
| Lb14 | 7.53±0.12 | 3.35±0.07 | 0 | 0 |
| Lp3 | 7.23±0.08 | 6.50±0.04 | 0 | 0 |
| Lb16 | 8.19±0.21 | 7.26±0.02 | 3.28±0.01 | 40.04 |
| Lp4 | 8.00±0.09 | 7.64±0.03 | 7.03±0.01 | 87.87 |
| Lb25 | 7.79±0.28 | 7.43±0.07 | 3.22±0.07 | 41.33 |
| Lb26 | 6.45±0.11 | 4.92±0.05 | 0 | 0 |
| Lp5 | 7.91±0.14 | 7.61±0.05 | 6.24±0.09 | 78.88 |
| Lp6 | 7.56±0.14 | 2.61±0.03 | 0 | 0 |
| Lb36 | 7.93±0.11 | 7.30±0.03 | 5.41±0.19 | 68.22 |
| Lb38 | 8.39±0.11 | 7.87±0.26 | 5.30±0.01 | 63.17 |

Çizelge 3. Mikroorganizmaların %0.3 safra varlığında gelişme durumları (log kob/mL)
 Table 3. Development status of microorganisms in the presence of 0.3% bile (log cfu/mL)

| Bakteriler <i>Bacteria</i> | 0. saat <i>0. hour</i> | 3. saat <i>3. hour</i> | 6. saat <i>6. hour</i> |
|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Lb3 | 6.02 | 6.53 | 6.77 |
| Lp1 | 7.19 | 7.31 | 8.17 |
| Lb6 | 6.77 | 7.30 | 7.87 |
| Lb8 | 7.09 | 7.31 | 8.09 |
| Lb9 | 6.92 | 6.87 | 7.31 |
| Lb14 | 6.98 | 7.62 | 8.05 |
| Lp3 | 6.83 | 7.06 | 7.22 |
| Lb16 | 7.17 | 6.95 | 8.15 |
| Lp4 | 7.00 | 7.57 | 7.58 |
| Lb25 | 7.26 | 7.38 | 7.69 |
| Lb26 | 7.19 | 7.38 | 7.43 |
| Lp5 | 7.15 | 7.71 | 7.92 |
| Lp6 | 7.00 | 8.06 | 7.61 |
| Lb36 | 6.77 | 6.74 | 8.24 |
| Lb38 | 7.19 | 7.51 | 8.06 |

Safra tuzu dekonjugasyon bulguları

Birçok probiyotik mikroorganizma, glisin veya taurin ile bağlantılı safra tuzlarının dekonjugasyonunu katalize eden safra tuzu hidrolaz (BSH) enzimini üretme yeteneğine sahiptir. BSH enzimi ile kolesterol asimilasyonu arasında bir ilişki olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Bhat ve Bajaj, 2020; Hernández-Gómez vd., 2021). Probiyotik laktobasillerin safra tuzlarını BSH enzimi ile serbest asitlere parçalayıp konjuge safra tuzlarını intestinal sistemden daha hızlı uzaklaştırdıkları ve böylece kolesterol konsantrasyonunu düşürdükleri yönünde hipotezler mevcuttur (Choi vd., 2015b). Aktif BSH içeren LAB'ların veya bunları içeren ürünlerin, konakçı safra tuzu metabolizması ile etkileşim yoluyla kolesterol seviyelerini düşürdüğü de öne sürülmüştür. BSH aktivitesine sahip laktobasillerin, enterohepatik döngünün meydana geldiği alt ince bağırsakta hayatta kalma ve kolonileşme avantajı vardır ve bu nedenle BSH aktivitesi, önemli bir kolonizasyon

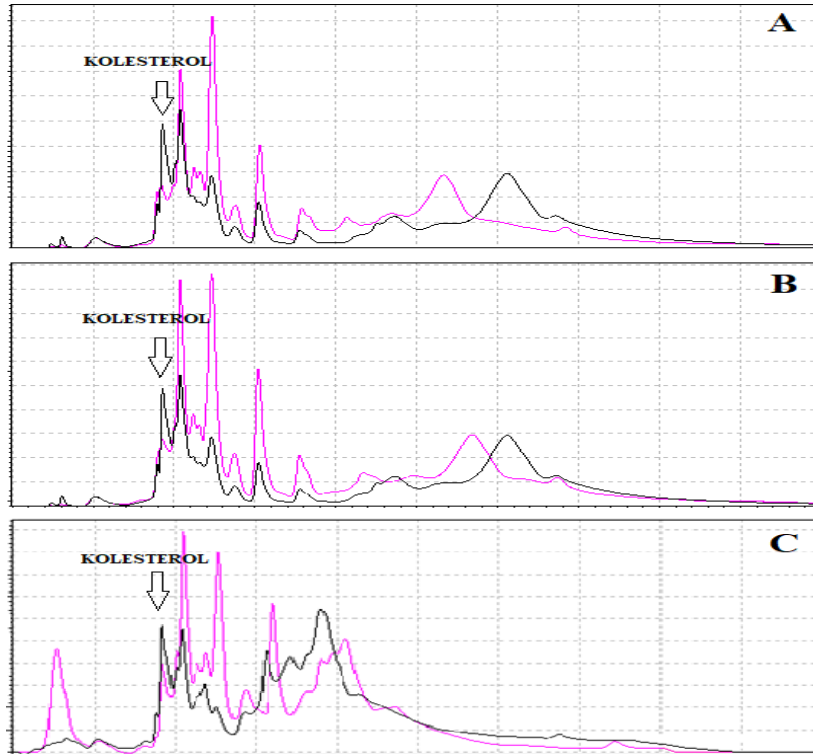
faktörü olarak düşünülmektedir (Kumar vd., 2012).

Hernández-Gomez vd. (2021), krem peynirden izole edilen potansiyel olarak probiyotik bir suş olan *L. plantarum* DGIA1'un sodyum glikolat ve taurokolat varlığında sırasıyla %69 ve %81 dekonjugasyon aktiviteleri gösterdiğini bildirmiştir.

Çalışmada kolesterol asimilasyonu yüksek olan 15 adet bakterinin hepsinin BSH aktivitelerinin olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonuçları literatürdeki diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Peynirlerde kolesterol oranları

Seçilmiş suşlarla üretilmiş olan peynirlerin kolesterol kromatogramları Şekil 1'de verilmiştir. Peynirlerde % kolesterol asimilasyonları % pik alanlarına göre hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4'de verilmiştir.



Şekil 1. Peynir örneklerinde 1. ve 90. günde belirlenen HPLC kromatogramları

Figure 1. HPLC chromatograms determined on the 1st and 90th days in the cheese samples

Siyah pik: 1. gün, pembe pik: 90. gün, A: 1. grup, B: 2. grup, C: Kontrol grup
Black peak: 1st day, Pink peak: 90th day, A: 1st group, B: 2nd group, C: Control group

Çizelge 4. Peynir örneklerinin kolesterol asimilasyon oranları
 Table 4. Cholesterol assimilation rates in cheese samples

| Peynir Örnekleri <i>Cheese samples</i> | Depolama süresi (gün) <i>Storage time (day)</i> | Alıkonma Zamanı (dk) <i>Retention time (min)</i> | Alan <i>Area</i> (%) | Asimilasyon <i>Assimilation</i> (%) |
|---|---|--|----------------------------|---|
| 1. grup <i>1. group</i> | 1 | 4-5 | 6.77 | 52.85 |
| | 90 | 4-5 | 3.19 | |
| 2. grup <i>2. group</i> | 1 | 4-5 | 7.42 | 33.12 |
| | 90 | 4-5 | 4.96 | |
| Kontrol grup <i>Control group</i> | 1 | 4-5 | 6.25 | 30.02 |
| | 90 | 4-5 | 4.37 | |

Pisano vd. (2020), probiyotik suşlar içeren farklı mikrobiyel kültür kombinasyonları kullanarak pastörize koyun sütünden üretilen probiyotik Caciotta peynirleri ve ticari başlangıç kültür kullanarak üretilen kontrol peynirin olgunlaşma süresince peynirlerin kolesterol, α -tokoferol ve yağ asidi bileşimleri HPLC-DAD/ELSD teknikleri ile karakterize etmiştir. Çalışmanın sonucunda probiyotik peynir örneklerinin kontrol peynir örneğine göre daha düşük kolesterol içerdiği gözlenmiştir. Bir başka çalışmada 58 potansiyel probiyotik LAB, in vitro sindirimde canlı kalma, kolesterol ve safra asitleri içeren bir ortamda kolesterolü azaltma yetenekleri açısından incelenmiştir. En iyi performans gösteren suşlar (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *E. faecium* ve *E. lactis*) besiyerinde kolesterol seviyesini %42 ila %55 oranında azaltmış ve peynir üretiminde kullanılmıştır. Sonuç olarak tüm peynirlerdeki kolesterol içeriğinin en yüksek %23'e kadar azaldığı gözlemlenmiştir. Araştırmacılar LAB suşlarının peynirde, besiyeri ortamına göre daha düşük bir kolesterol azaltma yeteneği gösterdiğini bildirmiştir (Albano vd., 2018).

GC-MS ile peynirlerdeki aroma maddelerinin belirlenmesi

Peynirlerin karakteristik aroması, peynir üreticileri için özellikle önemli olan bir kalite bileşenidir. LAB'ların lipolitik ve proteolitik aktiviteleri, peynirin olgunlaştırılması sırasında karakteristik tat, aroma ve tekstürün oluşuna katkıda bulunmaktadır (Turhan ve Öner, 2012). Bu nedenle, gıdadaki uçucu bileşiklerin varlığı, içeriği ve bileşimi, kalitesi üzerinde önemli bir etkiye

sahiptir. Peynir çeşidinin aroması, olgunlaşma sürecinde süt yağı, protein ve karbonhidratlardan kaynaklanan uçucu ve uçucu olmayan kimyasal bileşikler arasındaki karmaşık dengenin sonucudur (Delgado vd., 2011).

GC-MS ile peynir gruplarında 6 adet asit, 6 adet keton, 3 adet aldehit, 1 adet alkol, 9 adet terpen olmak üzere toplam 25 adet aroma bileşiği tespit edilmiştir. Aromatik bileşiklerden asetik asit, kaprilik asit ve asetoin bileşikler olgunlaşma sürecinin tüm aşamalarında tespit edilmiştir. Ancak asetik asit miktarı kontrol peynirinde diğer peynirlere kıyasla depolama boyunca azalmıştır. Kaprilik asit miktarında ise 2. grup peynirinde depolama boyunca artış gözlenirken kontrol grup ve 1. grup peynirlerde depolama süresince azalma gözlenmiştir. Asetoin miktarında ise kontrol peynirinde depolama süresince azalma görülürken 1. ve 2. grup peynirlerde depolama boyunca artış gözlenmiştir. 2.3 bütandion oranı kültür kombinasyonu eklenen peynirlerde depolama ile birlikte arttığı gözlemlenirken kontrol peynirinde depolama boyunca azaldığı tespit edilmiştir. Hazırlanan kültür kombinasyonları ile üretilen 1. ve 2. grup peynirlerin ticari başlangıç kültür kullanılarak üretilen kontrol gruba göre daha fazla aroma bileşiği içerdiği gözlemlenmiştir.

Sezen Demirci vd. (2012), inek, koyun ve keçi sütünden üretilen peynirlerin aroma profillerinin belirlenmesi üzerine çalışmıştır. Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi analizleri sonucu inek beyaz peynirinde; 6 adet ester, 7 adet keton, 5 adet aldehit, 16 adet alkol; asidik fazda 9

adet asidik bileşik olmak üzere toplam 43 tane bileşik tespit edilmiştir. Capozzi vd. (2020), Headspace-Solid Phase Microextraksiyon-Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometrisi (HS-SPME GC-MS) ve Proton-Transfer Reaksiyonu Kütle Spektrometrisi (PTR-ToF-MS) ile bir İtalyan peyniri olan Mascarpone peynirinin uçucu bileşenlerini tespit etmiştir. Sonuç olarak peynirde farklı kimyasal sınıflara ait toplam 27 bileşik (dokuz keton, beş alkol, dört asit, üç hidrokarbon, iki furan, bir ester, bir lakton, bir aldehit ve bir oksim) tanımlanmıştır. Yapılan bir çalışmada probiyotik kültür *L. plantarum* B ve *L. lactis* spp. *lactis* S1'eklenerek ve kültür kullanılmadan peynir üretilmiş, bu peynirler arasında *L. plantarum* B ve *L. lactis* spp. *lactis* S1'in eklenen peynirlerin, kontrol peynire göre daha iyi duyuşsal özelliklere ve uçucu aromatik bileşiklerin kimyasal profiline sahip olduğu tespit edilmiştir (Kostelac vd., 2020).

SONUÇ

Yapılan bu çalışma ile laktobasillerin kolesterol asimile etme yeteneklerinin olduğu ve bunların probiyotik özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. 49 adet bakteri arasından seçilen 5 adet *L. paracasei* ve 10 adet *L. plantarum*'un başlatıcı kültür olabilme özelliğine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ticari başlatıcı kültürlerle üretilen kontrol grubuna göre oluşturduğumuz kültür kombinasyonlarının kolesterol asimilasyon oranlarının daha yüksek olduğu belirlenmiş ve peynirde daha fazla aroma bileşenlerinin olduğu tespit edilmiştir. Bu mikroorganizmaların kullanılması ile fonksiyonel farklı gıdalarda üretilebilecektir. Ancak bu mikroorganizmaların hipokolesterolemik etkisinin belirlenmesi için in vivo çalışmalara ihtiyaç vardır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından FYL-2020-7469 no'lu proje ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı teşekkür ederiz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar, bu çalışmada başka kişi ya da kurum ve kuruluşlar ile bir çıkar çatışması olmadığını bildirmektedirler.

YAZAR KATKILARI

Zübeyde Öner, araştırmanın planlamasını yapmış, Beste Fıncioğulları laboratuvar çalışmalarını gerçekleştirmiştir. Yazarlar, ortak çalışma sonucu makaleyi yayına hazırlamışlardır.

KAYNAKLAR

Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., El-Tarabily, K., Shah, N. P., Ayyash, M. (2017). Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *LWT-Food Science and Technology*, 79: 316–325. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.041>

Ait Seddik, H., Bendali, F., Cudennec, B., Drider, D. (2017). Anti-pathogenic and probiotic attributes of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum* strains isolated from feces of Algerian infants and adults. *Research in Microbiology*, 168(3): 244–254. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.12.003>

Albano, C., Morandi, S., Silveti, T., Casiraghi, M. C., Manini, F., Brasca, M. (2018). Lactic acid bacteria with cholesterol-lowering properties for dairy applications: In vitro and in situ activity. *Journal of Dairy Science*, 101(12): 10807–10818. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15096>

Albuquerque, T. G., Oliveira, M. B. P. P., Sanches-Silva, A., Costa, H. S. (2016). Cholesterol determination in foods: Comparison between high performance and ultra-high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 193: 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.109>

Bhat, B., Bajaj, B. K. (2020). Multifarious cholesterol lowering potential of lactic acid bacteria equipped with desired probiotic functional attributes. *3 Biotech*, 10(5), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02183-8>

Capozzi, V., Lonzarich, V., Khomenko, L., Cappellin, L., Navarini, L., Biasioli, F. (2020). Unveiling the Molecular Basis of Mascarpone Cheese Aroma: VOCs analysis by SPME-GC/MS and PTR-ToF-MS. *Molecules*, 25(5): 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules25051242>

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. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1335347>
- Choi, E. A., Chang, H. C. (2015a). Cholesterol-lowering effects of a putative probiotic strain *Lactobacillus plantarum* EM isolated from kimchi. *LWT- Food Science and Technology*, 62(1): 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.019>
- Choi, S. B., Lew, L. C., Yeo, S. K., Parvathy, S. N., Liong, M. T. (2015b). Probiotics and the BSH-related cholesterol lowering mechanism: A Jekyll and Hyde scenario. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(3): 392–401. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.889077>
- Clarke, G., J. F. Cryan, T. G. Dinan, and E. M. Quigley. (2012). Review article: Probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome Focus on lactic acid bacteria. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 35:403–413. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04965.x>
- Delgado, F. J., González-Crespo, J., Cava, R., Ramírez, R. (2011). Formation of the aroma of a raw goat milk cheese during maturation analysed by SPME-GC-MS. *Food Chemistry*, 129(3): 1156–1163. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.096>
- Hernández-Gómez, J. G., López-Bonilla, A., Trejo-Tapia, G., Ávila-Reyes, S. V., Jiménez-Aparicio, A. R., Hernández-Sánchez, H. (2021). In vitro bile salt hydrolase (Bsh) activity screening of different probiotic microorganisms. *Foods*, 10(3): 1–10. <https://doi.org/10.3390/foods10030674>
- Huang, Y., Wang, X., Wang, J., Wu, F., Sui, Y., Yang, L., Wang, Z. (2013). *Lactobacillus plantarum* strains as potential probiotic cultures with cholesterol-lowering activity. *Journal of Dairy Science*, 96(5), 2746–2753. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6123>
- Jeong, J. H., C. Y. Lee, and D. K. Chung. (2016). Probiotic lactic acid bacteria and skin health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56:2331–2337. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.834874>
- Jitpakdee, J., Kantachote, D., Kanzaki, H., Nitoda, T. (2020). Selected probiotic lactic acid bacteria isolated from fermented foods for functional milk production: Lower cholesterol with more beneficial compounds. *LWT- Food Science and Technology*, 135(2021), 110061. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110061>
- Kahraman, M., Karahan Çakmakçı, A. G., Terzioğlu, M. E. (2020). Probiyotik Özellik gösteren bazı Laktik Asit Bakterileri ve Mayaların Tümör Baskılayıcı Etkilerinin Araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi, Isparta, Türkiye, 198 s.
- Kanmani, P., R. Satish Kumar, N. Yuvaraj, K. A. Paari, V. Pattuku-mar, and V. Arul. (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>
- Kostelac, D., Vrdoljak, M., Markov, K., Delaš, I., Jug, T., Kljusurić, J. G., Jakopović, Ž., Čanak, I., Jelić, M., Frece, J. (2020). SPME-GC-MS and multivariate analysis of sensory properties of cheese in a sack matured with probiotic starter cultures. *Food Technology and Biotechnology*, 58(2), 128–137. <https://doi.org/10.17113/ftb.58.02.20.6439>
- Kumar, M., Nagpal, R., Kumar, R., Hemalatha, R., Verma, V., Kumar, A., Chakraborty, C., Singh, B., Marotta, F., Jain, S., Yadav, H. (2012). Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Experimental Diabetes Research*, 2012: 1–14. <https://doi.org/10.1155/2012/902917>
- Liong, M. T., and N. P. Shah. (2005). Optimization of cholesterol removal by probiotics in the presence of prebiotics by using a response surface method. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:1745–1753. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1745-1753.2005>
- Ma, C., Zhang, S., Lu, J., Zhang, C., Pang, X., Lv, J. (2019). Screening for cholesterol-lowering probiotics from lactic acid bacteria isolated from corn silage based on three hypothesized

- pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9): 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms20092073>
- Nguyen, T. D. T., Kang, J. H., Lee, M. S. (2007). Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *International Journal of Food Microbiology*, 113(3): 358–361. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.08.015>
- Öner, Ö., Aslım, B. (2012). *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* cinsi Bakterilerin Kolesterol Giderimi Özellikleri ile Safra Tuzu Hidrolaz (BSH) Enzim Aktiviteinin ve Geninin Araştırılması. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Türkiye, 69 s.
- Öner, Z., Aloğlu, H. (2005). Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Kullanılması ile Kolesterolün Azaltılması. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Isparta, Türkiye, 67 s.
- Ooi, L. G., Liong, M. T. (2010). Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: A review of in Vivo and in Vitro Findings. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(6): 2499–2522. <https://doi.org/10.3390/ijms11062499>
- Pereira, D. I. A., Gibson, G. R. (2002). Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9): 4689–4693. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4689-4693.2002>
- Pisano, M. B., Rosa, A., Putzu, D., Cesare Marincola, F., Mossa, V., Viale, S., Fadda, M. E., Cosentino, S. (2020). Influence of Autochthonous Putative Probiotic Cultures on Microbiota, Lipid Components and Metabolome of Caciotta Cheese. *Frontiers in Microbiology*, 11: 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.583745>
- Puska, P., S. Mendis, B. Norrving, and World Health Organization. (2011). Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Rudel, L. L., Morris, M. D. (1973). Determination of cholesterol using o phthalaldehyde. *Journal of Lipid Research*, 14(3): 364–366.
- Sezen Demirci, F., Koçak, C. (2012). Beyaz Peynirde Aroma Profilinin Karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Süt Teknolojisi Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye, 114 s.
- Turhan, İ., Öner, Z. (2012). Kaşar Peyniri Üretimi için Starter Kültür İzolasyonu ve İzolatların FTIR Spektroskopisi ile Tanısının Yapılması. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye, 112 s.
- Walker, D. K., Gilliland, S. E. (1993). Relationships Among Bile Tolerance, Bile Salt Deconjugation, and Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 76(4): 956–961. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77422-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77422-6)
- Zhang, T., Yuan, D., Xie, J., Lei, Y., Li, J., Fang, G., Tian, L., Liu, J., Cui, Y., Zhang, M., Xiao, Y., Xu, Y., Zhang, J., Zhu, M., Zhan, S., Li, S. (2019). Evolution of the Cholesterol Biosynthesis Pathway in Animals. *Molecular Biology and Evolution*, 36(11): 2548–2556. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz167>