



T.C.

BARTIN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Lactocaseibacillus rhamnosus* GG PROBİYOTİK BAKTERİSİNİN**
FENOLİK BİLEŞİK OLAN KARVAKROL İLE ETKİLEŞİMİ VE
PROTEOMİK YÖNTEMLER İLE ANALİZİ

BUSE NUR DEREBAŞI

DANIŞMAN

DOÇ. DR. HASAN UFUK ÇELEBİOĞLU

BARTIN-2025



T.C.

BARTIN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

***Lactocaseibacillus rhamnosus* GG PROBİYOTİK BAKTERİSİNİN FENOLİK
BİLEŞİK OLAN KARVAKROL İLE ETKİLEŞİMİ VE PROTEOMİK
YÖNTEMLER İLE ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Buse Nur DEREBAŞI

JÜRİ ÜYELERİ

Danışman :
Üye :
Üye :

BARTIN-2025

KABUL VE ONAY

Buse Nur DEREBAŞI tarafından hazırlanan “*Lacticaseibacillus rhamnosus* GG PROBİYOTİK BAKTERİSİNİN FENOLİK BİLEŞİK OLAN KARVAKROL İLE ETKİLEŞİMİ VE PROTEOMİK YÖNTEMLER İLE ANALİZİ” başlıklı bu çalışma, 07.08.2025 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak jürimiz tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan :

Üye :

Üye :

Bu tezin kabulü Lisansüstü Eğitimi Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/...../20... tarih ve 20...../.....-..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zafer CEYLAN
Enstitü Müdürü

BEYANNAME

Bartın Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre Doç. Dr. Hasan Ufuk ÇELEBİOĞLU danışmanlığında hazırlamış olduğum “*Lacticaseibacillus rhamnosus* GG PROBİYOTİK BAKTERİSİNİN FENOLİK BİLEŞİK OLAN KARVAKROL İLE ETKİLEŞİMİ VE PROTEOMİK YÖNTEMLER İLE ANALİZİ” başlıklı yüksek lisans tezimin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

07.08.2025

Buse Nur DEREBAŞI

ÖN SÖZ

Bu tez çalışması, yüksek lisans eğitimim süresince edindiğim akademik bilgi ve deneyimlerin önemli bir çıktısı olarak ortaya çıkmıştır. “*Lacticaseibacillus rhamnosus* GG Probiyotik Bakterisinin Fenolik Bileşik Olan Karvakrol ile Etkileşimi ve Proteomik Yöntemler ile Analizi” başlıklı bu çalışma boyunca hem teorik hem de uygulamalı olarak birçok kazanım elde ettim.

Çalışmam süresince bilimsel rehberliği, yönlendirmeleri ve değerli katkılarıyla her zaman yanımda olan danışman hocam Doç. Dr. Hasan Ufuk ÇELEBİOĞLU’na en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca laboratuvar sürecinde her aşamada bilgi ve desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Sena DAVRAN BULUT’a, Fatma AL DUKR’a, Seda Nur ERCİYES’e ve Merve GÖNEN’e teşekkürü bir borç bilirim. Laboratuvar çalışmalarım sırasında desteğini esirgemeyen hocalarım Doç. Dr. Yavuz ERDEN’e ve Dr. Öğr. Üyesi Ahmet BULUT’a şükranlarımı sunarım.

Bu zorlu süreçte manevi destekleriyle yanımda olan, her zaman sevgisini ve dualarını hissettiren canım annem Hacer DEREBAŞI’na, canım babam Bilal DEREBAŞI’na, canım ablam Münire DEREBAŞI’na ve canım kardeşim Rıza DEREBAŞI’na sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

Bu tez, 2024-FEN-CY-001 proje numaralı ‘*Lacticaseibacillus rhamnosus* GG Probiyotik bakterisinin Fenolik Bileşik Olan Karvakrol ile Etkileşimi ve Proteomik Yöntemler ile Analizi’ başlıklı proje ile Bartın Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü tarafından Lisansüstü Tez Projeleri (Yüksek Lisans) proje türünde desteklenmiştir. Bu maddi destek için Bartın Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü’ne teşekkür ederim. Ayrıca bu çalışmanın yürütülmesinde sağladıkları destek için TÜSEB Yüksek Lisans Öğrencilerine Yönelik A2 Proje Destek Programı’na ve TÜBİTAK 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı’na teşekkür ederim. Probiyotik suşunun temini için Chr. Hansen Gıda San. Tic. A.Ş.’ye teşekkür ederim.

Bu tezin ortaya çıkmasında emeği geçen herkese teşekkür eder, çalışmanın bilimsel alana katkı sunmasını temenni ederim.

Buse Nur DEREBAŞI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***Lacticaseibacillus rhamnosus* GG PROBİYOTİK BAKTERİSİNİN FENOLİK BİLEŞİK OLAN KARVAKROL İLE ETKİLEŞİMİ VE PROTEOMİK YÖNTEMLER İLE ANALİZİ**

Buse Nur DEREBAŞI

**Bartın Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hasan Ufuk ÇELEBİOĞLU

Bartın-2025, sayfa: 62

Bu tez çalışmasında, fenolik bileşiklerden biri olan karvakrolün, yaygın ve iyi bilinen probiyotik bir bakteri olan *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (LGG) üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Hipotez olarak; birçok gıdada doğal olarak bulunan karvakrolün, LGG'nin probiyotik özelliklerinin gelişimine ve proteomik profiline katkı sağlayabileceği öne sürülmüştür. Bu doğrultuda, probiyotik bakteriler ve fenolik bileşiklerin, aynı ekosistem içinde birlikte bulunmalarından hareketle, aralarında gelişebilecek sinbiyotik ilişkinin bakterinin fizyolojik özellikleri ve protein düzeyindeki etkilerini anlamak amaçlanmıştır.

Çalışmada LGG suşu, 0-800 µg/mL aralığında karvakrol konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri ≥ 800 µg/mL olarak belirlenmiş ve bu nedenle 25, 50, 100, 200 ve 300 µg/mL konsantrasyonları deneysel analizler için seçilmiştir. Deney bulguları, karvakrolün hiçbir konsantrasyonda LGG üzerinde inhibe edici etki göstermediğini ve bazı konsantrasyonlarda bakteriyel büyümeyi desteklediğini göstermiştir. Oto-agregasyon testlerinde 300 µg/mL karvakrol konsantrasyonunda LGG'nin oto-agregasyon özelliğinde %22'ye varan artış gözlemlenmiştir. Ko-agregasyon analizlerinde, karvakrolün LGG'nin *E. coli* ve *S. aureus* ile etkileşiminde saat ve

konsantrasyona bağılı olarak değişen etkiler saptanmıştır. Özellikle 200 µg/mL karvakrol konsantrasyonunda LGG'nin *S. aureus* ile ko-agregasyonu %22 oranında artmıştır. Antioksidan aktivite analizlerinde, karvakrol tek başına DPPH ve ABTS testlerinde yüksek antioksidan kapasite gösterirken, LGG'nin karvakrol ile birlikte büyütülmesinin antioksidan aktiviteyi anlamlı şekilde artırmadığı görülmüştür. Benzer şekilde, LGG'nin adezyon kabiliyeti özellikle 200 µg/mL karvakrol konsantrasyonunda %11 oranında artış göstermiştir. Safra tuzuna dayanıklılık testlerinde, LGG kontrol grubunda %94 direnç gösterirken, karvakrol ile muamele edilen gruplarda bu oran %75 ile %93 arasında değişmiş, ancak genel olarak karvakrolün dayanıklılığı artırmadığı gözlenmiştir. Pepsin direnci açısından ise tüm karvakrol konsantrasyonlarında düşüş tespit edilmiştir. BSH enzim analizinde karvakrol ile tüm konsantrasyonlarda enzim aktivitesinde artış gözlemlenmiştir. Proteomik analizlerde ise, karvakrolün “CHAP domain-containing protein” ve “UPF0291 protein AWJ15_03705” protein düzeylerinde değişikliğe sebep olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, karvakrolün LGG bakterisinin bazı probiyotik özellikleri üzerinde destekleyici etkiler gösterebildiği, bazı parametrelerde ise nötr ya da hafif baskılayıcı etkiler oluşturduğu görülmüştür. Bu bulgular, fenolik bileşiklerin probiyotiklerle birlikte kullanımının sinbiyotik etkileşim bağlamında yeniden değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca bu çalışma, karvakrolün LGG'nin proteomu üzerindeki olası etkilerine dair temel bir bakış açısı sunmakta olup, gelecekte yapılacak daha kapsamlı proteomik analizler için öncü bir nitelik taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Karvakrol, *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG, Probiyotik, Proteomik, Sinbiyotik

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

INTERACTION OF THE PROBIOTIC BACTERIUM *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG WITH THE PHENOLIC COMPOUND CARVACROL AND ITS ANALYSIS BY PROTEOMIC METHODS

Buse Nur DEREBAŞI

**Bartın University
Graduate School
Department of Biotechnology**

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Dr. Hasan Ufuk ÇELEBİOĞLU

Bartın-2025, pp: 62

In this thesis study, the effects of carvacrol, a phenolic compound commonly found in many food sources, on the widely known probiotic bacterium *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG (LGG) were evaluated. The central hypothesis posits that carvacrol may contribute to the enhancement of LGG's probiotic properties and potentially influence its proteomic profile. Based on the coexistence of probiotic bacteria and phenolic compounds in the same ecosystem (e.g., the gut microbiota), this study aimed to investigate the interaction between these two health-promoting food components and to elucidate how the synbiotic relationship they may form affects the physiological properties and proteome of the probiotic bacteria.

In the experimental design, LGG was treated with carvacrol concentrations ranging from 0 to 800 µg/mL. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined to be ≥ 800 µg/mL, and therefore, 25, 50, 100, 200, and 300 µg/mL concentrations were selected for further analysis. The results showed that carvacrol did not exhibit any inhibitory effects on LGG at the tested concentrations and, in some cases, even supported bacterial growth.

In auto-aggregation assays, a 22% increase in LGG's auto-aggregation ability was observed

at 300 µg/mL carvacrol. Co-aggregation analyses revealed time- and concentration-dependent changes in the interaction between LGG and *E. coli* or *S. aureus*. Notably, co-aggregation with *S. aureus* increased by approximately 22% at 200 µg/mL carvacrol. Antioxidant activity tests showed that carvacrol alone had strong antioxidant capacity in both DPPH and ABTS assays; however, growing LGG in the presence of carvacrol did not significantly enhance the antioxidant activity. Similarly, the adhesion ability of LGG was increased 11% by 200 µg/mL carvacrol. In bile salt tolerance tests, the LGG control group demonstrated 94% resistance, while the treated groups ranged between 75% and 93%, suggesting that carvacrol generally did not enhance bile salt tolerance. Regarding pepsin resistance, a decrease was observed at all tested carvacrol concentrations. In the BSH enzyme analysis, an increase in enzyme activity was observed at all concentrations of carvacrol. In the proteomic analysis, carvacrol altered the abundancies of “CHAP domain-containing protein” and “UPF0291 protein AWJ15_03705” among the detected spots.

In conclusion, carvacrol was found to support certain probiotic characteristics of LGG while exhibiting neutral or mildly suppressive effects on others. These findings suggest that the use of phenolic compounds in combination with probiotics should be re-evaluated in the context of synbiotic interactions. Furthermore, this study provides a foundational perspective on the potential impact of carvacrol on the proteome of LGG and serves as a preliminary framework for future comprehensive proteomic analyses.

Keywords: Carvacrol, *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG, Probiotic, Proteomics, Synbiotic

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
BEYANNAME.....	iii
ÖN SÖZ.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
EKLER DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	8
3. MATERYAL VE METOT	13
Bu bölümde, tez çalışması kapsamında yapılmış olan deneylerin materyal ve metotları özetlenmiştir.	13
3.1. Karvakrolün <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> GG Probiyotik Bakterisi Üzerindeki Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi.....	13
3.2. Karvakrolün Probiyotik Bakterisi <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> GG Gelişimi Üzerine Etkileri	13
3.3. Karvakrolün <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> GG'nin Pepsine ve Safra Tuzuna olan Dayanıklılığına Etkisi.....	13
3.4. Karvakrolün Probiyotik Oto-agregasyon Üzerine Etkileri.....	14
3.5. Karvakrolün Probiyotik-Patojen Ko-agregasyonu Üzerine Etkileri.....	14
3.6. Karvakrolün <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> GG'nin Adezyon Özelliğine Etkisi 15	
3.7. <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> GG Hücresiz Süpernatantlarının (HS) Hazırlanması	15
3.8. Karvakrolün <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> GG'nin Antioksidan Özelliğine Etkisi 16	
3.9. Fenolik Bileşiklerin Probiyotik Bakterilerin Safra Tuzu Hidrolaz (BSH) Enzim	

Aktivitesi Üzerine Etkileri	16
3.10. Proteom Analizleri için Örnek Hazırlığı	17
3.11. 2 Boyutlu Jel Elektroforezi (2-DE)	18
3.12. Kütle Spektrometrisi ile Protein Tanımlama	19
3.13. İstatistiksel Analizler	19
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	20
Bu bölümde, dneysel çalışmalae sonucu elde edilmiş bulgular özetlenmiş ve literatüre dayanarak tartışılmıştır.	20
4.1. Karvakrolün <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> GG Probiyotik Bakterisi Üzerindeki Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi.....	20
4.2. Karvakrolün <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> GG'nin Gelişimi Üzerindeki Etkileri.....	21
4.3. Karvakrolün <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> GG'nin Pepsin ve Safra Tuzu Dayanıklılığı Üzerindeki Etkisi.....	22
4.4. Karvakrolün <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> GG'nin Oto-agregasyon Özelliği Üzerine Etkisi.....	25
4.5. Karvakrolün <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> GG'nin Ko-agregasyon Özelliği Üzerine Etkisi.....	28
4.6. Karvakrolün <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> GG'nin Adezyon Özelliğine Etkisi	32
4.7. Karvakrolün <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> GG'nin Antioksidan Özelliğine Etkisi	33
4.8. Karvakrolün Probiyotik Safra Tuzu Hidrolaz (BSH) Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkileri.....	36
4.9. Proteom Analizleri için Örnek Hazırlığı	42
4.10. 2 Boyutlu Jel Elektroforezi (2-DE)	43
4.11. Kütle Spektrometrisi ile Protein Tanımlama	45
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR.....	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
No	No
Şekil 1.1: Probiyotiklerin insan sağlığı üzerindeki genel yararları.	2
Şekil 1.2: Karvakrolün kimyasal yapısı (Bayir vd., 2019).....	5
Şekil 2.1: Sinbiyotik etkinin ve probiyotik özelliklerin şematik gösterimi.	8
Şekil 4.1: Farklı konsantrasyonlarda karvakrol ile muamele edilmiş LGG bakterilerinin minimum inhibisyon konsantrasyonu.....	21
Şekil 4.2: Farklı konsantrasyonlarda karvakrol ile muamele edilmiş LGG bakterilerinin gelişim kinetiği.	22
Şekil 4.3: Farklı konsantrasyonlarda karvakrol ile muamele edilmiş LGG bakterilerinin pepsine karşı direnci.	23
Şekil 4.4: Farklı konsantrasyonlarda karvakrol ile muamele edilmiş LGG bakterilerinin safra tuzuna karşı direnci.	25
Şekil 4.5: Farklı konsantrasyonlarda karvakrol ile muamele edilmiş LGG bakterilerinin oto-agregasyonu.....	27
Şekil 4.6: Farklı konsantrasyonlarda karvakrol ile muamele edilmiş LGG bakterilerinin <i>E. coli</i> ko-agregasyonu.	29
Şekil 4.7: Farklı konsantrasyonlarda karvakrol ile muamele edilmiş LGG bakterilerinin <i>S. aureus</i> ko-agregasyonu.....	31
Şekil 4.8: Farklı konsantrasyonlarda karvakrol ile muamele edilmiş LGG bakterilerinin adezyon yüzdeliği.	33
Şekil 4.9: Farklı konsantrasyonlarda karvakrol ile muamele edilmiş LGG bakterilerinin ve karvakrolün DPPH radikal süpürücü etkisi.	34
Şekil 4.10: Farklı konsantrasyonlarda karvakrol ile muamele edilmiş LGG bakterilerinin ve karvakrolün ABTS radikal süpürücü etkisi.	36
Şekil 4.11: Farklı konsantrasyonlarda karvakrol ile muamele edilmiş LGG bakterilerinin BSH enzim aktivitesinin kalitatif tayini.	38
Şekil 4.12: Farklı konsantrasyonlarda karvakrol ile muamele edilmiş LGG bakterilerinin BSH enzim aktivitesi.	41
Şekil 4.13: LGG bakterisinin kontrol grubu (Karvakrol olmayan LGG) (A) ve muamele grubu (200 µg/ mL Karvakrol ile büyütülmüş LGG) (B) ekzoproteomunun 2D jel görüntüleri.	43

Şekil 4.14: 29 numaralı spotun 2D jel görüntülerinin karşılaştırması.	44
Şekil 4.15: 8 numaralı spotun 2D jel görüntülerinin karşılaştırması.	44



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 4.1: Farklı konsantrasyonlarda karvakrol ile muamele edilmiş LGG bakterilerinin BSH enzim aktivitesi ve spesifik aktivite değerleri.....	42
Tablo 4.2: 2D jel görüntülerinin karşılaştırmalı analizi sonucu (kat değişimi ≥ 2 , ANOVA p-değeri $\leq 0,08$)	44
Tablo 4.3: MALDI-TOF/MS ile tanımlanan proteinler. Veritabanı olarak UniProtKB kullanılmıştır.	46



EKLER DİZİNİ

Ek No	Sayfa No
EK 1: Probiyotik Bakterilerin Safra Tuzu Hidrolaz (BSH) Enzim Aktivitesi için glisin standart grafiği.	56
EK 2: Probiyotik Bakterilerin Safra Tuzu Hidrolaz (BSH) Enzim Aktivitesi için Bradford BSA protein tayini Bradford standart grafiği.	57
EK 3: Proteom analizi için 2D Quant kit protein tayini BSA standart grafiği.	58
EK 4: 8 numaralı spotun MALDI-TOF/MS protein tanımlama analiz sonucu.	59
EK 5: 29 numaralı spotun MALDI-TOF/MS protein tanımlama analiz sonucu.	61



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Da	: Dalton
kV	: Kilovolt
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
M	: Molar
V	: Volt
°C	: Santigrat Derece
µm	: Mikrometre
µL	: Mikrolitre

KISALTMALAR

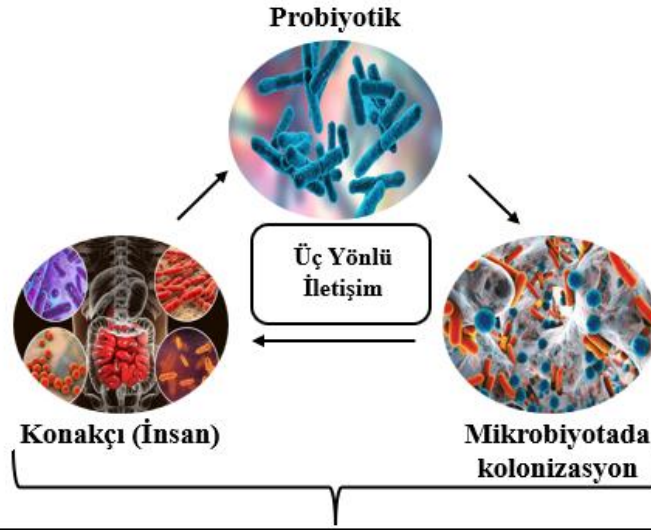
ABTS	: 2,2'-Azino-bis (3-Etilbenzotiyazolin-6-Sülfonik Asit
ANOVA	: Varyans Analizi
CA	: Kafeik Asit
CBB	: Coomassie Brilliant Blue
CHAP	: Sistein, Histidin bağımlı Amidohidrolazlar/Peptidazlar
DHCA	: Dihidrokafeik Asit
dpep	: Sindirilmiş Soya Fasulyesi Peptidi
DPPH	: α , α -Difenil- β -Pikrilhidrazil
dpro	: Soya Fasulyesi Protein İzolatı
DTT	: Ditiyotritol
EPS	: Ekzopolisakkaritler
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılotesi Spektroskopisi
GİS	: Gastrointestinal Sistem
HCCA	: α -Siyano-4-Hidroksi Sinamik Asit
IEF	: İzoelektrik Fokuslama
IPG	: İmmobilize pH Gradyanı
ISAPP	: Uluslararası Probiyotikler ve Prebiyotikler Bilimsel Birliği
LA-5	: <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5

LAB	: Laktik asit bakterileri
LABSEM	: Laktik Asit Bakterileri için Yarı Sentetik Besiyeri
LGG	: <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> GG
MALDI-TOF MS	: Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometrisi
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolium Bromür
PBS	: Fosfatla Tamponlanmış Salin
p-CA	: p-Kumarik Asit
RA	: Rosmarinik Asit
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TFA	: Trifloroasetik Asit
UV	: Ultraviyole
2-DE	: İki Boyutlu Jel Elektroforezi

1. GİRİŞ

Probiyotikler, Uluslararası Probiyotikler ve Prebiyotikler Bilimsel Birliği (ISAPP) tarafından yeterli miktarda alındığında konakçı sağlığına fayda sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (Hill vd., 2016). Probiyotiklerin insan sağlığına faydaları arasında, gastrointestinal enfeksiyonların ve inflamatuvar bağırsak hastalıklarının azaltılması ve bağışıklık sisteminin güçlenmesi gibi başlıca etkiler yer almaktadır (Şekil 1.2). Laktobasiller, bifidobakteriler ve enterokoklar, insan sağlığı üzerinde olumlu etkiler gösteren, bağırsak mikrobiyotasını dengeleyen ve bağışıklık sistemini destekleyen başlıca probiyotik mikroorganizma gruplarındandır.

Bağırsak mikrobiyotasının düzenlenmesinde önemli rolleri olan probiyotik mikroorganizmaların bağırsak rahatsızlıklarını önleyici etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Bazı patojenlerin kolonizasyonunu ve çoğalmasını önleyebilir, bağışıklık sistemini güçlendirebilir ve antikolesterik, antijenotoksik, antimikrobiyal ve antimutajenik etkilere sahip olabilirler (Liévin-Le Moal ve Servin, 2014). Ayrıca, probiyotik mikroorganizmalar, mide asidine, mide sindirimlerine (pepsin gibi enzimlere) ve safra tuzlarına karşı dirençli olmalarıyla bilinir (Allaq vd., 2020).



- Bağırsak mikrobiyotasını dengeleyerek sindirim sağlığını iyileştirme.
- Bağışıklık sistemini güçlendirme ve enfeksiyonlara karşı koruma.
- Zararlı mikroorganizmaların çoğalmasını engelleme.
- İrritabl bağırsak sendromu (IBS) ve inflamatuvar bağırsak hastalıklarının (IBD) semptomlarını hafifletme.
- Kolesterol seviyelerinin düşürülmesine yardım.
- Alerjik reaksiyonların şiddetini azaltma.
- Stres ve anksiyete gibi mental sağlık sorunlarına olumlu etkiler.
- Antioksidan ve anti- inflamatuvar etkiler ve genel sağlığı destek.
- Obezite ve diyabet riskini azaltma.
- Kalp hastalıkları riskini azaltma.
- Nörodejeneratif hastalıklarda potansiyel koruma.

Şekil 1.1: Probiyotiklerin insan sağlığı üzerindeki genel yararları.

Laktik asit bakterileri; çeşitli habitatlarda bulunabilen, Gram-pozitif, spor oluşturmeyan ve katalaz-negatif özellikteki mikroorganizmalardan oluşur (Shang vd., 2020). *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG (LGG), insan bağırsağında kolonize olabilmesi için mide asidi pH'ında yaşama ve çoğalma yeteneği, safra içeren ortamda yaşama ve çoğalma yeteneği, enterositlere yapışma yeteneğine sahip bir laktik asit bakterisidir. LGG'nin etki mekanizması; yüzeysel ekzopolisakkaritleri ve pilileri sayesinde mukozal yüzeylere yüksek yapışma kapasitesi, asidik pH koşullarında >92 farklı protein sentezleme yeteneği ve güçlü bağışıklık uyarıcı aktivitesi ile ilişkilidir. Diğer *Lactobacillus* suşlarına karşı LGG'nin mukozal hücrelere yapışma oranı çok daha yüksektir (Tuomola vd., 2001). LGG'nin mukozaya yapışması, adezyon proteini LGG0186 tarafından kolaylaştırılır (Vélez vd., 2010) ve LGG bağırsak geçirgenliğini

normalleştirmektedir (Isolauri vd., 1993). LGG, 13 kompleman aracılı lizise karşı korumada rol oynayan ve organizmanın yapışkanlığında rol oynayan uzun galaktoz bakımından zengin ekzopolisakkaritleri (EPS) ifade eder (Landersjö vd., 2002; Claes vd., 2010). LGG, ishalin önlenmesi ve patojenik bakterilerin inhibisyonu gibi insan sağlığı için yararlı etkileri olan en yaygın çalışılan probiyotik suşlardan biridir (Gorbach vd., 2017; Celebioglu, 2021). LGG, gastrointestinal sistemde canlı kalabilmesi için safra tuzlarına karşı dirençli olması gereken önemli bir probiyotik suşudur. Safra tuzları, ince bağırsakta bakterilere karşı antimikrobiyal etki göstererek hücre zarını bozabilir ve hücrel enzimleri inhibe edebilir. Ancak bazı *Lactocaseibacillus rhamnosus* suşları, safra tuzlarına karşı hem zar yapısını stabilize ederek hem de safra tuzunu hidrolize eden safra tuzu hidrolazı (Bile Salt Hydrolase, BSH) enzimini üreterek bu olumsuz etkilerden korunabilir. Yapılan çalışmalarda, *Lactocaseibacillus rhamnosus*'un bu enzim sayesinde safra tuzlarını daha az toksik olan bileşenlere dönüştürdüğü ve böylece gastrointestinal geçiş sırasında hayatta kalma oranının arttığı gösterilmiştir (Begley vd., 2005; Ruiz vd., 2011). Bu özellik, onun fonksiyonel gıda ürünlerinde kullanılabilirliğini ve probiyotik etkinliğini destekleyen önemli bir adaptasyon mekanizmasıdır.

LGG, mide ortamındaki düşük pH ve proteolitik enzimler gibi ekstrem koşullara maruz kaldığında dahi canlılığını koruyabilmesi sayesinde önemli bir probiyotik olarak öne çıkmaktadır. Özellikle mide asidinde aktif olan pepsin enzimi, bakteri hücre zarını ve yüzey proteinlerini parçalayarak çoğu bakteriyi etkisiz hale getirebilir. Ancak yapılan güncel çalışmalarda bazı *Lactocaseibacillus rhamnosus* suşlarının bu koşullara karşı yüksek düzeyde tolerans geliştirdiği; hücre duvarı yapısının dayanıklılığı, asit şok proteinlerinin artışı ve yüzeydeki protein yapılarının korunması sayesinde pepsin varlığında canlı kalabildiği gösterilmiştir (Koponen vd., 2012). Bu özellik, bakterinin mideyi geçerek ince bağırsakta kolonize olmasını ve probiyotik etkilerini sürdürebilmesini sağlamaktadır.

Probiyotik bakterilerin moleküler biyolojisi araştırmalarında değerli başka bir teknik de proteomiktir. Tüm proteinler organizmanın genomu tarafından kodlanır. Genom potansiyel fonksiyonların nispeten değişmez bir rezervi iken, proteom organizmadaki aktif fonksiyonları ortaya çıkarır. Proteomik, proteomu, yani bir organizmada (veya hücre hattında veya dokuda) tanımlanmış bir fizyolojik koşul altında ifade edilen

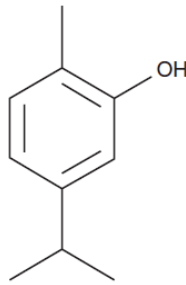
proteinler kümesini incelemek için bir araçtır. Proteomik yaklaşımlar, probiyotik bakterilerin fizyolojik adaptasyonlarını, çevresel stres yanıtlarını ve fonksiyonel protein profillerini detaylı biçimde ortaya koymak için güçlü bir araç sunar. Proteom sürekli olarak değişir ve proteom farklı fizyolojik koşullar altında incelenerek organizmanın fonksiyonel tepkileri hakkında büyük miktarda bilgi elde edilebilir. Proteomik, protein seviyelerindeki değişikliklerin haritalanmasıyla araştırılır (Siciliano ve Mazzeo, 2012). İki boyutlu jel elektroforezi (2-DE), proteomik analizlerde proteinlerin ayrıştırılması, karşılaştırılması ve diferansiyel ekspresyonunun belirlenmesi için kullanılan klasik ama halen etkili bir tekniktir. Bu yöntem, ilk boyutta izoelektrik noktalarına (pI) göre, ikinci boyutta ise moleküler ağırlıklarına göre proteinlerin ayrılmasına olanak sağlar. 2-DE, özellikle probiyotik bakteriler gibi karmaşık mikrobiyal sistemlerde çevresel streslere (örneğin fenolik bileşikler, safra tuzu, asidik ortam) yanıt olarak değişen protein seviyelerini belirlemede sıklıkla kullanılmaktadır (Meleady, 2018). Celebioglu vd. (2018), *Lactocaseibacillus acidophilus* NCFM suşunu farklı fenolik asitlerle (resveratrol, ferulik asit vb.) inkübe ederek 2-DE ile yüzey ve total hücre proteomlarını analiz etmiş; strese yanıt, enerji metabolizması ve adezyonla ilişkili birçok proteinin ekspresyon düzeyinde anlamlı değişiklikler tespit etmiştir (Celebioglu vd., 2018). 2-DE yöntemi, özellikle düşük yoğunlukta proteinleri saptamada sınırlı olmakla birlikte, görüntüleme kolaylığı, kantitatif karşılaştırmalar ve hedef proteinlerin tanımlanmasında LC-MS/MS ile birlikte güçlü bir strateji sunar (Rabilloud vd., 2010). Bu nedenle 2-DE, proteomik analizlerde hâlâ yaygın olarak kullanılan, özellikle hipotez oluşturma aşamasında değerli bilgiler sağlayan bir tekniktir.

İnsan diyeti, gastrointestinal sistemdeki (GİS) mikrobiyotayı şekillendirir ve mikrobiyota ile diğer diyet bileşenleri arasındaki karşılıklı etkileşimler, bağışıklık sistemi, patojenlere karşı mücadele ve kanserin önlenmesi dahil olmak üzere konakçı sağlığını modüle etme potansiyeline sahiptir. Birçok bitki bazlı gıdada, bitkilerde doğal olarak bulunan ve insan sağlığında rol oynayabilen çok sayıda fenolik bileşik bulunmaktadır (Demir, 2024). Bitki fenolikleri, fenolik asitler, flavonoidler, tanenler ve daha az yaygın olan stilbenler ve lignanlar olarak sınıflara ayrılmaktadır.

Flavonoidler, diyetlerimizde en bol bulunan polifenollerdir. Flavonoidler, merkezi karbon halkasının oksidasyon durumuna göre altı alt gruba ayrılır: flavonlar, flavonoller,

flavanoller, flavanonlar, izoflavonlar ve antosiyaninler (Lopez-Corona vd., 2022). En yaygın flavonoidlerden bazıları arasında soğan, brokoli ve elmada bol miktarda bulunan bir flavonol olan kuarsetin; kekik, biberiye ve çörek otunda bulunan karvakrol; çay ve çeşitli meyvelerde bulunan bir flavanol olan kateşin; greyfurttaki ana flavanon olan naringenin; siyanidin-glikozit, dut meyvelerinde (siyah frenk üzümü, ahududu, böğürtlen, vb.) bol miktarda bulunan bir antosiyanin; ve soya fasulyesindeki ana izoflavonlar olan daidzein, genistein ve glisitindir (Dai ve Mumper, 2010).

Karvakrol, $C_6H_3CH_3(OH)$ (C_3H_7) kimyasal formülü ile temsil edilen bir monoterpenoid fenoldür (Şekil 1.2). Karvakrol, monoterpenoid fenolik bileşikler sınıfına ait olup, kimyasal olarak 2-metil-5-(1-metilpropil)fenol şeklinde tanımlanır ve moleküler formülü $C_{10}H_{14}O$ 'dur (Veldhuizen vd., 2006). Yapısındaki fenolik hidroksil (-OH) grubu, karvakrolün antioksidan kapasitesini ve mikroorganizmalara karşı biyolojik aktivitesini sağlayan temel fonksiyonel gruptur. Molekülün hidrofobik izopropil yan zinciri, lipid membranlarla etkileşimini kolaylaştırarak membran geçirgenliğinin artmasına neden olur ve böylece mikrobiyal hücre zarının yapısal bütünlüğünü bozar. Karvakrolün düşük moleküler ağırlığı (~150 Da) ve uçucu doğası, özellikle bitkisel esansiyel yağların temel bileşeni olarak aroma profilini belirlerken, biyolojik membranlarda etkin difüzyonuna da olanak tanır. Bu yapısal özellikler, karvakrolün hem farmakolojik hem de mikrobiyal terapötik uygulamalarda değerli bir bileşik olmasını sağlar (Ben Arfa vd., 2006).



Şekil 1.2: Karvakrolün kimyasal yapısı (Bayir vd., 2019).

Karvakrol, genellikle mutfakta baharat olarak ve halk arasında hastalıkları tedavi/önleme amacıyla kullanılan birçok aromatik bitkinin bir bileşenidir. Bu aromatik bitkiler arasında kekik (*Origanum vulgare*), İspanyol origanum (*Thymbra capitata*), biberiye (*Lepidium flavum*) ve çörek otu (*Nigella sativa*) vardır. Ayrıca karvakrol, kimyasal ve biyoteknolojik yöntemlerle de sentezlenebilmektedir (Bayir vd., 2019). Güvenli bir gıda katkı maddesi olarak kabul edilir ve şekerleme, sakız ve içecek üretiminde kullanılır. Bununla birlikte, çalışmalar, karvakrolün antimikrobiyal, antienflamatuar, antioksidan ve antianjiyogenik özelliklere sahip olduğunu göstermiştir (Fan vd., 2015). Çalışmalar ayrıca karvakrolün tüketildikten sonraki 24 saat içinde metabolize olduğunu ve atıldığını göstermiştir, bu da vücutta herhangi bir potansiyel zararı olmadığını göstermektedir (Sivaranjani vd., 2016).

Diyet polifenoller ve probiyotik bakteriler, insan sağlığına olumlu etki oluşturduğu bilinen biyoaktif doğal bileşenlerdir. Gastrointestinal sistemde (GİS) birlikte bulunan bu iki bileşenin arasında karşılıklı bir etkileşimin olduğu varsayılmaktadır. Mevcut literatür, bağırsaktaki probiyotik bakterilerin, polifenollerin metabolize edilmesinde önemli rol oynadığını gösterirken, polifenollerin bağırsak mikroortamı boyunca probiyotik bakterilerin canlılığını ve çoğalmasını koruma potansiyeli oluşturduğunu bildirmektedir (Sharma ve Padwad, 2020a). Bu durum, polifenol ve probiyotiklerin birleşiminden oluşan ikinci nesil sinbiyotik fikrini ortaya çıkarmıştır. Sinbiyotik etki, probiyotik mikroorganizmaların ve prebiyotik bileşiklerin birlikte kullanılmasıyla, tek başlarına gösterdikleri yararlı etkilerin ötesinde bir sinerji oluşturarak bağırsak sağlığını daha etkili biçimde desteklemesi olarak tanımlanır. Bu etki, prebiyotiklerin seçici olarak probiyotiklerin büyümesini ve aktivitesini desteklemesi sayesinde gerçekleşmektedir (Gibson vd., 2017).

Sinbiyotik formülasyonlar, probiyotiklerin gastrointestinal sistemdeki canlı kalma oranlarını artırırken; aynı zamanda bağırsağın mikrobiyal çeşitliliğini zenginleştirmekte, inflamasyonu azaltmakta ve konak bağışıklığını düzenlemektedir (Markowiak ve Śliżewska, 2017). Bu nedenle sinbiyotik yaklaşımlar, fonksiyonel gıda ve terapötik uygulamalar açısından giderek daha fazla önem kazanmaktadır.

Bitkisel metabolitlerin probiyotik gelişimi üzerine etkileri bilinmektedir (Sharma ve Padwad, 2020b). Bu nedenle, karvakrol ile probiyotik arasındaki sinbiyotik ilişkinin düzeyi ve bu ilişkinin nasıl etkileneceği soruları, bu projenin temel araştırma sorularını oluşturmaktadır. Probiyotik bakteriler, yeterli miktarda tüketildiğinde konakçı üzerinde sağlığa olumlu yönde etki eden mikroorganizmalardır. Ayrıca, yapılan çalışmalarda besin maddelerinde bulunan bazı fenolik bileşiklerin de sağlığa yararlı olabilecek biyolojik aktivitelere sahip olduğu görülmüştür. Bu çalışmaların büyük kısmı *in vitro* olup, bazıları ise *in vivo* olarak gerçekleştirilmiş ve deney hayvanları üzerinde etkileri incelenmiştir. Sağlığa faydalı olabilecek bu iki farklı gıda bileşeninin (fenolikler ve probiyotikler) bir araya gelerek oluşturduğu ve sinbiyotik olarak adlandırılan daha yararlı kombinasyonlar üzerine çalışmak büyük önem taşımaktadır. Nitekim sinbiyotik ajan takviyesinin, probiyotik bakterilerin büyümesini teşvik ederek bağırsak mikrobiyotasını olumlu yönde etkilediği birçok çalışmayla ortaya konmuştur.

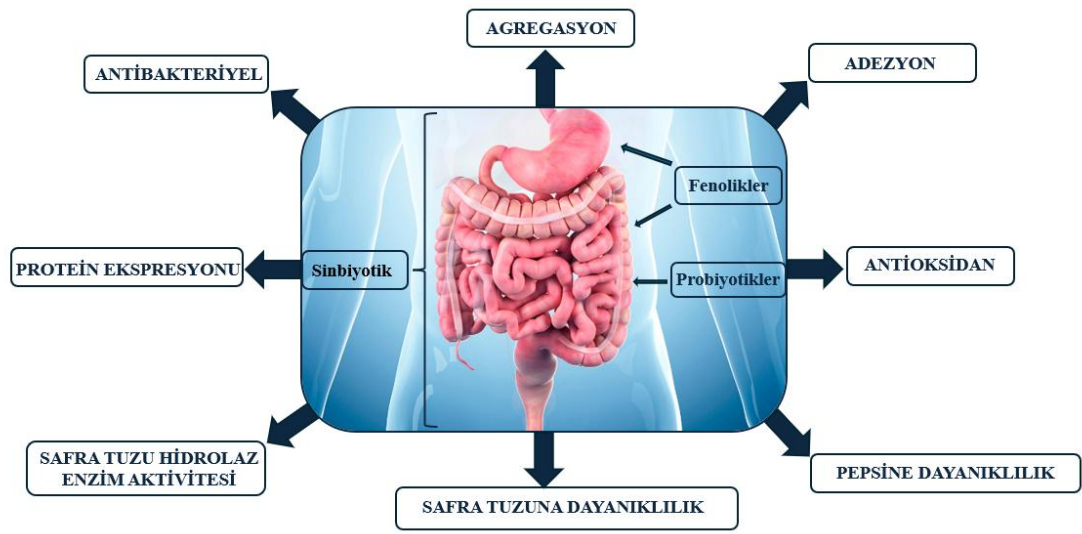
Karvakrolün antibakteriyel, antifungal, antioksidan ve antitümör gibi çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu ve canlılar üzerindeki olumlu yöndeki etkisi olduğu bilinmektedir. Ayrıca, karvakrol ve probiyotikler, gastrointestinal sistemde bulunan ve insan sağlığına yarar sağlayan önemli gıda bileşenleridir. Bu iki bileşenin aynı ortamda birbirleri ile olan etkileşimi ve birlikte bulundukları ortamda oluşturdukları sinbiyotik etki bilinmemektedir. Karvakrol ve probiyotik bakteriler ile sinbiyotik ilişkinin bilinmemesi ve bu alanda çalışmaların bulunmaması projenin özgün değerini daha da arttırmaktadır.

Tezin Amacı:

Çoğu bitkisel gıdada bulunan karvakrolün, *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG bakterisinin probiyotik özelliklerinin gelişiminde ve proteom düzeyinde oluşabilecek farklılıklarda rol oynayabileceği hipotezinden yola çıkılarak, bu tezde sağlığa yararlı olduğu bilinen ve aynı ortamda (bağırsak mikroortamı) bulunan iki farklı gıda bileşeninin —fenolikler ve probiyotik bakteriler— birbirleriyle etkileşimi ile oluşturdukları sinbiyotik ilişkinin, probiyotik bakterilerin fizyolojik özellikleri ve proteomu üzerindeki etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda tezde, karvakrol ile *L. rhamnosus* GG arasındaki potansiyel etkileşimler değerlendirilmiş ve söz konusu etkileşimlerin bakterinin probiyotik özellikleri üzerindeki etkileri incelenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Son yıllarda, probiyotik bakterilerin fenolik bileşiklerle olan etkileşimleri, hem bu mikroorganizmaların hayatta kalma ve konak adaptasyon yeteneklerini hem de fenoliklerin biyoyararlanımını artırabileceği yönünde yoğun şekilde araştırılmıştır (Şekil 2.1). Bu etkileşimler üzerine yapılan proteomik çalışmalar, probiyotiklerin fenolik ortama verdiği moleküler tepkileri aydınlatmak açısından büyük katkı sağlamıştır.



Şekil 2.1: Sinbiyotik etkinin ve probiyotik özelliklerin şematik gösterimi.

Mazzeo vd. (2015) yaptıkları çalışmada, *Lactobacillus acidophilus* suşunun, diyet polifenollerinden rutin varlığında hayatta kalmasını sağlayan adaptif yanıt mekanizmalarını incelemek amacıyla farklı proteomik yaklaşımlar uygulamışlardır. Rutin maruziyeti, genel stres yanıtı mekanizmalarında görev alan proteinlerin ifade seviyelerini düzenlemiş, özellikle protein kalite kontrol sistemlerinin aktivasyonunu tetiklemiş ve karbonhidrat ile amino asit metabolizması, protein sentezi ve hücre duvarı bütünlüğü üzerinde etkiler göstermiştir. Ayrıca rutin oksidasyon-redüksiyon süreçlerinde yer alan proteinlerin ekspresyonunu da artırmıştır. Bu çalışma, diyet polifenollerinin *L. acidophilus*'un metabolik ve biyolojik süreçleri üzerindeki etkilerine dair ilk kapsamlı bakışı sağlamaktadır (Mazzeo vd., 2015).

Celebioğlu vd. (2018), *Lactobacillus acidophilus* NCFM suşunu resveratrol, ferulik asit, tanik asit ve kafeik asit gibi fenolik bileşiklerle inkübe ederek yüzey proteomunu 2D-

PAGE ve MALDI TOF MS teknikleri ile analiz etmiş, özellikle karbonhidrat metabolizması, nükleotid biyosentezi ve hücre yüzeyiyle ilişkili proteinlerde anlamlı ekspresyon değişiklikleri tespit etmiştir. Bu değişimlerin, fenolik bileşiklerin bu suşun gastrointestinal sistemdeki adezyon ve hayatta kalma kapasitesini artırabileceğini gösterdiği belirtilmiştir (Celebioglu vd., 2018).

Zhang vd. (2021), simüle edilmiş gastrointestinal sindirimden geçirilmiş soya fasulyesi protein izolatu (dpro) ile sindirilmiş soya fasulyesi peptidinin (dpep), *Lactocaseibacillus rhamnosus* üzerindeki etkilerini morfolojik gözlemler, iTRAQ tabanlı proteomik analiz ve biyoenformatik yaklaşımlar kullanarak incelemişlerdir. Çalışmada toplam 1462 protein tanımlanmış; bu proteinlerden 66'sının dpep ile MRS besiyeri karşılaştırmasında, diğer 66'sının ise dpep ile dpro karşılaştırmasında anlamlı düzeyde farklı ifade edildiği belirlenmiştir. Biyoenformatik analizler sonucunda, bu farklı şekilde ifade edilen proteinlerin büyük ölçüde hücresel karbonhidrat ve azot bileşiklerinin katabolizması ile taşınmasında görev aldığı ortaya konmuştur. Ayrıca, hem dpep hem de dpro uygulamaları sonucunda ortak olarak farklı ekspresyon gösteren bazı proteinlerin, *L. rhamnosus*'un büyümesi ve morfolojik yapısındaki değişikliklerde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Zhang vd., 2021).

Caballero vd. (2022), 30 farklı laktik asit bakterisi suşunun, punikalagin açısından zengin nar özütünde bulunan punikalagini, ellajik asit ve ürolitinlere dönüştürme kapasiteleri araştırmışlardır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-elektrosprey iyonizasyon tandem kütle spektrometrisi (HPLC-ESI-MS²) ile yapılan analizler, tüm LAB suşlarının punikalagini ellajik aside dönüştürebildiğini, ancak ürolitin biyosentezinin gözlenmediğini göstermiştir. Etiketsiz MS tabanlı proteomik analizler, bu dönüşümde genel transglikozilazların ekspresyonunun arttığını ve oluşan yan ürünlerin hücre içi ve dışına taşınmasında önemli rol oynayan ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcılarının seviyesinde yükselme olduğunu ortaya koymuştur (Caballero vd., 2022).

Das vd. (2023), kişiselleştirilmiş sağlık hizmetleri için yeni nesil probiyotikleri oluşturmak üzere meta-proteomiğin ve yapay zekanın potansiyelini araştırmışlardır. Günümüzde probiyotiklerin sağlık üzerindeki olumlu etkileri kabul görmekle birlikte, genelleştirilmiş probiyotik uygulamalarındaki tutarsızlıklar nedeniyle, kişiye özel

probiyotik stratejileri geliştirmek için hassas probiyotiklere yönelik araştırmalar hız kazanmıştır. Yapılan çalışmada çoklu omik verilerin analizinde metaproteomik ve yapay zekâ/makine öğrenimi algoritmalarının kullanımı ve mikrobiyal özelliklerin bilgisayar destekli tahminini inceleyerek, kişiselleştirilmiş sağlık uygulamalarında hassas probiyotiklerin potansiyelini artırmayı amaçlanmıştır (Das vd., 2023).

Daha önce yaptığımız bir çalışmada ise, p-kumarik asidin (p-CA) *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (LA-5) ve *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG (LGG) ile sinbiyotik etkileşimi incelenmiştir (Derebasi vd., 2024). Probiyotikler, farklı p-CA konsantrasyonlarında büyütölmüş, probiyotik özellikler ile AChE ve BChE enzim aktiviteleri üzerine etkileri değerlendirilmiştir. p-CA, probiyotiklerin büyüme kinetiğini inhibe etmemiş; antibakteriyel aktivite ve oto-agregasyonlarını artırmıştır. p-CA, *E. coli*'ye karşı ko-agregasyonu artırırken, *S. aureus*'a karşı ko-agregasyonda azalma gözlenmiştir. Ayrıca, p-CA ile büyütölen her iki probiyotiğin pepsine karşı direnci artmış, buna karşılık LA-5'in safra tuzu direnci artarken LGG'ninki azalmıştır. AChE ve BChE aktiviteleri p-CA ve probiyotik kombinasyonlarıyla sırasıyla %11-68 ve %13-66 oranında inhibe edilmiştir. AChE ve BChE enzimlerinin inhibisyonu, nörolojik iletimin düzenlenmesi, nörodejeneratif hastalıkların tedavisi ve toksikolojik etkilerin belirlenmesi açısından önem arz etmektedir. FTIR analizi, p-CA'nın bakteri yüzeyindeki fosfat/CH oranını önemli ölçüde değiştirdiğini göstermiştir. Sonuçlar, p-CA'nın probiyotik özellikleri artırabileceğini desteklemektedir (Derebasi vd., 2024).

Shakya vd. (2024), *Mentha arvensis* (Mentha) özütünün, bitki kökenli probiyotik suşlar olan *Lactobacillus plantarum* SN13T ve *Pediococcus pentosaceus* LP28 ile fermente edilerek, lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücreleri üzerindeki biyoaktivitesinin artırılıp artırılmayacağını araştırmışlardır. Mentha özütünde bulunan rosmarinik asit (RA) ve kafeik asit (CA) metabolizmasının, daha güçlü bir LPS kaynaklı nitrik oksit inhibitörü olan dihidrokafeik asit (DHCA) üretimiyle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Mentha özütü içinde çoğaltılan *L. plantarum* SN13T suşunda *hcrA*, *hcrB* ve *hcrC* genlerinin zamana bağlı olarak anlamlı düzeyde aşırı ifade edildiği gözlemlenmiştir. Bu bulgular, fenolik asit metabolizmasının Mentha özütünün biyoaktivitesini artırmadaki rolünü desteklemektedir (Shakya vd., 2024).

El Far vd. (2024) yaptıkları çalışmada, laktik asit bakteri suşlarını izole ederek MALDI-TOF kütle spektrometrisi ile tanımlamışlardır. Diyet takviyelerinden izole edilen dört laktik asit bakterisi suşu (P2: *Lactobacillus acidophilus*, P3: *Lactiplantibacillus plantarum*, P4: *Lacticaseibacillus rhamnosus*, P5: *Pediococcus acidilactici*) ile iki referans suşu test edilmiş ve izole edilen LAB suşları, pH 3'te direnç gösterirken, pH 2'de pepsin varlığında hayatta kalmada P2 hariç %1 log'dan az azalma gözlenmiş ve %0,3 öküç safrasına tolerans sağlanmıştır. Tüm suşlar pankreatine dirençli olup, hidrofobisite ve otoagregasyon kapasiteleri değişkenlik göstermiştir. P3 ve P5 suşları, safra tuzu hidroliz aktivitesi göstermiştir. Zaman öldürme testlerinde, *L. rhamnosus* P4 suşunun süpernatantı, *E. coli* ve *S. aureus* üzerinde seftazidim ve gentamisin ile sinerjik etki sergilemiş, ayrıca *P. acidilactici* P5 suşunun süpernatantı ile seftazidimin kombinasyonu *S. aureus*'a karşı umut verici sinerjistik aktivite göstermiştir (El Far vd., 2024).

Davran Bulut vd. (2025) yaptıkları çalışmada, kateşinin iyi bilinen probiyotik bakteriler *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (LA-5) ve *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (LGG) üzerindeki probiyotik özelliklere etkisini (bakteriyel büyüme, oto-agregasyon, ko-agregasyon) ve kateşin-probiyotik sinbiyotik kombinasyonunun kolon kanseri hücreleri (Caco-2) üzerindeki *in vitro* sitotoksik etkilerini değerlendirmeyi amaçlamışlardır (Davran Bulut vd., 2025). Elde edilen sonuçlarda kateşinin LA-5'in büyümesini, oto-agregasyonunu ve *Staphylococcus aureus* ile ko-agregasyonunu artırdığını göstermiştir. Ayrıca kateşin, LA-5 ve LGG'nin adezyon potansiyelini sırasıyla %6 ve %5 oranında artırmıştır. Kateşin varlığında çoğaltılan *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (LGG) suşu, kontrol grubundaki LGG'ye kıyasla %30 daha yüksek DPPH radikal temizleme aktivitesi göstermiştir. Bunun yanı sıra, kateşin varlığında çoğaltılan LA-5, kontrol gruba kıyasla Caco-2 hücrelerinde daha yüksek oranda hücre ölümünü indüklemiş, ancak genotoksisite üzerinde belirgin bir etkisi gözlemlenmemiştir. Kateşin, LGG'nin kolon kanseri hücre hattındaki sitotoksisite ve genotoksisite etkilerini anlamlı düzeyde etkilememiştir. Sonuç olarak kateşinin probiyotiklerin fizyolojik fonksiyonlarını artırdığını ve kateşin-probiyotik sinbiyotiklerinin kolon kanserinin önlenmesi veya tedavisinde potansiyel bir strateji olabileceğini gösterilmiştir (Davran Bulut vd., 2025). Sonuç olarak, son yıllarda yapılan bu proteomik ve fizyolojik analizler, probiyotik bakterilerin fenolik bileşiklerle kurduğu ilişkinin oldukça karmaşık ve çok yönlü

olduğunu ortaya koymuştur. Fenolik bileşikler, probiyotiklerin metabolik yollarını ve stres yanıtlarını modüle ederken, aynı zamanda biyotransformasyon yoluyla bu bileşiklerin biyoyararlanımını da artırmaktadır. Bu çift yönlü etkileşim, fonksiyonel gıda geliştirme ve hedefe yönelik probiyotik seçimi açısından önemli biyoteknolojik fırsatlar sunmaktadır. Bu güncel çalışmaların ortak noktası, fenolik bileşiklerin probiyotik bakterilerin stres toleransı, yüzey protein yapısı, metabolik yolları ve antimikrobiyal aktiviteleri üzerinde doğrudan etkili olduğunu ve bu etkilerin proteom düzeyinde detaylı biçimde izlenebildiğini göstermesidir. Aynı zamanda fenolik bileşiklerin probiyotikler tarafından biyotransformasyona uğratılabilmesi, bu maddelerin biyoyararlanımını artırmakta ve konak sağlığı üzerinde olumlu etkiler yaratmaktadır. Bu nedenle, fenolik bileşiklerle desteklenen probiyotik formülasyonların hem fonksiyonel gıda hem de farmabiotik ürünlerin geliştirilmesinde öncü bir rol oynayacağı öngörülmektedir.

3. MATERYAL VE METOT

Bu bölümde, tez çalışması kapsamında yapılmış olan deneylerin materyal ve metotları özetlenmiştir.

3.1. Karvakrolün *Lactcaseibacillus rhamnosus* GG Probiyotik Bakterisi Üzerindeki Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi

Karvakrolün *Lactcaseibacillus rhamnosus* GG üzerindeki MİK değerinin belirlenmesi için Broth mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır (Klančnik vd., 2010). Karvakrol, etanol içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır. 96'lık steril mikrolaka içerisine 180 µL laktik asit bakterileri için tasarlanmış yarı sentetik besiyeri (LABSEM), farklı konsantrasyonlarda (0-800 µg/mL) 10 µL karvakrol ve 10 µL LGG stok kültürü eklenmiştir. Kontrol grubu olarak sadece LGG (karvakrol içermeyen, 0 µg/mL) kültürü kullanılmıştır. Bakteri kültürleri 37°C'de çalkalamasız olarak 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda canlılığın gözlemlenmediği en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak belirlenmiştir (Klančnik vd., 2010).

3.2. Karvakrolün Probiyotik Bakterisi *Lactcaseibacillus rhamnosus* GG Gelişimi Üzerine Etkileri

Lactcaseibacillus rhamnosus GG (LGG), LABSEM besiyerinde 37°C'de çalkalanmadan büyütülmüştür (Celebioglu vd., 2018). Bakteri kültürleri farklı gruplara ayrılıp değişen konsantrasyonlarda (0-300 µg/mL) karvakrol uygulanmıştır.

3.3. Karvakrolün *Lactcaseibacillus rhamnosus* GG'nin Pepsine ve Safra Tuzuna olan Dayanıklılığına Etkisi

Pepsin ve safra tuzu toleransı, Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide testi ile 96'lı mikrolakalarda belirlenmiştir (Erciyes vd., 2025). Kontrol ve muamele grupları büyüme sonrası santrifüjle toplanıp, PBS ile yıkanmıştır. Pepsine olan dayanıklılık analizi için gruplar, 3 mg/mL pepsin içeren PBS içinde 37°C'de 3 saat inkübe edilmiştir. Safra tuzuna olan dayanıklılık analizi için gruplar, 2 mg/mL safra tuzunu içeren PBS içinde 37°C'de 3 saat inkübe edilmiştir. Ardından, örnekler 4 saat boyunca 96'lı mikrolakalarda 1 mg/mL MTT ile inkübe edilmiştir. Plaklardaki örneklerin optik

yoğunlukları mikro-plaka okuyucuda 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Bakteriyel canlılık, muamele edilen grupların absorbans yüzdesi olarak kontrol grubunun absorbansına göre hesaplanmıştır.

3.4. Karvakrolün Probiyotik Oto-agregasyon Üzerine Etkileri

Bakteri hücreleri geç logaritmik fazda (3200xg, 15 dakika) harvest edilmiş, fosfatla tamponlanmış salin (PBS) ile yıkanıp ardından PBS içinde OD₆₀₀ değeri 0.5 olacak şekilde yeniden süspansiyon oluşturulmuştur.

Oto-agregasyon, 4 mL bakteriyel süspansiyonun 10 saniye boyunca vorteks edildikten sonra deney tüplerine eklenmesi ve (1 saat, oda sıcaklığı) inkübe edilmesi ile belirlenmiştir (Kos vd., 2003). Ardından, süspansiyonun üst kısmından 100 µL alınıp, içerisine 900 µL PBS içeren bir tüpe eklenerek 600 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. Oto-agregasyon yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Oto-agregasyon} = (1 - A_t / A_0) \times 100$$

Burada, A_t inkübasyon sonrası ölçülen absorbansı temsil ederken, A₀ inkübasyon öncesi ölçülen absorbansı ifade etmektedir (Kos vd., 2003).

3.5. Karvakrolün Probiyotik-Patojen Ko-agregasyonu Üzerine Etkileri

Ko-agregasyon, *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG probiyotik bakterisi ile *Escherichia coli* (*E. coli*) ve *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) patojenleri kullanılarak belirlenmiştir (Kos vd., 2003). Farklı türden mikroorganizmaların birbirine yapışarak oluşturduğu topluluklar ko-agregasyon olarak adlandırılmaktadır (Kos vd., 2003). Probiyotik bakteriler, kontrol grubu ve 25, 50, 100, 200 ve 300 µg/mL konsantrasyonlarında karvakrol uygulanan farklı muamele gruplarında çoğaltılmıştır. Kültürler geç logaritmik fazda toplanmıştır (3200xg, 15 dakika), daha sonra PBS ile yıkanıp OD₆₀₀ değeri 0.5 olacak şekilde PBS içinde yeniden süspansiyon yapılmıştır (Kos vd., 2003). Ardından, 2 mL probiyotik süspansiyonu, 2 mL *E. coli* veya *S. aureus* süspansiyonuyla karıştırılmıştır. Her saatte bir, süspansiyonun üst kısmından 100 µL alınmış, 900 µL PBS

ile karıştırılıp absorbans 600 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Ko-agregasyon yüzdesi yukarıdaki oto-agregasyon formülü ile aynı formül kullanılarak hesaplanmıştır (Kos vd., 2003).

3.6. Karvakrolün *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG'nin Adezyon Özelliğine Etkisi

Adezyon testi, Leccese Terraf ve ark. (2014) tarafından tanımlanan yöntemle göre 96'lı mikrotiplerde yapılmıştır (Leccese Terraf vd., 2014).

Plakalar, 200 µL PBS içinde 1 mg/mL müsinle kaplanıp 4°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Plakadaki kuyucuklar PBS ile yıkanmıştır. Adezyon testi için, LGG karvakrol ile muamele edilmiş ve karvakrolsuz kontrol grubu olarak LABSEM besiyerinde, 37 °C'de çalkalamadan kültüre alınmıştır. Probiyotikler geç logaritmik fazda 3200xg'de 15 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası, pelletler PBS ile yıkanıp ve PBS içinde OD₆₀₀ değeri 1.5 olacak şekilde yeniden süspansiyon elde edilmiştir.

Her kuyucuğa 200 µL LGG süspansiyonu eklenerek plakalar 37°C'de 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. 200 µL PBS ile yıkama işlemiyle yapışmayan hücreler çıkarılıp sonra yapışmış hücreler kristal violet ile boyanmıştır. Her kuyuya kristal violet eklenerek 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Ardından kristal violet çekilip üzerine 200 µL iyot çözeltisi eklenerek inkübe edilmiştir. 2-3 dakika sonra, plaka 2 kez PBS ile yıkanıp boya, %30 asetik asit (200 µL) ile çıkarılmıştır. Absorbans, 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Leccese Terraf vd., 2014).

3.7. *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG Hücresiz Süpernatantlarının (HS) Hazırlanması

Lactocaseibacillus rhamnosus GG LABSEM besiyerinde 37°C'de çalkalanmadan büyütülüp ardından, kültürler santrifüj edilmiştir (3200xg, 15 dakika) ve süpernatant alınıp, ardından (0.22 µm şırınga filtreleriyle) süzölmüştür. Hücresiz süpernatantlar (HS), deneylere kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.8. Karvakrolün *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG'nin Antioksidan Özelliğine Etkisi

LGG'nin karvakrol varlığında büyütülmesinin antioksidan etkileri, serbest radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (Brand-Williams vd., 1995) ve 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) testleri (Re vd., 1999) kullanılarak incelenmiştir. DPPH testi için, 25 mg/L DPPH metanol içinde çözölmüştür. Hücresiz süpernatant (HS) (100 µL) ve DPPH (100 µL), 96-lı plakaya eklenip (30 dakika, oda sıcaklığı, karanlıkta) inkübe edilmiştir. Absorbans 517 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçölmüştür. ABTS antioksidan testi, Re ve ark. (1999) tarafından tanımlanan yöntemde bazı değışiklikler yapılarak 96'lı plakada yapılmıştır (Re vd., 1999). ABTS, su içinde 7 mM konsantrasyonda hazırlanmış ve ABTS stok çözeltisi, 2.45 mM potasyum persülfat (son konsantrasyon) ile karıştırılıp ardından karışım kullanımdan önce oda sıcaklığında 12-16 saat boyunca karanlıkta tutulmuştur. Hazırlanan ABTS çözeltisi, 734 nm dalga boyunda 0.7 absorbansa sahip olacak şekilde etanol ile seyreltilmiştir. HS (100 µL) ve ABTS (100 µL), bir 96'lı plakaya eklenip (6 dakika, oda sıcaklığı, karanlıkta) inkübe edilmiştir. Absorbans 734 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçölmüştür. Azalan emilim, yani kalan DPPH ve ABTS miktarı, serbest radikal toplama miktarı yani antioksidan aktivite olarak belirlenmiştir. Göreceli antioksidan aktiviteler, emilimlerin başlangıçtaki DPPH ve ABTS çözeltisinin emilimine göre azalma yüzdesi olarak hesaplanmıştır.

3.9. Fenolik Bileşiklerin Probiyotik Bakterilerin Safra Tuzu Hidrolaz (BSH) Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri

BSH aktivitesi hem kalitatif hem de kantitatif olmak üzere iki farklı yöntem ile ölçölmüştür.

a. BSH Enzim Aktivitesinin Kalitatif Tayini

Farklı konsantrasyonlardaki fenolik bileşikler probiyotik bakterilerin besiyerine eklenip, probiyotik bakteriler 37°C'de çalkalamadan 16 saat boyunca (logaritmik fazın sonuna kadar) LABSEM içerisinde çoğaltılmıştır. Çoğaltılan 10 µL probiyotik bakteri, %0,05

(a/h) deoksikolik asit ve %0,037 kalsiyum klorür içeren LABSEM agar üzerine inoküle edilmiştir. Plakalar 37°C'de çalkalamasız olarak 16 saat boyunca (logaritmik fazın sonuna kadar) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra oluşan büyüme zone, bakterilerin safra tuzu hidrolaz aktivitesini belirlemede kullanılmıştır (Xu vd., 2016).

b. BSH Enzim Aktivitesinin Kantitatif Tayini

BSH aktivitesi, konjuge safra tuzlarından serbest kalan amino asit miktarının ölçülmesiyle belirlenmiştir (Xu vd., 2016). Farklı konsantrasyonlardaki fenolik bileşikler probiyotik bakterilerin besiyerine eklenip, probiyotik bakteriler 37°C'de çalkalamasız olarak 16 saat boyunca (logaritmik fazın sonuna kadar) LABSEM içerisinde çoğaltılmıştır (kontrol grubunda fenolik bileşik bulunmamaktadır). Çoğaltılan probiyotik bakteriler, santrifüj (3000×g, 15 dakika) edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet 10 mM içeren 0.1 M sodyum fosfat tamponu (pH 6.8) ile iki kere yıkanmıştır. Enzim oksidasyonunu azaltmak için 10 mM'lik bir ditiyotritol (DTT) konsantrasyonu kullanılmıştır. Pellet aynı tampon ile 600 nm'de 1.0 optik absorbansa süspanse edilmiştir. Hücre süspansiyonu, sonikatör kullanılarak buz üzerinde soğutma ile 60 saniye sonike edilmiş ve 3000×g, 15 dakika santrifüj edilmiştir. Bir tüp içerisine, 180 µL 0,1 M sodyum fosfat tamponu (pH 6.0), 10 µL 200 mM uygun konjuge safra tuzu (taurokolik asidin sodyum tuzu), 10 mM DTT ve 10 µL hücresiz ekstraktı koyulmuş ve reaksiyon 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler temiz bir tüpe 100 µL konulup üzerine 200 µL %15 trikloroasetik asit eklenmiştir. Örnekler santrifüj (3000×g, 15 dakika) edilip süpernatantlar temiz bir tüpe alınmıştır. Örneklerin üzerine 200 µL distile su ve üzerine 1,9 mL ninhidrin reaktifi (0,7 mL 0,5M pH 5,5 sodyum sitrat tomponu, 5 mg ninhidrin, 1,2 mL gliserol) eklenmiştir. Örnekler 14 dakika kaynatılıp soğuduktan sonra 570 nm'de absorbans alınmıştır (Xu vd., 2016).

3.10. Proteom Analizleri için Örnek Hazırlığı

Probiyotik bakterisi LGG aerobik koşullarda çalkalama yapılmadan LABSEM içinde büyütülmüş (37°C; 50 mL batch kültürleri), geç log-fazda harvest edilmiştir. Ekzoproteom, süpernatantın (3200xg, 10 dakika) santrifüjlenmesi, süzülmesi (0.22 µm şırınga filtreleri) ve konsantre edilmesi (AmiconR©Ultra-15 Santrifüj Filtre Cihazları;

Millipore) ile hazırlanmıştır (Majumder vd., 2011). Protein örnekleri, soğutulmuş aseton içinde -20°C 'de 10% TCA ile bir gece boyunca çöktürölüp, üç kez %100 aseton ile yıkanmıştır. Protein pelletleri rehidrasyon tamponunda (8 M üre, 2 M tiyoüre, 2% CHAPS, 1% IPG tampon pH 3-10; GE Life Sciences) çözölüp ardından protein konsantrasyonu belirlenmiştir (2D Quant kit; GE Life Sciences).

3.11. 2 Boyutlu Jel Elektroforezi (2-DE)

Bakteriyel ekzoproteom örnekleri (50 μg), 2-DE ile ayrılıp görüntü analizi gerçekleştirilmiştir (Dowsey vd., 2009). Birinci boyut ayrımı, pH 3–10 aralığında 7 cm uzunluğundaki IPG stripler (ReadyStrip™ IPG Strips; Bio-Rad) kullanılarak PROTEAN® i12™ IEF (Bio-Rad) cihazında yapılmıştır. Odaklama protokolünde, stripler önce 250 V'de 15 dakika, ardından 4000 V'de 1 saat çalıştırılmış ve voltaj kademeli olarak artırılarak toplam 15.000 Vh'ye ulaşınca kadar 500 V'de inkübe edilmiştir.

Stripler daha sonra, serbest tiyol gruplarının alkilasyonu için iki aşamalı dengeleme işlemine tabi tutulmuştur. İlk dengeleme tamponu 65 mM DTT içerirken, ikinci dengeleme tamponunda 135 mM iyodoasetamid kullanılmıştır. Her iki tampon da 6 M üre, %30 gliserol, 50 mM Tris-HCl (pH 8.8), %0.01 bromofenol mavisi ve %2 SDS kullanılarak hazırlanmıştır.

İkinci boyut (SDS-PAGE) ayrımı, %12,5 Tris-HCl konsantrasyonuna sahip önceden dökölmüş 11 cm jeller (Bio-Rad) kullanılarak Criterion™ Midi-format elektroforez hücresinde (Bio-Rad) gerçekleştirilmiştir. Elektroforez, sırasıyla 100 V'de 5 dakika, 150 V'de 20 dakika ve 200 V'de 30 dakika uygulanarak tamamlanmıştır.

Jeller, kolloidal Coomassie Brilliant Blue (CBB) yöntemiyle boyanmış (Candiano et al., 2004), ardından Microtek ScanMaker 9800 XL (Microtek) cihazı ile taranmış ve Progenesis SameSpots (sürüm 3.3) yazılımı ile analiz edilmiştir. Hacim oranında ≥ 2 kat değişim, ANOVA $p \leq 0.08$ ve yanıltıcı bulgu oranı (q) ≤ 0.05 kriterlerini karşılayan protein noktaları tanımlama için seçilmiştir. Bu değerlendirme, en az üç bağımsız deneyden elde edilen jeller temel alınarak yapılmıştır.

3.12. Kütle Spektrometrisi ile Protein Tanımlama

Protein profili analizleri, Ultraflextreme MALDI-TOF MS cihazı (Bruker Daltonics, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizler, yansıtıcı pozitif modda (reflection positive mode) ve topraklı çelik (ground steel) hedef plakası kullanılarak yapılmıştır. Matris olarak, %30 asetonitril ve %70 0.1% TFA içeren su çözeltisinde hazırlanmış doygun α -Cyano-4-hydroxy cinnamic acid (HCCA) çözeltisi tercih edilmiştir. Örnek hazırlığında, her bir örnek üzerine 5 μ L matris çözeltisi eklenmiş, ardından bu karışımdan 1 μ L alınarak hedef plaka üzerine damlatılmış ve "dried droplet" yöntemi ile kurutulmuştur. Cihazın kalibrasyonu, 700–3500 Da aralığında Bruker Peptide Calibration Mix kullanılarak yapılmıştır. MALDI-MS analizlerinde, hızlandırıcı voltaj 20 kV, UV lazer dalga boyu 337 nm, dedektör kazancı 1990 V olarak ayarlanmış ve her spektrum için 10.000 lazer atışı uygulanmıştır. Elde edilen spektrumlar Bruker flexAnalysis yazılımı (Bruker Daltonics) kullanılarak analiz edilmiştir. MS/MS analizleri LIFT modu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Parent iyonlar için en az 10^4 yoğunluk elde edildikten sonra, her biri 1000 lazer atışından oluşan döngülerle, parent iyon yoğunluğu azalana kadar fragment iyonlar toplanmıştır. MS/MS analiz parametreleri ise şu şekilde ayarlanmıştır: yansıtıcı hızlandırma voltajı (reflector 1) 29.45 kV, LIFT voltajı 19 kV ve dedektör kazancı 2200 V.

3.13. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizleri gerçekleştirmek için GraphPad Prism 8 paket programı kullanılmıştır. Gruplar arasındaki farklar Tek Yönlü Varyans Analizi (One-way ANOVA) ile değerlendirilip, çoklu karşılaştırmalar için Tukey'in testi kullanılmıştır. Nicel veriler ortalama ve standart sapma olarak ifade edilip (ortalama $\pm$ SD) ve $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

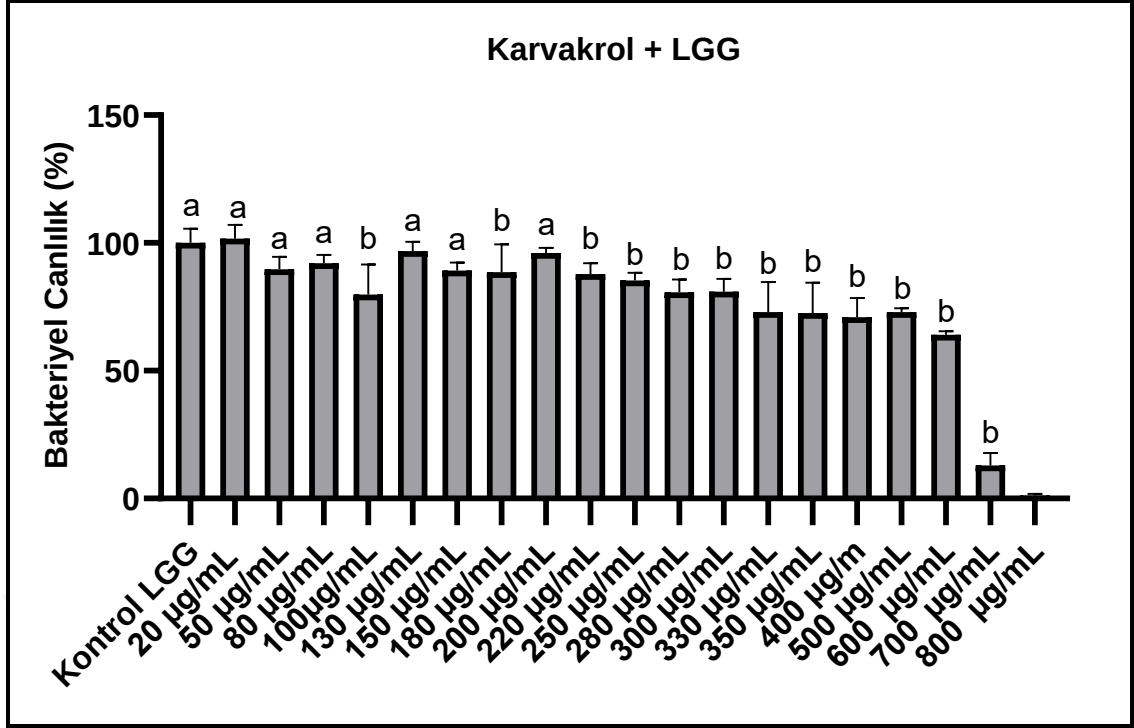
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde, dneysel çalışmalae sonucu elde edilmiş bulgular özetlenmiş ve literatüre dayanarak tartışılmıştır.

4.1. Karvakrolün *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG Probiyotik Bakterisi Üzerindeki Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi

Şekil 4.1’de, farklı konsantrasyonlarda karvakrol uygulanarak muamele edilen *L. rhamnosus* GG suşunun minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerleri gösterilmektedir. MİK belirleme çalışmasında 0–800 µg/mL aralığındaki karvakrol konsantrasyonları değerlendirilmiş ve MİK değeri ≥ 800 µg/mL olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, karvakrolsuz kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 25, 50, 100, 200 ve 300 µg/mL konsantrasyonlarındaki karvakrolün LGG’nin büyümesini desteklediği tespit edilmiştir. Bu nedenle, tez kapsamında kullanılacak karvakrol konsantrasyonları 25, 50, 100, 200 ve 300 µg/mL olarak belirlenmiştir.

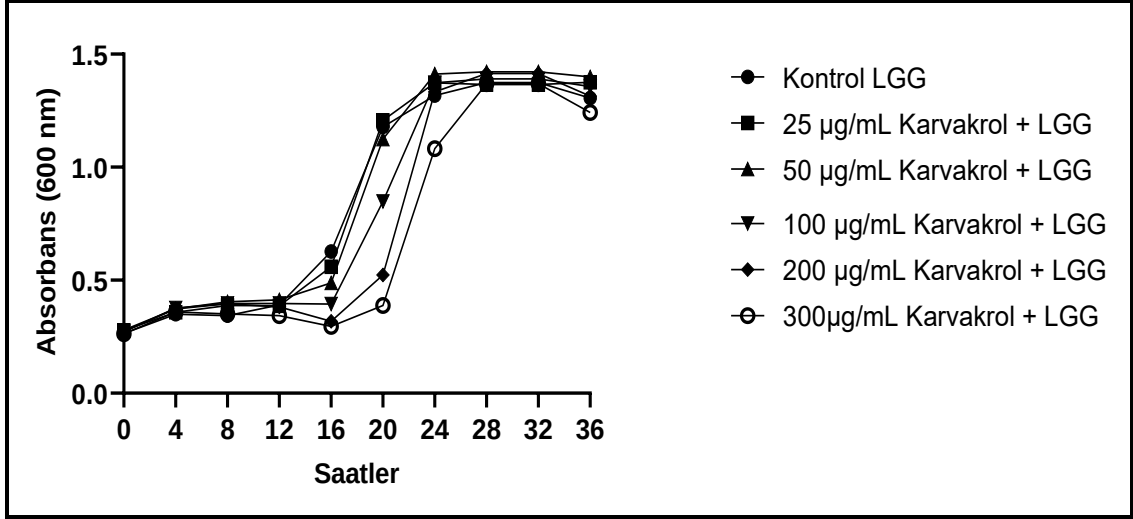
Bao vd. (2025) tarafından yapılan çalışma ile elde edilen sonuçlar, bu tezde elde edilen bulgularla tutarlılık göstermektedir. Söz konusu çalışmada, uçucu yağlar ve polifenollerin birleşik etkileri potansiyel antibiyotik alternatifleri olarak değerlendirilmiştir. Üzüm posası ekstraktı ile timol-karvakrol kombinasyonu kullanılarak, 0–1000 ppm aralığında MİK (minimum inhibisyon konsantrasyonu) belirleme çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* gibi patojenik bakterilerin yanı sıra *Lactiplantibacillus plantarum* probiyotik suşu üzerinde de testler yapılmıştır. Kombinasyon, patojen bakterilere karşı çeşitli düzeylerde antibakteriyel aktivite gösterirken; *L. plantarum* için ise belirli konsantrasyonlarda büyümeyi destekleyici etki göstermiştir. Bu bulgular, fenolik bileşiklerin bazı probiyotik bakterilerin büyümesini destekleyebileceğini ortaya koymaktadır (Bao vd., 2025).



Şekil 4.1: Farklı konsantrasyonlarda karvakrol ile muamele edilmiş LGG bakterilerinin minimum inhibisyon konsantrasyonu. Kontrol grubunda karvakrol bulunmamaktadır. Farklı harfler (a, b), gruplar arasında istatistiksel olarak anlam ($p < 0.05$) ifade etmektedir.

4.2. Karvakrolün *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG'nin Gelişimi Üzerindeki Etkileri

Şekil 4.2, farklı konsantrasyonlardaki karvakrol ile muamele edilen *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG (LGG)'nin mikrobiyal gelişim kinetiğini göstermektedir. Elde edilen bulgular, hiçbir karvakrol konsantrasyonunun LGG üzerinde inhibe edici bir etki oluşturmadığını ortaya koymuştur. Karvakrol kekik bitkisinde bulunan başlıca fenolik bileşiklerden biri olup güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olmasıyla bilinmektedir (Magi vd., 2015). Ancak bu çalışmada, karvakrolün probiyotik bir bakteri olan LGG üzerinde herhangi bir inhibisyon etkisi göstermediği belirlenmiştir.



Şekil 4.2: Farklı konsantrasyonlarda karvakrol ile muamele edilmiş LGG bakterilerinin gelişim kinetiği. Kontrol grubunda karvakrol bulunmamaktadır.

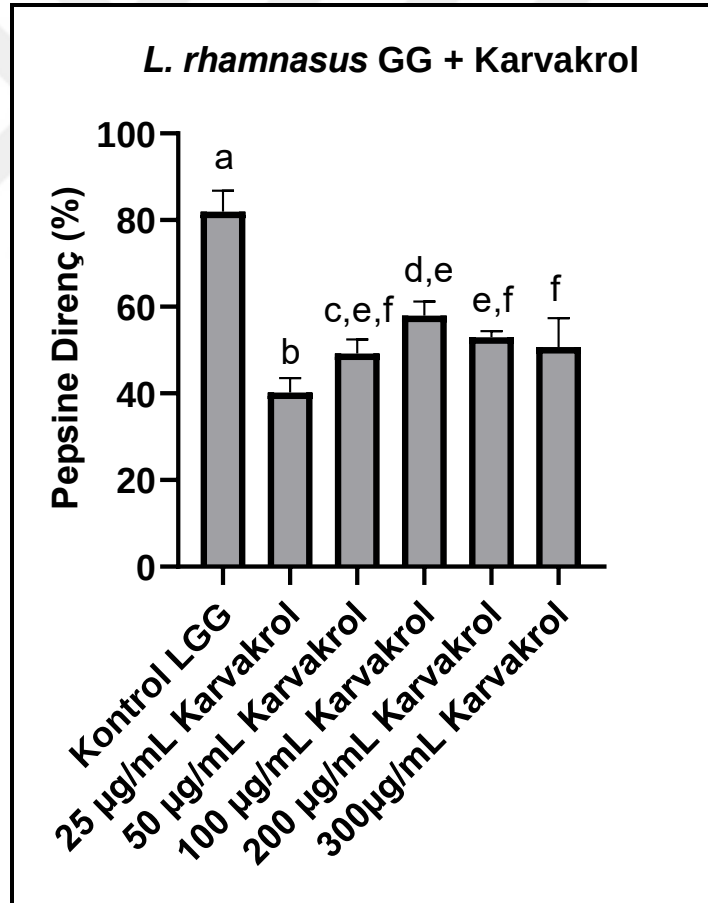
4.3. Karvakrolün *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG'nin Pepsin ve Safra Tuzu Dayanıklılığı Üzerindeki Etkisi

Şekil 4.3, farklı konsantrasyonlarda karvakrol ile muamele edilmiş LGG bakterilerinin pepsine olan dayanıklılık özelliği üzerine etkilerini göstermektedir. Kontrol grubundaki LGG'nin pepsine karşı direnci %82 olarak belirlenmiştir. Karvakrol ile muamele edilen LGG suşlarında ise pepsine karşı direnç oranları sırasıyla; 25 µg/mL'de %40, 50 µg/mL'de %49, 100 µg/mL'de %57, 200 µg/mL'de %53 ve 300 µg/mL'de %51 olarak ölçülmüştür. Tüm karvakrol konsantrasyonlarında pepsine karşı dirençte belirgin bir azalma gözlemlenmiştir.

Tumbariski vd. (2025) yapmış olduğu çalışmada, 4 farklı *Lactobacillus* suşunun (*Lactocaseibacillus casei* RC-1, *Lactobacillus acidophilus* RC-2, *Lactocaseibacillus rhamnosus* RC-10 ve *Lactocaseibacillus casei* ATCC) simüle edilmiş üst gastrointestinal sistem koşullarına direnci incelenmiştir. Çalışma sonucunda, bu dört suşun pH 2.5 ve pepsin varlığında %60-80 arasında canlı kalma oranı gösterdikleri tespit edilmiştir (Tumbariski vd., 2025).

Bu veriler ışığında, karvakrol ile muamele edilen LGG'nin mide enzimlerine karşı hayatta kalma kapasitesinde azalma meydana geldiği, bu etkinin karvakrol

konsantrasyonuna bağı olarak değişebileceği ve probiyotik suşun fizyolojik yanıt kapasitesine göre farklılık gösterebileceği düşünülmektedir. Ayrıca, pepsin dayanıklılığı probiyotiklerin mide asidinden korunma yeteneğinin önemli bir göstergesi olduğundan, gözlemlenen azalma LGG'nin gastrointestinal sistemdeki etkinliğini olumsuz etkileyebilir. Karvakrolün, probiyotik hücre duvarı yapısını veya stres yanıt mekanizmalarını etkileyerek bu dirençte değişikliğe yol açması muhtemel olmakla birlikte, bu mekanizmaların detaylı incelenmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Sinbiyotik formülasyonlarda karvakrolün kullanımının hem antimikrobiyal etkileri hem de probiyotiklerin dayanıklılığı üzerindeki etkileri dikkatle dengelenmelidir. Bu nedenle, *in vivo* çalışmalarla desteklenecek kapsamlı araştırmalar, karvakrolün probiyotiklerle birlikte güvenli ve etkili kullanımını sağlamak açısından önem taşımaktadır.



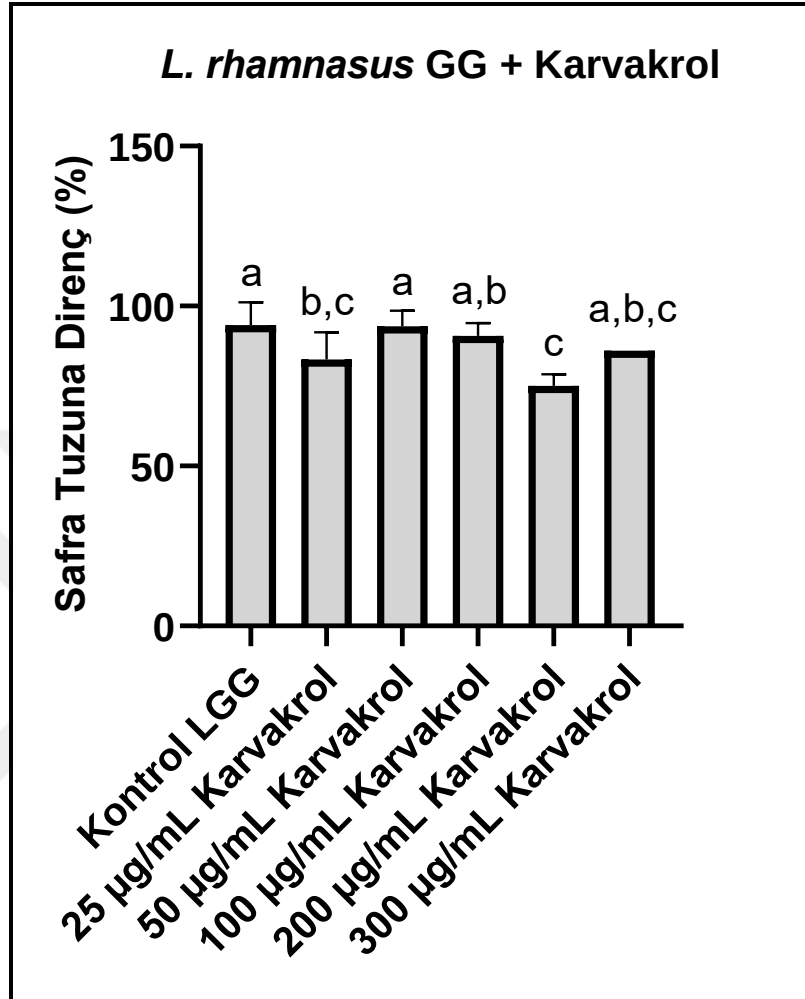
Şekil 4.3: Farklı konsantrasyonlarda karvakrol ile muamele edilmiş LGG bakterilerinin pepsine karşı direnci. Kontrol grubunda karvakrol bulunmamaktadır. Farklı harfler (a, b, c, d, e, f), gruplar arasında istatistiksel olarak anlam ($p < 0.05$) ifade etmektedir.

Şekil 4.4, farklı konsantrasyonlarda karvakrol ile muamele edilen LGG bakterilerinin safra tuzuna olan dayanıklılık özelliği üzerine etkilerini göstermektedir. Kontrol grubundaki LGG'nin safra tuzuna karşı direnci %94 olarak belirlenmiştir. Karvakrol muamelesi sonrası safra tuzuna direnç oranları ise sırasıyla; 25 µg/mL'de %83, 50 µg/mL'de %93, 100 µg/mL'de %90, 200 µg/mL'de %75 ve 300 µg/mL'de %86 olarak ölçülmüştür. Özellikle 50 µg/mL karvakrol ile büyütülen LGG'nin safra tuzuna direnci kontrole göre değişmemiş ve bu konsantrasyonda LGG'nin safra tuzuna karşı dayanıklılığını koruduğu görülmüştür. Bu sonuç, karvakrolün LGG'nin safra tuzuna karşı dayanıklılığını artırmadığını göstermektedir.

Begley vd. (2006) tarafından yapılan çalışmada, probiyotik bakterilerde safra tuzu hidrolaz (BSH) aktivitesi ve safra tuzlarına karşı direnç incelenmiştir. Çalışmada, *Lactobacillus rhamnosus* GG suşu dahil olmak üzere çeşitli probiyotik suşların, safra tuzu içeren ortamlarda hayatta kalma kapasiteleri değerlendirilmiştir. Sonuçlar, LGG'nin 0.3% konsantrasyondaki safra tuzu ortamında yüksek canlılık sergilediğini ve genel olarak probiyotik bakterilerin bu toksik bileşenlere karşı direnç geliştirmek için BSH aktivitesinin kritik bir rol oynadığını göstermiştir. BSH enzimi, konjuge safra tuzlarını dekonjuge ederek bunların toksik etkilerini azaltmakta ve böylece bakterilerin gastrointestinal ortamda hayatta kalmasını sağlamaktadır. Bu mekanizma, LGG'nin safra tuzlarına karşı dayanıklılığını artırmaktadır ve bu da probiyotik etkinliğinin devamlılığı açısından önem taşımaktadır (Begley vd., 2006).

Sonuç olarak, bu çalışmada LGG'nin karvakrol ile muamelesi, safra tuzlarına karşı direnç üzerinde belirgin bir etki göstermemiştir. Kontrol grubundaki %94 olan safra tuzu toleransı, 50 µg/mL karvakrol konsantrasyonunda %93 ile sabit kalmış, ancak 200 µg/mL'de %75'e düşerek yüksek karvakrol konsantrasyonlarının olumsuz etkileri olabileceğini düşündürmüştür. Bu bulgu, karvakrolün LGG'nin safra tuzlarına karşı dayanıklılığını artırmaktan ziyade, bazı dozlarda bu özelliğini zayıflatabileceğini ortaya koymaktadır. Begley vd. (2006) çalışmasında da LGG'nin safra tuzu dayanıklılığının büyük ölçüde BSH aktivitesine bağlı olduğu belirtilmiştir (Begley vd., 2006). Bu bağlamda, karvakrolün LGG'nin BSH aktivitesi ve dolayısıyla safra toleransı üzerindeki etkisinin konsantrasyona duyarlı ve sınırlı olduğu anlaşılmaktadır. Elde edilen bu sonuçlar, fenolik bileşiklerin sinbiyotik formülasyonlarda dikkatli doz ayarlamalarıyla

kullanılmasının önemini vurgulamaktadır.



Şekil 4.4: Farklı konsantrasyonlarda karvakrol ile muamele edilmiş LGG bakterilerinin safra tuzuna karşı direnci. Kontrol grubunda karvakrol bulunmamaktadır. Farklı harfler (a, b, c), gruplar arasında istatistiksel olarak anlam ($p < 0.05$) ifade etmektedir.

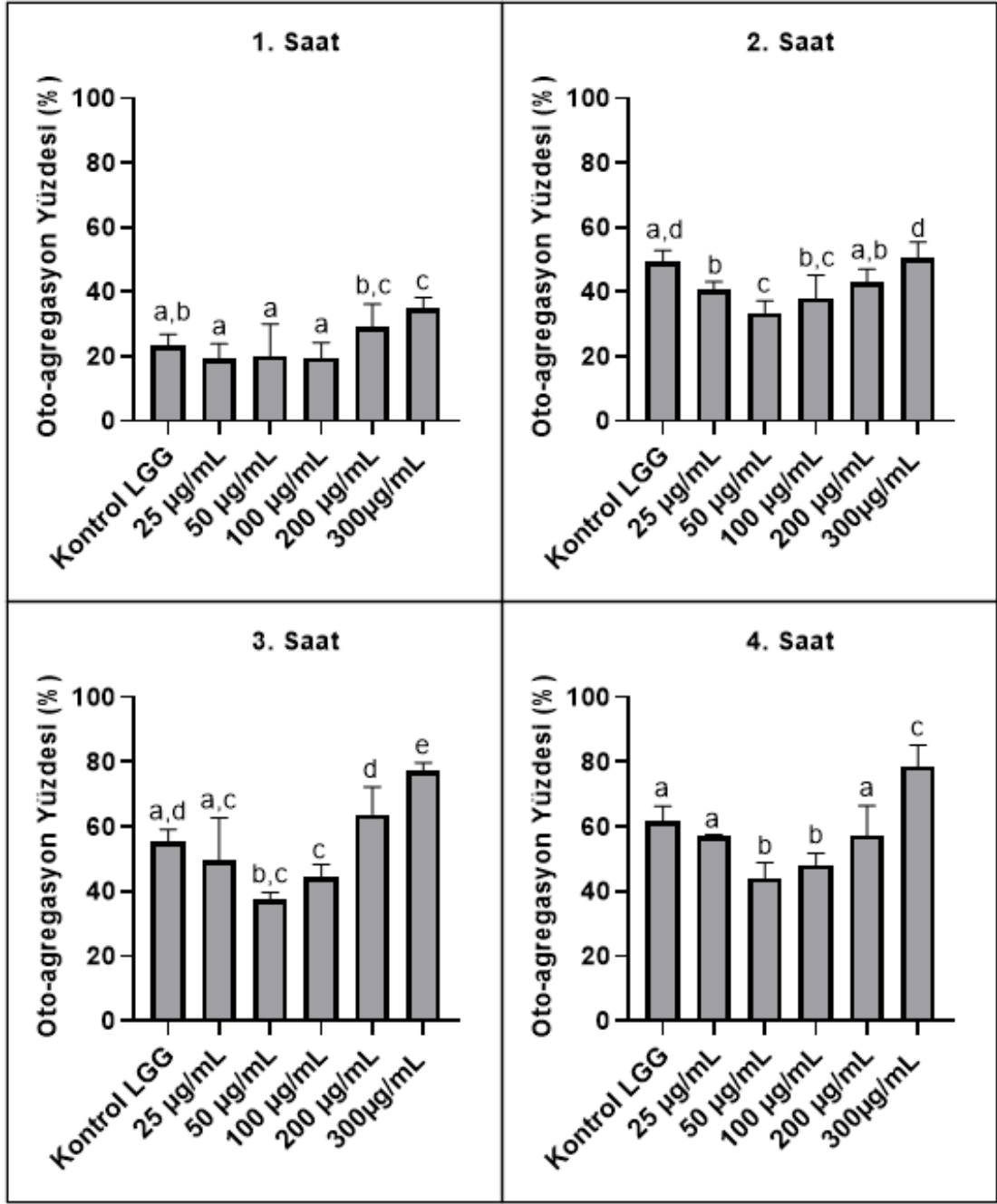
4.4. Karvakrolün *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG'nin Oto-agregasyon Özelliği Üzerine Etkisi

Şekil 4.5, farklı karvakrol konsantrasyonlarının dört saat boyunca *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (LGG) bakterisinin oto-agregasyonuna etkilerini göstermektedir. Birinci saatte, 300 µg/mL karvakrol ile muamele edilen LGG'de oto-agregasyonda %12 artış

gözlenmiştir. 25, 50, 100 ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında ise oto-agregasyonda istatistiksel olarak anlamlı bir değişim ($p<0.05$) saptanmamıştır. İkinci saatte, 25, 50 ve 100 µg/mL karvakrol konsantrasyonlarında sırasıyla %9, %14 ve %11 azalma gözlenirken, 200 ve 300 µg/mL konsantrasyonlarında anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Üçüncü saatte, 300 µg/mL karvakrol konsantrasyonunda %22'lik bir artış gerçekleşmiş; diğer konsantrasyonlarda ise anlamlı değişim tespit edilmemiştir. Dördüncü saatte ise 50 µg/mL konsantrasyonunda %17 azalma, 300 µg/mL konsantrasyonunda ise %18 artış görülmüş, 25, 100 ve 200 µg/mL'de ise anlamlı bir değişiklik olmamıştır.

Dos vd. (2019) yaptığı çalışmada, *Lactobacillus* suşları, kuersetin ve resveratrol gibi fenolik bileşiklerle muamele edildiğinde, bu fenolik bileşiklerin hiçbir konsantrasyonunda, probiyotik oto-agregasyon kapasitesine olumsuz etkide bulunmadığı rapor edilmiştir. Bu sonuçlar, probiyotik bakteriler ile fenolik bileşiklerin sinbiyotik etkileşimlerinde oto-agregasyon özelliğinin olumsuz etkilenmediğini göstermemektedir (Dos Santos vd., 2019).

Sonuç olarak, bu çalışmada karvakrolün farklı konsantrasyonlarının LGG'nin oto-agregasyon kapasitesi üzerindeki etkileri değerlendirilmiş ve özellikle 300 µg/mL konsantrasyonunda belirgin artışlar gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, bazı düşük konsantrasyonlarda ise azalmalar tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen bulgular, Dos vd. (2019) fenolik bileşiklerle yaptıkları çalışmalardan kısmen farklıdır ve bu durum, farklı fenolik bileşiklerin probiyotiklerin hücre yüzeyi özellikleri üzerindeki etkilerinin bileşiğe ve konsantrasyona bağlı olarak değişebileceğini ortaya koymaktadır. Bu bağlamda, karvakrolün yüksek konsantrasyonlarda LGG'nin oto-agregasyonunu artırıcı potansiyeli olması, sinbiyotik formülasyonlar açısından dikkate değer bir bulgu olarak değerlendirilebilir.

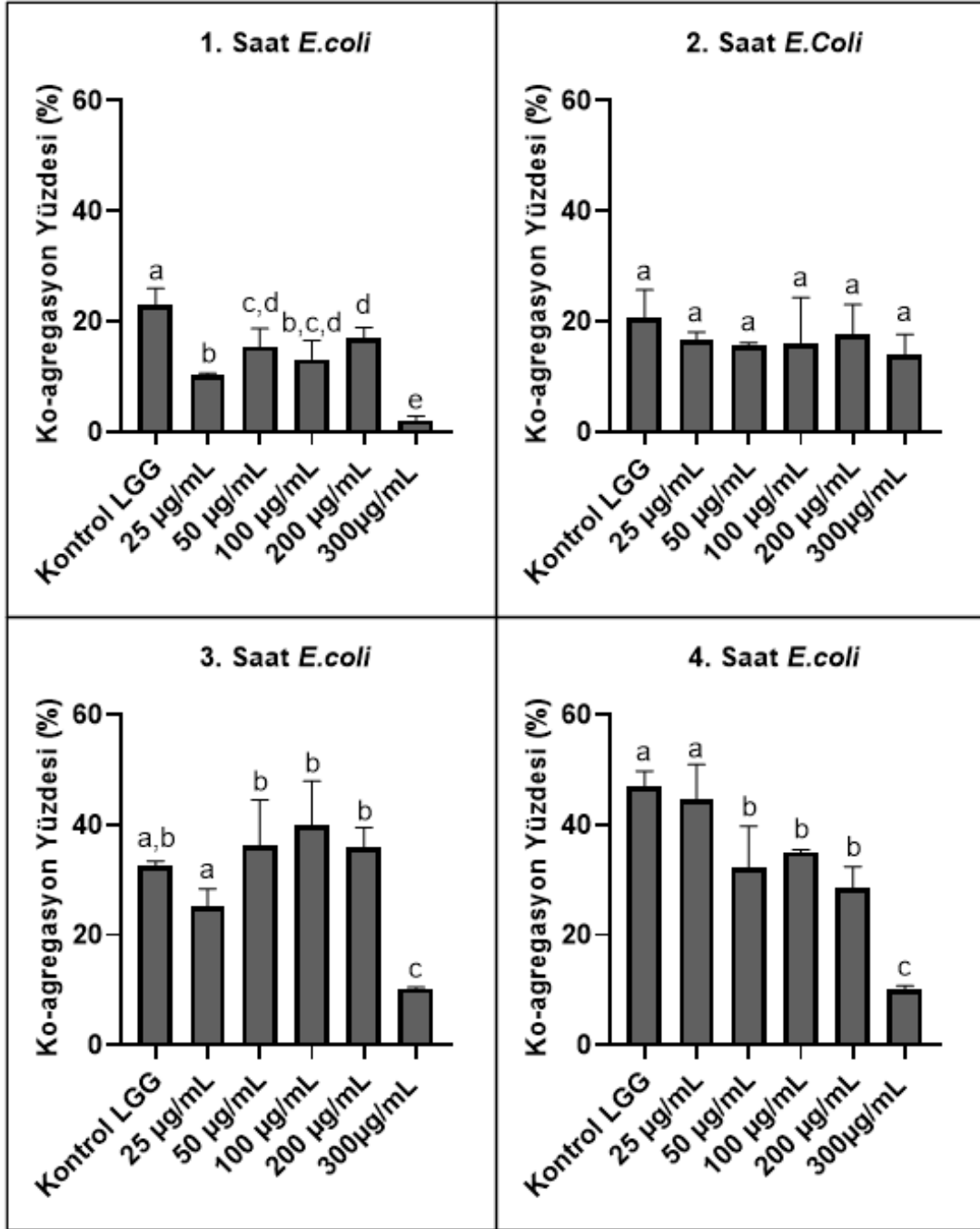


Şekil 4.5: Farklı konsantrasyonlarda karvakrol ile muamele edilmiş LGG bakterilerinin oto-agregasyonu. Kontrol grubunda karvakrol bulunmamaktadır. Farklı harfler (a, b, c), gruplar arasında istatistiksel olarak anlam ($p < 0.05$) ifade etmektedir.

4.5. Karvakrolün *Lactacaseibacillus rhamnosus* GG'nin Ko-agregasyon Özelliği Üzerine Etkisi

Farklı türlere ait mikroorganizmaların birbirine tutunarak oluşturdıkları topluluklara ko-agregasyon denilmektedir. Bu tez çalışmasında, bir bakteri olan *Lactacaseibacillus rhamnosus* GG (LGG)'nin, patojenik suşlar olan *Escherichia coli* (*E. coli*) ve *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ile ko-agregasyon kapasitesi ve karvakrolün bu özellik üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.

Şekil 4.6, farklı karvakrol konsantrasyonlarının dört saatlik süre boyunca LGG'nin *E.coli* ile ko-agregasyonu üzerindeki etkilerini göstermektedir. İlk iki saatte, tüm karvakrol konsantrasyonlarında *E.coli* ile ko-agregasyon yüzdesinde azalma gözlenmiştir. Üçüncü ve dördüncü saatlerde ise karvakrol varlığında LGG'nin çoğaltılması, LGG'nin *E.coli* ile ko-agregasyonunda 200 ve 300 µg/mL konsantrasyonlarında anlamlı bir etki göstermiştir.



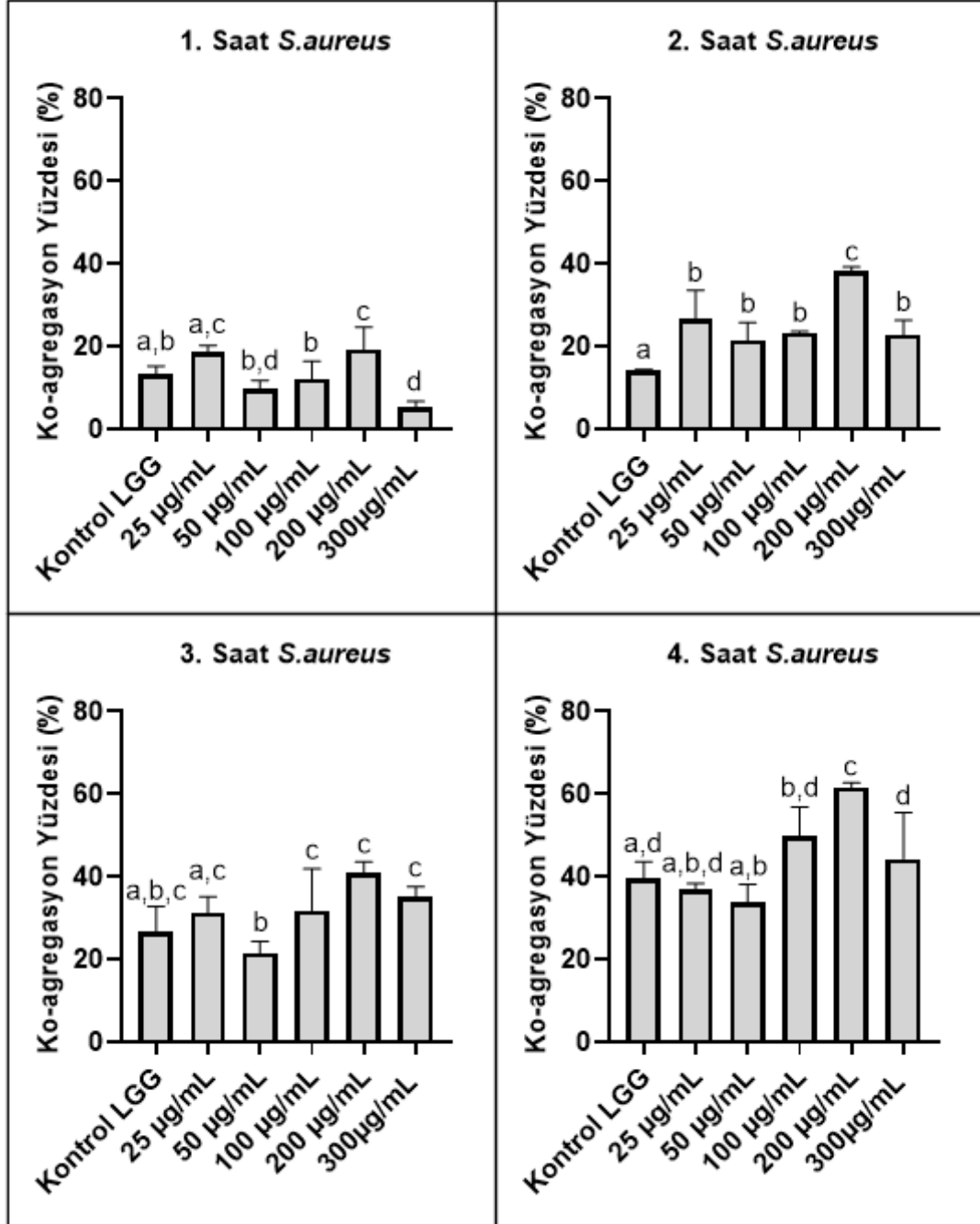
Şekil 4.6: Farklı konsantrasyonlarda karvakrol ile muamele edilmiş LGG bakterilerinin *E. coli* ko-agregasyonu. Kontrol grubunda karvakrol bulunmamaktadır. Farklı harfler (a, b, c), gruplar arasında istatistiksel olarak anlam ($p < 0.05$) ifade etmektedir.

Şekil 4.7, farklı karvakrol konsantrasyonlarının dört saatlik süre boyunca LGG'nin *Staphylococcus aureus* (*S. Aureus*) ile ko-agregasyonu üzerindeki etkilerini göstermektedir. Birinci saatte, 25 ve 200 µg/mL karvakrol konsantrasyonlarında *S. aureus* ile ko-agregasyon yüzdesinde %6 artış gözlenmiştir. İkinci saatte 200 µg/mL konsantrasyondaki LGG %24 ile en yüksek ko-agregasyon yüzdeliğini gösterirken diğer konsantrasyonlarda da LGG'nin *S. aureus* ile ko-agregasyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ($p<0.05$) artırmıştır. Üçüncü saatte en yüksek 200 µg/mL konsantrasyonda %14 ve dördüncü saatte 200 µg/mL konsantrasyonda %22 artış ile karvakrol uygulaması diğer tüm konsantrasyonlar ile de, LGG'nin *S. aureus* ile ko-agregasyonuna anlamlı bir etki göstermiştir.

Dos vd. (2019) yaptığı çalışmada, *Lactobacillus* suşları, kuersetin ve resveratrol gibi fenolik bileşiklerle muamele edildiğinde, bu fenolik bileşiklerin *Lactobacillus* suşlarının ko-agregasyon özelliğini de artırdığı ve patojen mikroorganizmalarla rekabetlerini desteklediği belirtilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen bulgularla tutarlı şekilde, kuersetin konsantrasyonlarının *L. plantarum* 49, *L. plantarum* 53 ve *L. paracasei* 108'in *L. monocytogenes* ve *E. coli* ile koagregasyon kapasitesini artırdığı; resveratrol konsantrasyonlarının ise aynı suşların *E. coli* ile koagregasyonunu artırdığı bildirilmiştir (Dos Santos vd., 2019). Sonuç olarak, fenolik bileşiklerin yalnızca antimikrobiyal etkileriyle değil, aynı zamanda mikrobiyotayı düzenleyici ve probiyotik aktiviteyi destekleyici potansiyelleriyle de öne çıktığı söylenebilir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında karvakrolün farklı konsantrasyonlarda LGG'nin *E. coli* ve *S. aureus* ile olan ko-agregasyon kapasitesi üzerindeki etkileri değerlendirilmiş, özellikle ilk saatlerde ko-agregasyon yüzdesinde genel bir azalma gözlemlenmiştir. Ancak, 200 µg/mL karvakrol konsantrasyonu ikinci saatte LGG'nin *S. aureus* ile ko-agregasyonunu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırmıştır. Bu sonuçlar, Dos vd. (2019) çalışmalarıyla karşılaştırıldığında, onların kuersetin ve resveratrol gibi fenolik bileşiklerin *Lactobacillus* suşlarının patojen mikroorganizmalarla ko-agregasyon kapasitesini artırdığını bildirmeleriyle kısmen örtüşmektedir. Ancak bu tez çalışmasında, karvakrolün etkisinin fenolik bileşik türüne, hedef patojen suşa ve uygulama süresine bağlı olarak değişkenlik gösterdiği anlaşılmaktadır. Dolayısıyla, karvakrolün fenolik bir bileşik olarak ko-agregasyon üzerinde sınırlı ama potansiyel olarak olumlu etkileri

olduğu, ancak bu etkinin zamana ve konsantrasyona bağlı olduğu söylenebilir. Bu bulgular, fenolik bileşiklerin sadece antimikrobiyal olarak değil, aynı zamanda probiyotik-patojen etkileşimlerini düzenleyici yönde de kullanılabileceğine işaret etmektedir.



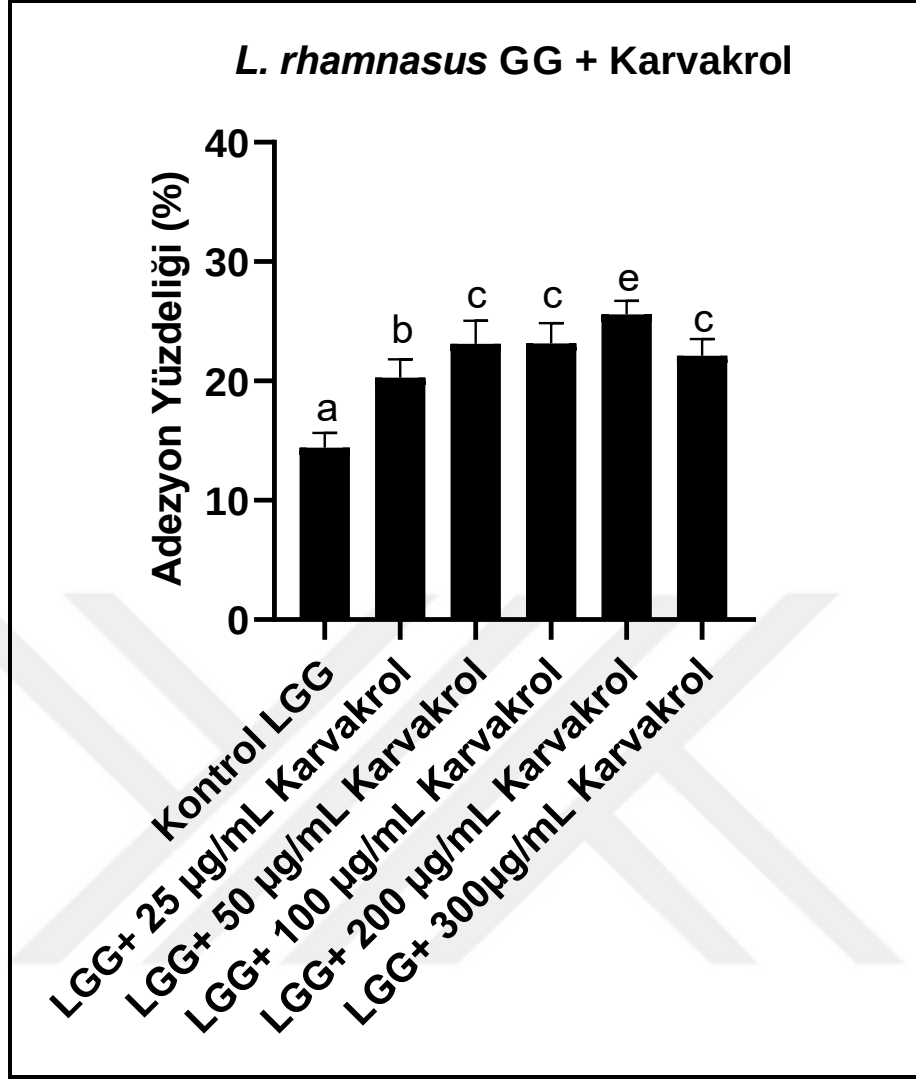
Şekil 4.7: Farklı konsantrasyonlarda karvakrol ile muamele edilmiş LGG bakterilerinin *S. aureus* ko-agregasyonu. Kontrol grubunda karvakrol bulunmamaktadır. Farklı harfler (a, b, c, d, e), gruplar arasında istatistiksel olarak anlam ($p < 0.05$) ifade etmektedir.

4.6. Karvakrolün *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG'nin Adezyon Özelliğine Etkisi

Şekil 4.8, farklı konsantrasyonlarda karvakrol varlığında çoğaltılmış LGG bakterilerinin adezyon özelliği üzerine etkilerini göstermektedir. Karvakrolün 25, 50, 100 ve 300 µg/mL konsantrasyonlarında LGG'nin adezyon yüzdesinde artış gözlemlenmiştir. Kontrol grubunda %14 olan adezyon oranı, 200 µg/mL karvakrol konsantrasyonunda %25'e yükselmiş ve bu %11'lik artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Probiyotik bakterilerin konakçı üzerindeki yararlı etkilerini sürdürebilmesi için gastrointestinal mukozaya etkin bir şekilde tutunmaları, yani yüksek adezyon kapasitelerine sahip olmaları gerekmektedir. Leska vd. (2022) *in vitro* olarak Caco-2 ve HT-29-MTX epitel hücre hatları üzerinde yaptığı kapsamlı bir çalışmada, farklı LAB suşlarının adezyon kapasitelerinin %17.7 ile %37.2 arasında değişkenlik gösterdiği gözlemlenmiştir (Leska vd., 2022).

Bu bağlamda, LGG'nin karvakrol ile muamelesi sonucunda adezyon kapasitesinde anlamlı bir artış gözlemlenmiş olması, karvakrolün probiyotik fonksiyonları destekleyici bir ajan olarak potansiyelini ortaya koymaktadır. Özellikle 200 µg/mL konsantrasyonunda LGG'nin adezyon kapasitesinin, kontrol grubuna kıyasla %11 oranında artması, probiyotik bakterilerin gastrointestinal sistemde tutunma kapasitelerinin karvakrol gibi fenolik bileşiklerle iyileştirilebileceğini göstermektedir. Bu bağlamda, LGG'nin karvakrol ile muamele edildiğinde adezyon kapasitesinin literatüre uygun şekilde arttığını ve probiyotiklerin fonksiyonel potansiyellerinin güçlendirilebileceğini göstermektedir. Dolayısıyla karvakrol, probiyotiklerin konakçı mukozasına tutunmasını destekleyerek, fonksiyonel gıda uygulamalarında kullanılabilecek etkili bir biyolojik modülatör aday olarak öne çıkmaktadır.



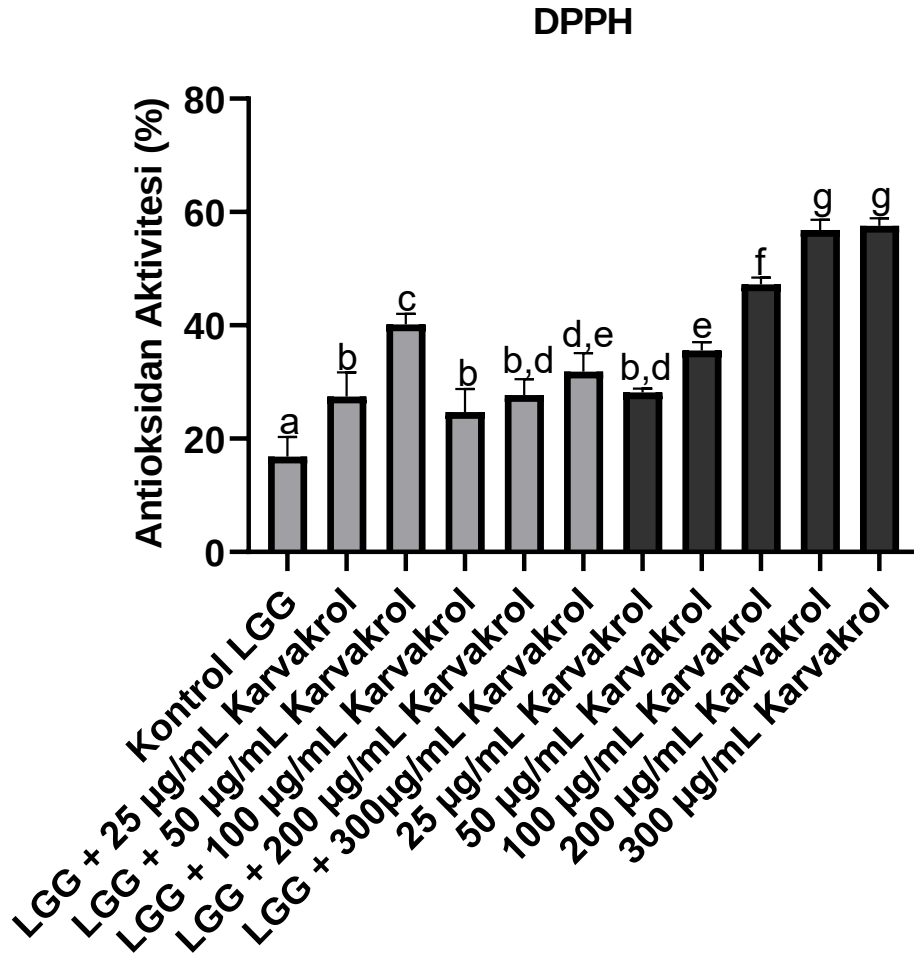
Şekil 4.8: Farklı konsantrasyonlarda karvakrol ile muamele edilmiş LGG bakterilerinin adezyon yüzdeliği. Kontrol grubunda karvakrol bulunmamaktadır. Farklı harfler (a, b, c, d, e), gruplar arasında istatistiksel olarak anlam ($p<0.05$) ifade etmektedir.

4.7. Karvakrolün *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG'nin Antioksidan Özelliğine Etkisi

Kekik yağı ve kekik suyunun ana bileşeni olan karvakrolün, bir çok sentetik antioksidanlardan daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Chroho vd., 2024). Şekil 4.9'da, farklı konsantrasyonlarda karvakrol varlığında çoğaltılmış LGG'nin DPPH radikal süpürücü etkisi gösterilmektedir. Karvakrol tek başına tüm konsantrasyonlarda %28-%57 arasında antioksidan aktivite (DPPH süpürücü

etki) göstermektedir. LGG bakterisi ise tek başına %16 oranında DPPH radikal süpürme kapasitesi göstermiştir.

Karvakrol ile muamele edilen LGG suşunun gösterdiği antioksidan aktivite ise %24 ile %40 arasında değişmiştir. Bu sinbiyotik etkileşim, her iki bileşiğin tek başına sergilediği aktivite düzeylerinin üzerine çıkmamış; karvakrolün doğrudan etkisinin, LGG ile birlikte kullanıldığında tam olarak yansımadığı görülmüştür. Bu durum, karvakrolün antioksidan kapasitesinin LGG tarafından kısmen sınırlanabileceğini ya da etkileşimin antioksidan mekanizmayı sinerjik olarak değil, bireysel olarak sürdürdüğünü düşündürmektedir.



Şekil 4.9: Farklı konsantrasyonlarda karvakrol ile muamele edilmiş LGG bakterilerinin ve karvakrolün DPPH radikal süpürücü etkisi. Kontrol grubunda karvakrol bulunmamaktadır. Farklı harfler (a, b, c, d, e, f, g), gruplar arasında istatistiksel

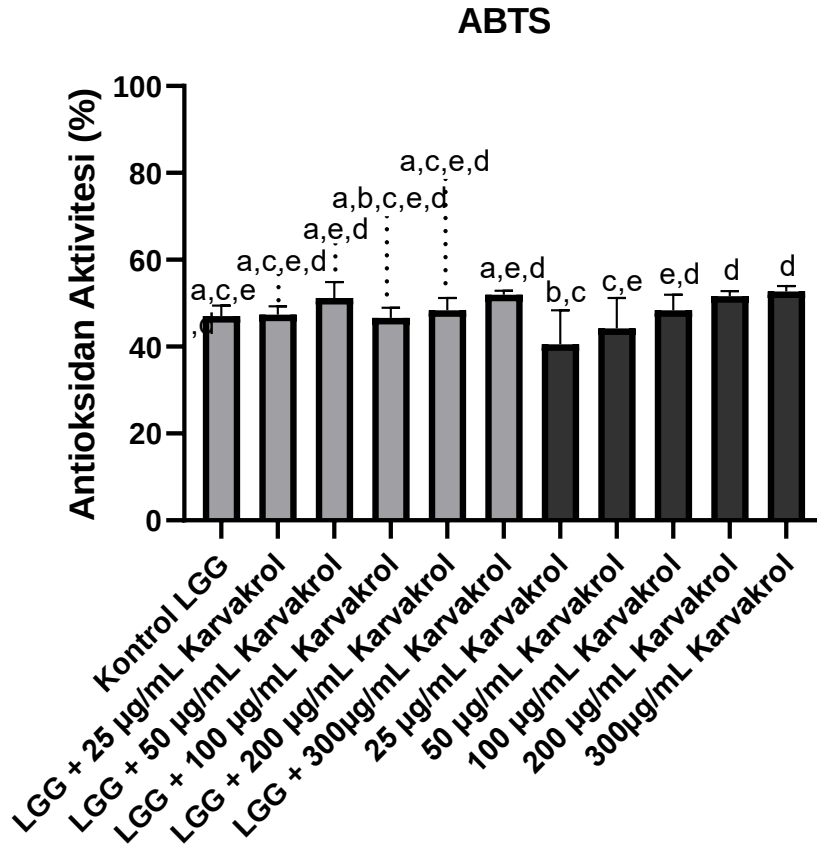
olarak anlam ($p < 0.05$) ifade etmektedir.

Şekil 4.10, farklı konsantrasyonlarda karvakrol varlığında çoğaltılmış LGG'nin ABTS radikal süpürücü etkisini göstermektedir. ABTS radikal süpürücü etkide, tek başlarına karvakrol %40-52 ve LGG %40 antioksidan özellik gösterirken karvakrol ile büyütülen LGG, %46-51 arası antioksidan aktivite göstermektedir. Bu sinbiyotik etkileşim, karvakrolün veya LGG'nin tek başına gösterdiği ABTS radikal süpürücü etkiden daha yüksek bir antioksidan aktivite göstermemektedir.

Fenolik bileşikler, sahip oldukları hidroksil grupları sayesinde serbest radikalleri etkisiz hale getirebilme kabiliyetleri ile güçlü antioksidan özellikler sergilemektedir (Pereira vd., 2009). Bu bileşikler hem doğrudan redoks potansiyelleriyle hem de enzimatik yollarla antioksidan savunma sistemlerini modüle ederek oksidatif stresi azaltabilmektedir. Al mansori vd. (2020), karvakrolün *in vitro* FRAP, DPPH ve TEAC analizlerinde 50 ila 1000 ppm aralığında artan konsantrasyonlarla birlikte antioksidan aktivitesinin de anlamlı şekilde yükseldiğini bildirmişlerdir (Al-Mansori vd., 2020). Benzer şekilde, Ozturk vd. (2024), laktik asit bakterileriyle fermente edilen bitkisel infüzyonlarda, oplam fenolik madde içeriğinin arttığını ve buna bağlı olarak DPPH ve ABTS gibi antioksidan aktivite parametrelerinde anlamlı yükselmeler gözlemlendiğini raporlamışlardır (Ozturk vd., 2024). Wang vd. (2023) ise *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus acidophilus* kullanılarak fermente edilen incir sularında toplam fenolik bileşiklerin ve antioksidan enzim aktivitelerinin arttığını göstermiştir. Bu bulgular, probiyotik destekli fonksiyonel gıdalarda fenolik bileşiklerin kullanımının hem bilimsel hem de uygulamalı açıdan anlamlı bir strateji olduğunu ortaya koymaktadır (Wang vd., 2023). Ayrıca Kim vd. (2022) yapmış olduğu çalışmada, LAB'nin DPPH radikal temizleme aktivitesi %2,55-6,88 aralığında, ABTS radikal temizleme aktivitesi ise %19,69-86,26 arasında olduğunu bulmuşlardır (Kim vd., 2022).

Sonuç olarak, bu çalışmada karvakrol ve LGG'nin ayrı ayrı anlamlı düzeyde antioksidan aktivite gösterdiği, ancak birlikte kullanıldıklarında bu etkilerin belirgin bir sinerji yaratmadığı gözlemlenmiştir. Bu durum, karvakrolün güçlü antioksidan yapısının LGG tarafından kısmen korunabildiğini göstermektedir. Ancak fenolik-probiyotik kombinasyonunun etkisi, kullanılan konsantrasyon ve inkübasyon süresi gibi faktörlere bağlı olarak değişebileceğinden, daha yüksek sinerji hedefleniyorsa bu parametrelerin dikkatle optimize edilmesi gerektiği anlaşılmaktadır. Bulgular, Al-Mansori vd. (2020)'nin karvakrolün konsantrasyona bağlı etkilerini desteklerken, Öztürk vd. (2024)

ve Wang vd. (2023) tarafından bildirilen fermente fenolik bileşiklerin antioksidan kapasiteyi artırdığına yönelik bulgularla kısmen örtüşmemektedir. Bununla birlikte, elde edilen değerlerin Kim vd. (2022)'nin LAB suşları için bildirdiği aralıklarla uyumlu olması, çalışmadaki verilerin literatürle genel olarak tutarlı olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.10: Farklı konsantrasyonlarda karvakrol ile muamele edilmiş LGG bakterilerinin ve karvakrolün ABTS radikal süpürücü etkisi. Kontrol grubunda karvakrol bulunmamaktadır. Farklı harfler (a, b, c, d, e), gruplar arasında istatistiksel olarak anlam ($p < 0.05$) ifade etmektedir.

4.8. Karvakrolün Probiyotik Safra Tuzu Hidrolaz (BSH) Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkileri

Safra Tuzu Hidrolazı (BSH), bağırsak mikropları tarafından ikincil safra asitlerine dönüştürülmeleri için gerekli olan safra asitlerinin kritik dekonjugasyonunu başlatan bir bakteriyel enzimdir (Linhorst ve Lübke, 2022). Bu tez çalışmasında, karvakrolün LGG'de bulunan BSH enzimi üzerine etkileri, hem kalitatif hem de kantitatif yöntemle araştırılmıştır.

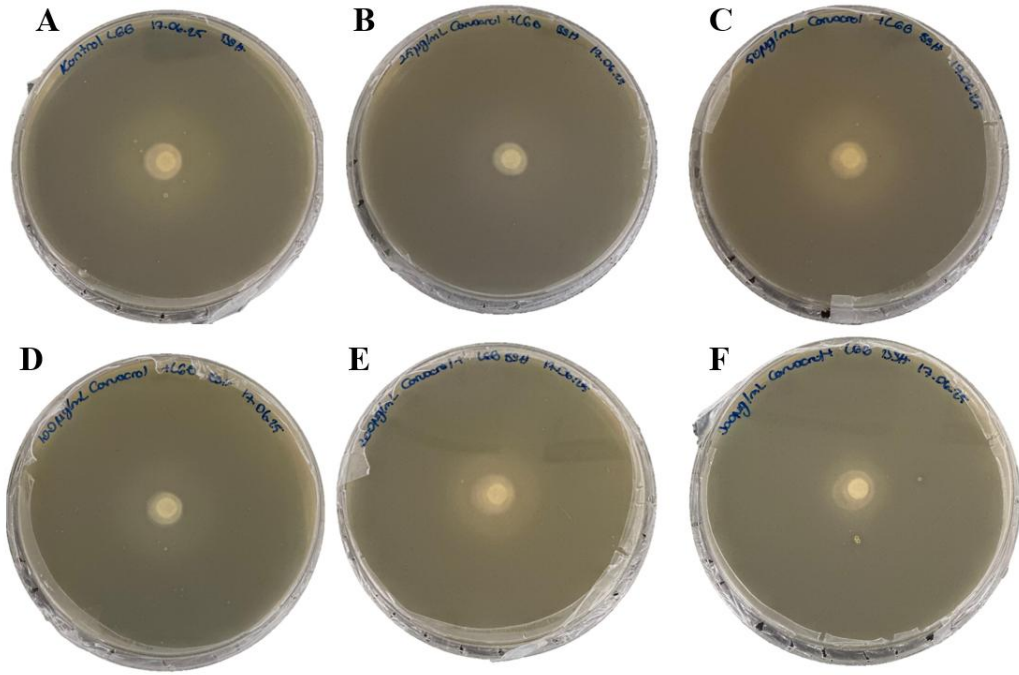
a. BSH Enzim Aktivitesinin Kalitatif Tayini

Şekil 4.11 farklı konsantrasyonlarda karvakrol ile muamele edilen *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG (LGG) suşunun safra tuzu hidrolazı (BSH) enzim aktivitesinin kalitatif tayin sonuçlarını göstermektedir. Zon çapları sırasıyla A'da (Kontrol LGG) 14 mm, B'de (25 µg/mL Karvakrol ile büyütülmüş LGG) 16 mm, C'de (50 µg/mL Karvakrol ile büyütülmüş LGG) 20 mm, D'de (100 µg/mL Karvakrol ile büyütülmüş LGG) 22,5 mm, E'de (200 µg/mL Karvakrol ile büyütülmüş LGG) 26 mm ve F'de (300 µg/mL Karvakrol ile büyütülmüş LGG) 30 mm olarak ölçülmüştür. Probiyotik bakterilerde safra tuzu hidrolazı (BSH) enziminin varlığı, onların safra tuzlarına karşı dayanıklılığını artırmakla birlikte, konak organizmada kan kolesterol düzeyinin düşürülmesine de katkı sağlar (Noriega ve ark., 2006). Bu enzim, safra asitlerinin amid bağını (taurin ya da glisinle bağlı olan kısmı) hidrolize ederek serbest safra asitleri oluşturur. BSH enzim aktivitesinin kalitatif tayininde oluşan zonlar, konjuge bir safra asidi olan deoksikolik asidin hidrolizini göstererek LGG tarafından BSH enzimi üretildiğine dair kalitatif bir kanıt sunmaktadır. Karvakrol uygulanan tüm gruplarda kontrol grubuna kıyasla zon çapında artış gözlemlenmiş olup, bu durum LGG–karvakrol sinbiyotik etkileşiminin BSH enzim üretimini olumlu yönde etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Shehata vd. (2016), taurodeoksikolik asit içeren MRS agar ortamında gerçekleştirdikleri çalışmada, dokuz laktik asit bakterisi izolatından sekizinin farklı düzeylerde BSH aktivitesi sergilediğini bildirmiştir. Bu izolatlardan beşi, kolonileri çevreleyen 2 mm'nin üzerindeki geniş çökeltme zonlarıyla yüksek BSH aktivitesi gösterirken, dört suş ise 1,5 mm'nin altındaki daha küçük zonlarla düşük aktivite düzeyine sahip olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar, BSH enzim aktivitesinin suşlara özgü olduğunu ve izolatlar arasında anlamlı farklılıklar gösterebildiğini ortaya koymaktadır (Shehata vd., 2016).

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında karvakrol ile muamele edilen LGG bakterilerinin tüm konsantrasyonlarında, kontrol grubuna kıyasla daha geniş zon çaplarının gözlemlenmesi, LGG'nin BSH enzimi üretiminde artış olduğunu kalitatif olarak ortaya koymaktadır. En yüksek zon çapı 30 mm ile en yüksek karvakrol konsantrasyonunda elde edilmiş olup, bu durum karvakrolün LGG'nin BSH aktivitesini artırıcı yönde etkileyebileceğini

düşündürmektedir. Bu bulgular, Shehata vd. (2016) çalışmasıyla karşılaştırıldığında, onların farklı LAB suşları arasında gözlemlediği zon çapına bağlı BSH aktivite düzeylerinin suşlar arası farklılık gösterebildiğini ortaya koymasıyla paralellik göstermektedir. Bu bağlamda, karvakrol ile oluşturulan sinbiyotik etkileşim, LGG suşunun BSH enzimi üretimini artırarak hem safra tuzlarına dirençliliğini güçlendirebilir hem de kolesterol metabolizması üzerinde dolaylı olarak olumlu etkiler sağlayabilir. Elde edilen veriler, karvakrolün probiyotik işlevleri destekleyici bir biyoaktif bileşik olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.



Şekil 4.11: Farklı konsantrasyonlarda karvakrol ile muamele edilmiş LGG bakterilerinin BSH enzim aktivitesinin kalitatif tayini. Kontrol grubunda karvakrol bulunmamaktadır (A; Kontrol LGG, B; 25 µg/mL Karvakrol +LGG, C; 50 µg/mL Karvakrol +LGG, D; 100 µg/mL Karvakrol +LGG, E; 200 µg/mL Karvakrol +LGG ve F; 300 µg/mL Karvakrol +LGG'yi göstermektedir.).

b. BSH Enzim Aktivitesinin Kantitatif Tayini

Şekil 4.12 ve Tablo 4.1, farklı konsantrasyonlarda karvakrol varlığında çoğaltılmış LGG bakterilerinin BSH enzim aktivitesi ve spesifik aktivite değerlerini göstermektedir. Enzim aktivitesi, serbest amino asit miktarına göre $\mu\text{mol/mL}$ biriminde hesaplanmış; spesifik aktivite ise enzim aktivitesinin toplam protein miktarına oranlanılarak U/mg biriminde ifade edilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla karvakrol uygulanan tüm gruplarda spesifik enzim aktivitesinde artış gözlenmiş, özellikle $200 \mu\text{g/mL}$ ve $300 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). En yüksek spesifik aktivite, $38,97 \text{ U/mg}$ ile $300 \mu\text{g/mL}$ karvakrol grubunda ölçülmüştür. Bu durum, yüksek karvakrol konsantrasyonlarının LGG'nin BSH enzimi üretimini artırabileceğini göstermektedir. Böylece karvakrol, probiyotik bakterinin safra tuzlarına karşı dayanıklılığını artırarak gastrointestinal ortamda hayatta kalma potansiyelini güçlendiren bir ajan olarak sinbiyotik etki gösterebilir.

Hernandez vd. (2021) yapmış olduğu çalışmada, beş probiyotik laktik asit bakterisi suşunda BSH aktivitesi değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, bir krem peynirden izole edilen ve potansiyel probiyotik özellikler gösteren *Lactobacillus plantarum* DGIA1 suşu, test edilen dört safra asidinde yüksek dekonjugasyon aktivitesi sergilemiştir. Söz konusu safra asitleri olan sodyum glikokolat, glikodeoksikolat, taurokolat ve taurodeoksikolat için dekonjugasyon oranları sırasıyla %69, %100, %81 ve %92 olarak belirlenmiştir (Hernández-Gómez vd., 2021).

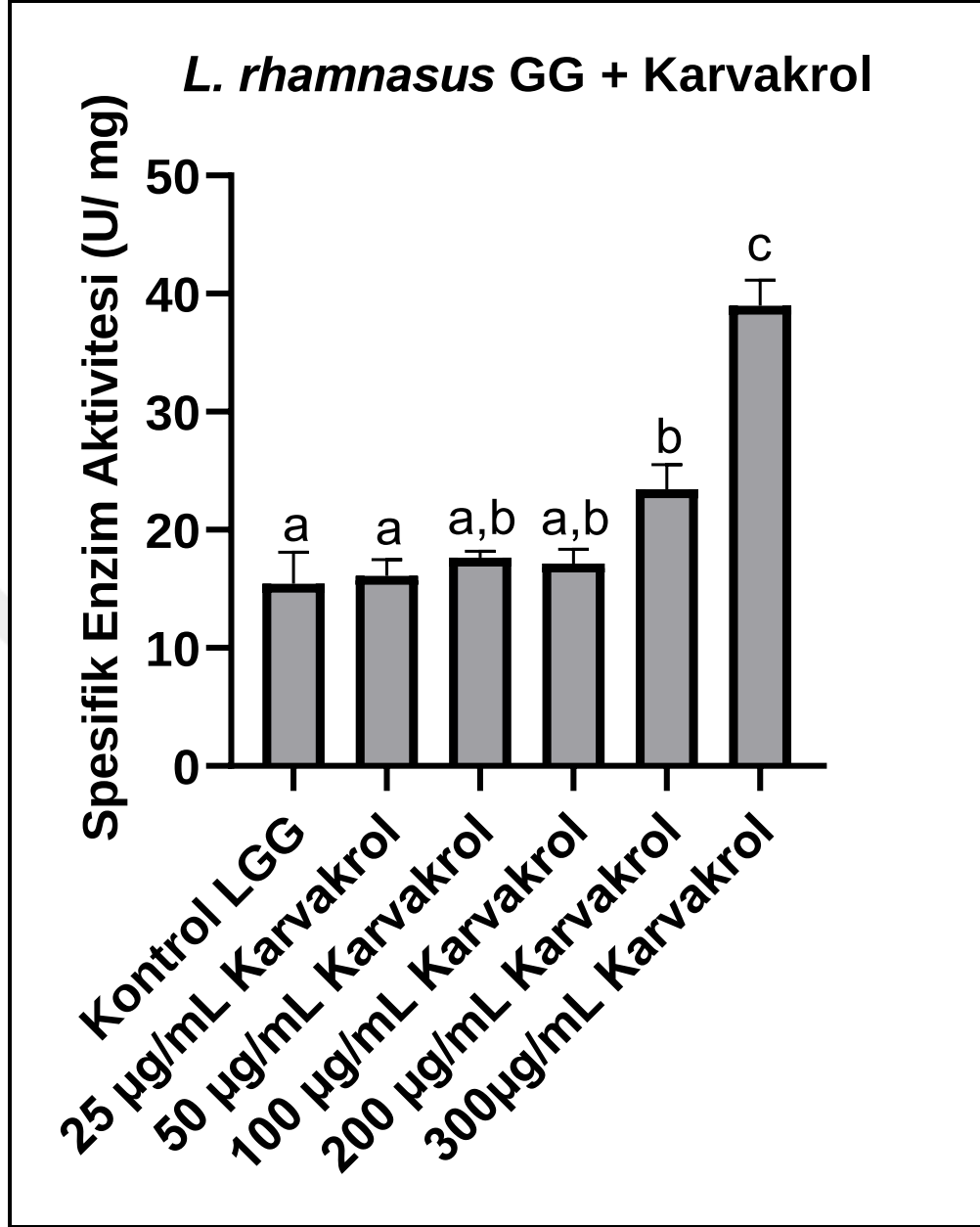
Sonuç olarak, bu tez çalışmasında LGG suşunun karvakrol ile muamelesi, özellikle 200 ve $300 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında BSH enzim aktivitesi ve spesifik aktivite düzeylerinde anlamlı artışlara yol açmıştır. En yüksek spesifik aktivitenin $38,97 \text{ U/mg}$ olarak $300 \mu\text{g/mL}$ karvakrol grubunda elde edilmesi, karvakrolün LGG'nin safra asidi hidroliz kapasitesini artırabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgu, karvakrolün sadece antimikrobiyal değil, aynı zamanda probiyotik metabolizmayı düzenleyici potansiyeliyle de dikkat çektiğini göstermektedir.

Literatürle de kıyaslandığında, BSH enzim aktivitesi, suş özelliklerine ve çevresel ve çevresel etkenlere bağlı olarak değişkenlik gösterebildiği görülmektedir. Bu bağlamda,

LGG'nin karvakrol gibi fenolik bileşiklerle birlikte kullanılması, safra tuzlarına karşı dayanıklılığını artırarak gastrointestinal geçiş sırasında canlılığını koruma ve fonksiyonel etki oluşturma kapasitesini destekleyebilir.

Ayrıca, BSH enziminin konjuge safra asitlerini dekonjuge etme yeteneği, bu asitlerin geri emilimini azaltarak karaciğerde safra asidi sentezini artırabilir (Fu vd., 2025). Bu süreçte kolesterol, safra asidi sentezi için kullanıldığından, BSH aktivitesine sahip probiyotiklerin konakçıda kolesterol düzeylerini düşürmeye katkıda bulunabileceği bildirilmektedir.

Elde edilen bulgular, sinbiyotik yaklaşımlarda karvakrolün fonksiyonel katkısını ortaya koymak açısından önem taşımaktadır.



Şekil 4.12: Farklı konsantrasyonlarda karvakrol ile muamele edilmiş LGG bakterilerinin BSH enzim aktivitesi. Kontrol grubunda karvakrol bulunmamaktadır. Farklı harfler (a, b, c), gruplar arasında istatistiksel olarak anlam ($p < 0.05$) ifade etmektedir.

Tablo 4.1: Farklı konsantrasyonlarda karvakrol ile muamele edilmiş LGG bakterilerinin BSH enzim aktivitesi ve spesifik aktivite değerleri. Enzim aktivitesi, serbest amino asit miktarına dayalı olarak $\mu\text{mol/mL}$ biriminde hesaplanmıştır. Spesifik aktivite, toplam protein miktarına bölünerek elde edilmiştir. Kontrol grubunda karvakrol bulunmamaktadır. Farklı harfler (a, b, c, d, e), gruplar arasında istatistiksel olarak anlam ($p < 0.05$) ifade etmektedir.

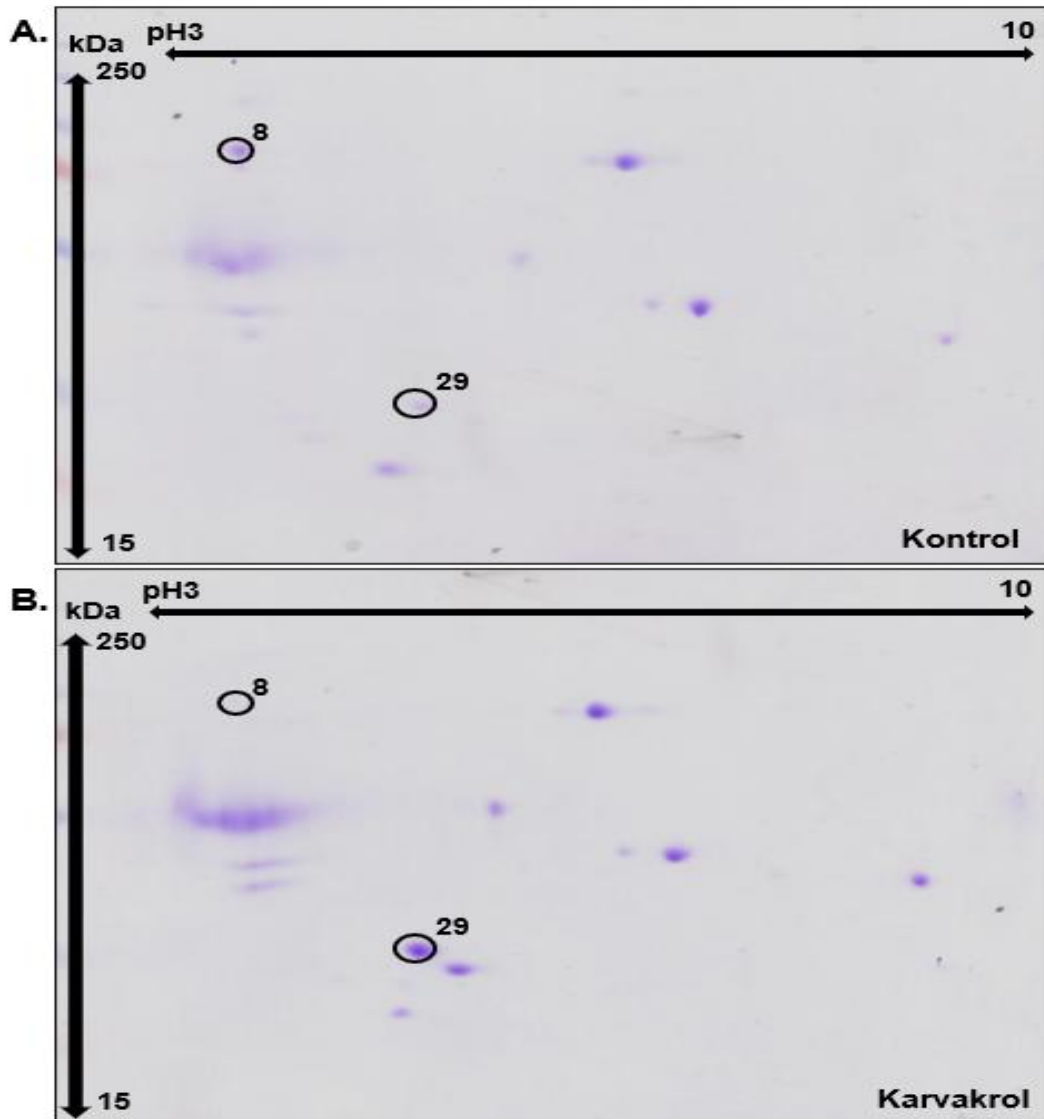
	Protein miktarı (mg) (ort. $\pm$ SD)	Enzim Aktivitesi ($\mu\text{mol/dk}$) (ort. $\pm$ SD)	Spesifik Enzim Aktivitesi (U/mg) (ort. $\pm$ SD)
Kontrol LGG	0,0183 $\pm$ 0,005	0,2760 $\pm$ 0,0255	15,44 $\pm$ 2,66 ^a
25 $\mu\text{g/mL}$ Karvakrol + LGG	0,0190 $\pm$ 0,0010	0,3063 $\pm$ 0,0085	16,12 $\pm$ 1,35 ^a
50 $\mu\text{g/mL}$ Karvakrol + LGG	0,0184 $\pm$ 0,0025	0,3247 $\pm$ 0,0335	17,64 $\pm$ 0,54 ^{a,b}
100 $\mu\text{g/mL}$ Karvakrol + LGG	0,0166 $\pm$ 0,0008	0,2840 $\pm$ 0,0057	17,14 $\pm$ 1,22 ^{a,b}
200 $\mu\text{g/mL}$ Karvakrol + LGG	0,0122 $\pm$ 0,0007	0,2862 $\pm$ 0,0111	23,42 $\pm$ 2,12 ^b
300 $\mu\text{g/mL}$ Karvakrol + LGG	0,0066 $\pm$ 0,0009	0,2581 $\pm$ 0,0213	38,97 $\pm$ 2,19 ^c

4.9. Proteom Analizleri için Örnek Hazırlığı

LABSEM içerisinde çoğaltılan LGG, kontrol (karvakrol içermeyen) ve 200 $\mu\text{g/mL}$ karvakrol ile muamele edilmiş gruplarına ait hücresiz süpernatantlar, ekzoproteom analizine yönelik olarak konsantre edilmiştir. Konsantrasyon işlemi sonrasında elde edilen protein örneklerinin toplam protein miktarı tayin edilmiş ve her bir bakteriyel ekzoproteom örneği, 50 μg protein içerecek şekilde analizlerde kullanılmıştır.

4.10. 2 Boyutlu Jel Elektroforezi (2-DE)

Şekil 4.13'te *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG (LGG) suşuna ait ekzoproteomun 2D jel görüntüsü sunulmuştur. Bu jel görüntüsünde numaralandırılmış protein spotları seçilerek analiz edilmiştir. Tablo 4.2'de yer alan 2D jel görüntülerine ait karşılaştırmalı analiz sonuçları, proteom düzeyinde anlamlı değişikliklerin meydana geldiğini göstermektedir. Belirlenen protein spotları arasında, Şekil 4.14'te 29 numaralı spota ve Şekil 4.15'te 8 numaralı spota ait yakınlaştırılmış görüntüler yer almaktadır.

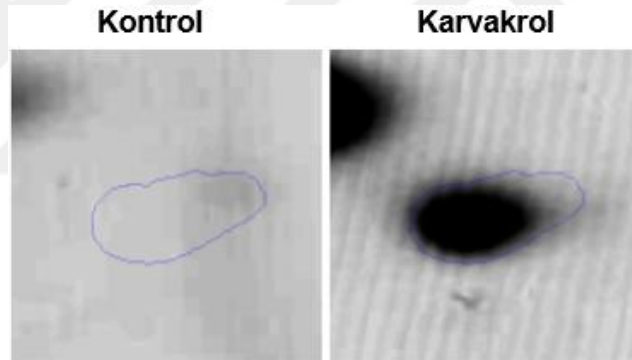


Şekil 4.13: LGG bakterisinin kontrol grubu (Karvakrol olmayan LGG) (A) ve muamele grubu (200 µg/ mL Karvakrol ile büyütülmüş LGG) (B) ekzoproteomunun 2D jel görüntüleri. Numaralandırılmış spotlar seçilmiş ve MALDI-TOF/MS protein tanımlama için kullanılmıştır.

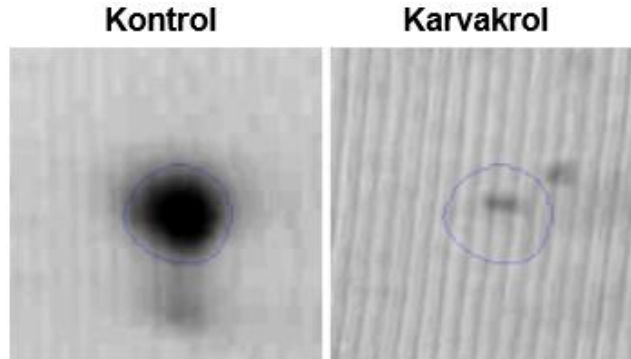
Karşılaştırmalı proteomik analizinde, bu spotlardan her ikisinin de en az 2 katlık değişim gösterdiği (kat değişimi ≥ 2) ve ANOVA analizine göre sırasıyla 0,007 ve 0,0075 p-değerleriyle istatistiksel olarak anlamlı bulunduğu belirlenmiştir ($p \leq 0,08$) (Tablo 4.10.1). Bu bulgular, karvakrol ile muamele edilen LGG suşunda proteomik profilin önemli ölçüde değiştiğini ve özellikle bazı proteinlerin ekspresyon seviyelerinde belirgin artış veya azalma olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, karvakrolün LGG suşunda protein ifadesi üzerinde düzenleyici etkilere sahip olabileceği öne sürülmektedir.

Tablo 4.2: 2D jel görüntülerinin karşılaştırmalı analizi sonucu (kat değişimi ≥ 2 , ANOVA p-değeri $\leq 0,08$)

	ANOVA (p)	Kat Değişimi
29	0,007	+9,8
8	0,0075	-3,6



Şekil 4.14: 29 numaralı spotun 2D jel görüntülerinin karşılaştırması.



Şekil 4.15: 8 numaralı spotun 2D jel görüntülerinin karşılaştırması.

4.11. Kütle Spektrometrisi ile Protein Tanımlama

Bu tez çalışmasında, LGG suşuna ait ekzoproteomun karakterizasyonu amacıyla 2D jel elektroforezi sonrası seçilen protein spotlarının tanımlanmasında MALDI-TOF/MS yöntemi kullanılmış ve UniProtKB veritabanı üzerinden yapılan MASCOT analizi sonucunda anlamlı proteinler tespit edilmiştir.

Analiz sonucunda, 29 numaralı spotta yer alan proteinin CHAP domain-containing protein olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.3). CHAP (Cysteine, Histidine-dependent Amidohydrolases/Peptidases) domaini, hücre duvarındaki peptidoglikan yapısına bağlanarak amidaz ve peptidaz aktiviteleri sergileyen enzimatik bölgelerdir. Bu protein ailesi, hücre duvarı remodelasyonu, hücre bölünmesi ve lizis gibi süreçlerde önemli roller üstlenmektedir (Anantharaman ve Aravind, 2003; Rigden vd., 2003). Ayrıca, CHAP domainli proteinlerin bakterinin çevresel streslere adaptasyonunda, savunma mekanizmalarının düzenlenmesinde ve hücre duvarı bütünlüğünün korunmasında etkili olduğu bildirilmektedir (Albuquerque vd., 2021).

CHAP domain-containing protein'in hücre dışı bir protein olarak tespit edilmesi, bu molekülün konak ortamıyla etkileşimde rol oynayabileceğine işaret etmektedir. Bu durum, özellikle mukozal yüzeye adezyon, konak savunmalarından korunma ve çevresel streslere karşı dayanıklılık gibi probiyotik özelliklerle ilişkilendirilebilir. Ayrıca, karvakrolün bu proteinin ekspresyonunu arttırması, fenolik bileşiklerin hücre duvarı ilişkili proteinlerde düzenleyici rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu bağlamda, CHAP domain-containing protein'in varlığı, LGG'nin gastrointestinal ortamda tutunma kapasitesini ve hayatta kalma potansiyelini destekleyen bir biyobelirteç niteliğinde olabilir.

Diğer yandan, 8 numaralı spotta yer alan protein UPF0291 protein AWJ15_03705 olarak tanımlanmıştır. Bu protein, henüz tam olarak fonksiyonel açıdan karakterize edilmemiş olmakla birlikte, çeşitli bakteri türlerinde korunmuş bir protein ailesine aittir. Literatürde, UPF0291 ailesindeki proteinlerin, hücre duvarı yapısının düzenlenmesi, çevresel streslere yanıt ve metabolik adaptasyon gibi çeşitli işlevleri üstlenebileceği öne sürülmektedir (Marchler-Bauer vd., 2017); Galperin ve Koonin, 2004). Ayrıca, bu proteinlerin bazı hücre zarına bağlı yapılarla etkileşerek bakterinin tutunma ve

kolonizasyon kapasitesine katkı sağlayabileceği bildirilmiştir (Zhang vd., 2025).

Bu tez çalışmasında elde edilen proteomik verilerde, her iki proteinin de karvakrol muamelesine bağlı olarak spot yoğunluklarında anlamlı farklılık gözlemlenmiştir. Bu farklılıklar, spot yoğunluklarının en az 2 kat değişim gösterdiği ve p-değerlerinin 0,007 ve 0,0075 olduğu istatistiksel analizlerle desteklenmiştir (Tablo 4.2). Bu bulgular, karvakrolün LGG suşunda belirli proteinlerin göreceli miktarlarını (relative abundance) etkileyebileceğini göstermektedir.

Özellikle bu iki proteinin spot yoğunluğundaki değişiklikler, karvakrolün sadece antimikrobiyal bir ajan değil, aynı zamanda probiyotik bakterilerde çevresel adaptasyon ve fonksiyonel yanıtların düzenlenmesinde etkili bir biyoaktif bileşik olabileceğine işaret etmektedir. Bu bağlamda, CHAP domain-containing protein ve UPF0291 proteinini, karvakrol etkisine duyarlı proteinler olarak, probiyotik etkinlik mekanizmalarının proteomik düzeyde anlaşılmasına katkı sağlayabilecek potansiyel biyobelirteçlerdir.

Tablo 4.3: MALDI-TOF/MS ile tanımlanan proteinler. Veritabanı olarak UniProtKB kullanılmıştır.

Spot No	Dizi Kapsama Oranı (% coverage)	Eşleşen Peptit Sayısı	Moleküler Ağırlık (Da)	Hesaplanan İzoelektrik Nokta (pI)	Protein Adı	Hücrel Lokasyon
8	69	9	9734	9,30	UPF0291 protein	Hücre İçi
29	30	13	42617	6,97	CHAP domain-containing protein	Hücre Dışı

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, fenolik bileşiklerden biri olan karvakrolün, probiyotik bir bakteri olan *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG üzerindeki etkileri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Hipotezimiz, doğal olarak birçok gıdada bulunan karvakrolün LGG'nin probiyotik özelliklerinin gelişimine ve proteomik profiline olumlu katkılar sağlayabileceği yönündeydi. Bu doğrultuda, karvakrolün LGG'nin büyüme, adezyon, oto ve ko-agregasyon, safra tuzu ve pepsin direnci, antioksidan aktivite ve enzim üretimi gibi temel probiyotik fonksiyonları üzerindeki etkileri ve ekzoproteom üzerine etkileri detaylı olarak analiz edilmiştir.

Çalışma sonuçları, karvakrolün LGG'nin büyümesini engellemediğini ve hatta belirli konsantrasyonlarda bakteriyel büyümeyi desteklediğini göstermiştir. Bu bulgu, karvakrolün güçlü antimikrobiyal özelliklerine rağmen, probiyotik bakteri olan LGG üzerinde inhibisyon yaratmadığını ortaya koymuştur. Oto-agregasyon testlerinde, özellikle 300 µg/mL karvakrol konsantrasyonunda %22'ye varan artış gözlenirken, daha düşük konsantrasyonlarda önemli bir değişim izlenmemiştir. Ko-agregasyon analizlerinde ise karvakrolün LGG'nin patojenik bakteriler *E. coli* ve *S. aureus* ile etkileşiminde konsantrasyon ve zaman faktörüne bağlı farklı etkiler ortaya çıkmıştır; özellikle 200 µg/mL konsantrasyonunda *S. aureus* ile ko-agregasyon artmıştır. Bu durum, karvakrolün LGG'nin patojenlere karşı savunma mekanizmalarını etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Antioksidan kapasite testlerinde, karvakrolün kendisi yüksek antioksidan aktivite sergilemiş olsa da, karvakrol ile büyütülen LGG'nin antioksidan kapasitesinde anlamlı bir artış gözlenmemiştir. Bu bulgu, karvakrolün antioksidan özelliklerinin doğrudan probiyotik bakteri aktivitesini artırmadığını ancak potansiyel olarak bağırsak ortamında başka faydalar sağlayabileceğini göstermektedir.

LGG'nin adezyon kapasitesi ise özellikle 200 µg/mL karvakrol konsantrasyonunda %11 oranında anlamlı şekilde artmıştır. Bu da karvakrolün, probiyotik bakterinin gastrointestinal mukozaya tutunma yeteneğini artırarak kolonizasyon etkinliğini destekleyebileceğini göstermektedir.

Safra tuzu dayanıklılığı testlerinde, karvakrol ile muamele edilen gruplarda genel olarak kontrol grubuna kıyasla dayanıklılıkta anlamlı bir artış görülmemiştir. Ancak 50 µg/mL konsantrasyonunda dayanıklılık korunmuştur.

Pepsin direnci açısından ise tüm karvakrol konsantrasyonlarında bir azalma saptanmıştır. Bu sonuç, karvakrolün LGG'nin mide asidine karşı direncini azaltabileceğine işaret etmektedir ve probiyotik etkinlik açısından dikkate alınması gereken önemli bir bulgudur.

Bunun yanı sıra, safra tuzu hidrolazı (BSH) enzimi analizinde, karvakrol ile muamele edilen LGG gruplarında enzim aktivitesinde belirgin artışlar gözlenmiştir. Özellikle 200 ve 300 µg/mL konsantrasyonlarında spesifik enzim aktivitesi anlamlı düzeyde artarak LGG'nin safra tuzlarına karşı toleransını güçlendirmiştir. Bu bulgu, karvakrolün probiyotik bakterinin gastrointestinal ortamda hayatta kalma şansını artıran önemli bir sinbiyotik ajan olabileceğini desteklemektedir.

Proteomik analizlerde ise LGG proteomunda CHAP domain-containing protein ve UPF0291 protein AWJ15_03705 tespit edilmiştir. CHAP domainli proteinlerin bakteriyel hücre duvarı modifikasyonu ve savunma mekanizmalarında kritik rol oynadığı bilinirken, UPF0291 ailesindeki proteinlerin ise bakteriyel adaptasyon ve stres yanıtında görev aldığı bildirilmektedir. Bu proteinin varlığı, karvakrolün LGG'nin protein profili ve dolayısıyla fizyolojisi üzerindeki düzenleyici etkilerine işaret etmektedir.

Genel olarak, karvakrol ile LGG arasında pozitif bir sinbiyotik etkileşim olduğu ve karvakrolün bazı probiyotik özellikleri geliştirdiği sonucuna varılmıştır. Ancak karvakrolün pepsin direncini düşürmesi gibi bazı olumsuz etkileri de göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle, fenolik bileşiklerin probiyotik bakterilerle birlikte kullanımı, her iki bileşenin özellikleri ve dozajları dikkate alınarak optimize edilmelidir.

Gelecekteki çalışmalar için, karvakrolün LGG'nin pepsin direncine olumsuz etkisini azaltmaya yönelik stratejiler araştırılabilir. Karvakrol ve benzeri fenolik bileşiklerin, farklı probiyotik suşlar üzerindeki etkileri araştırılabilir ve suşa özgü yanıtlar belirlenebilir. Böylece daha etkili sinbiyotik kombinasyonlar geliştirilebilir. Karvakrolün LGG proteomunda tespit edilen proteinler üzerindeki etkileri, daha derinlemesine fonksiyonel ve

yapısal analizlerle incelenebilir. Özellikle CHAP domain-containing protein ve UPF0291 ailesi proteinlerin rolü gen ekspresyonu, protein-protein etkileşimleri ve probiyotik fonksiyonları açısından değerlendirilebilir. *In vivo* çalışmalarla, karvakrol ile zenginleştirilmiş probiyotiklerin bağırsak mikrobiyotası ve konak bağışıklık sistemi üzerindeki etkileri araştırılabilir. Bu sayede laboratuvar bulguları klinik veya gıda endüstrisi uygulamalarına taşınabilir. Probiyotiklerin gastrointestinal ortamda hayatta kalma kapasitelerini artırmak için, probiyotik taşıyıcı matrisler ve prebiyotik desteklerin birlikte kullanımı incelenebilir.

Sonuç olarak bu tez çalışması, fenolik bileşik karvakrol ile probiyotik *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG suşu arasındaki etkileşimleri ayrıntılı şekilde ortaya koyarak sinbiyotik ürün geliştirme alanında önemli bir temel sağlamıştır. Bu bulgular, probiyotik fonksiyonlarını güçlendiren yeni doğal katkı maddelerinin keşfi ve uygulanması açısından yol gösterici olabilir.

KAYNAKLAR

- Al-Mansori, B., El-Ageeli, W. H., Alsagheer, S. ve Ben-Khayal, F. A. (2020). Antioxidant activity-synergistic effects of thymol and carvacrol. *Al-Mukhtar J. Sci*, 35: 185-194.
- Albuquerque, B. R., Heleno, S. A., Oliveira, M. B. P. P., Barros, L. ve Ferreira, I. C. F. R. (2021). Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges. *Food & Function*, 12(1): 14-29.
- Allaq, A. A., Sidik, N. J., Abdul-Aziz, A. ve Ahmed, I. A. (2020). Cumin (*Cuminum cyminum* L.): A review of its ethnopharmacology, phytochemistry. *Biomedical Research and Therapy*, 7(9): 4016-4021.
- Anantharaman, V. ve Aravind, L. (2003). Evolutionary history, structural features and biochemical diversity of the NlpC/P60 superfamily of enzymes. *Genome biology*, 4(2): R11.
- Bao, H., Muasya, C. M., Chen, F.-C., Kilonzo-Nthenge, A. ve Wu, Y. (2025). A Study on Combined Effect of Monoterpenoid Essential Oils and Polyphenols from Grape Pomace on Selected Pathogenic and Probiotic Bacteria Strains. *Processes*, 13(7): 1995.
- Bayir, A. G., Kiziltan, H. S. ve Kocyigit, A. (2019). Plant family, carvacrol, and putative protection in gastric cancer. *Dietary interventions in gastrointestinal diseases*, Elsevier: 3-18.
- Begley, M., Gahan, C. G. ve Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS microbiology reviews*, 29(4): 625-651.
- Begley, M., Hill, C. ve Gahan, C.G. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and environmental microbiology*, 72(3): 1729-1738.
- Ben Arfa, A., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N. ve Chalier, P. (2006). Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in applied microbiology*, 43(2): 149-154.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E. ve Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1): 25-30.
- Caballero, V., Estévez, M., Tomás-Barberán, F. A., Morcuende, D., Martín, I. ve Delgado, J. (2022). Biodegradation of punicalagin into ellagic acid by selected probiotic bacteria: A study of the underlying mechanisms by MS-based proteomics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(51): 16273-16285.
- Celebioglu, H. U. (2021). Effects of potential synbiotic interaction between *Lactobacillus rhamnosus* GG and salicylic acid on human colon and prostate cancer cells. *Archives of Microbiology*, 203(3): 1221-1229.
- Celebioglu, H. U., Delsoglio, M., Brix, S., Pessione, E. ve Svensson, B. (2018). Plant polyphenols stimulate adhesion to intestinal mucosa and induce proteome changes

in the probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Molecular nutrition & food research*, 62(4): 1700638.

- Chroho, M., Roupahel, Y., Petropoulos, S.A. ve Bouissane, L. (2024). Carvacrol and thymol content affects the antioxidant and antibacterial activity of *Origanum compactum* and *Thymus zygis* essential oils. *Antibiotics*, 13(2): 139.
- Claes, I., Lebeer, S., Shen, C., Verhoeven, T., Dilissen, E., De Hertogh, G., Bullens, D., Ceuppens, J., Van Assche, G. ve Vermeire, S. (2010). Impact of lipoteichoic acid modification on the performance of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in experimental colitis. *Clinical & Experimental Immunology*, 162(2): 306-314.
- Dai, J. ve Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10): 7313-7352.
- Das, A., Behera, R. N., Kapoor, A. ve Ambatipudi, K. (2023). The Potential of Meta-Proteomics and Artificial Intelligence to Establish the Next Generation of Probiotics for Personalized Healthcare. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(46): 17528-17542.
- Davran Bulut, S., Derebası, B. N., Günay, S., Erden, Y., Celebioglu, H. U. ve Ünal, M. Ü. (2025). Emerging Synbiotics Consisting of Catechin and Probiotic Bacteria: Exploring Aggregation, Adhesion, Antioxidant, and Anticancer Effects. *Probiotics and antimicrobial proteins*: 1-14.
- Demir, H. (2024). BİYOAKTİF POLİFENOLLER. *SAĞLIK & BİLİM 2024: Fonksiyonel Gıdalar ve Sürdürülebilir Sağlık*: 157.
- Derebası, B. N., Davran Bulut, S., Aksoy Erden, B., Sadeghian, N., Taslimi, P. ve Celebioglu, H. U. (2024). Effects of p-coumaric acid on Probiotic Properties of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG. *Archives of Microbiology*, 206(5): 223.
- Dowsey, A.W., Morris, J.S., Gutstein, H. B. ve Yang, G.Z. (2009). Informatics and statistics for analyzing 2-d gel electrophoresis images. In *Proteome Bioinformatics* (pp. 239-255). Totowa, NJ: Humana Press.
- Dos Santos, A. S., De Albuquerque, T. M. R., de Brito Alves, J. L. ve De Souza, E. L. (2019). Effects of quercetin and resveratrol on in vitro properties related to the functionality of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *Frontiers in microbiology*, 10: 2229.
- El Far, M. S., Zakaria, A. S., Kassem, M. A. ve Edward, E. A. (2024). Characterization of probiotics isolated from dietary supplements and evaluation of metabiotic-antibiotic combinations as promising therapeutic options against antibiotic-resistant pathogens using time-kill assay. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 24(1): 303.
- Erciyes, S.N., Al Dukr, F., Derebası, B.N., Davran Bulut, S. ve Celebioglu, H.U. (2025). Postbiotic potential and emerging synbiotic interactions of *Cuminum cyminum* L. and *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG. *Discover Bacteria*, 2(1): 19.

- Fan, K., Li, X., Cao, Y., Qi, H., Li, L., Zhang, Q. ve Sun, H. (2015). Carvacrol inhibits proliferation and induces apoptosis in human colon cancer cells. *Anti-cancer drugs*, 26(8): 813-823.
- Fu, Y., Guzior, D.V., Okros, M., Bridges, C., Rosset, S.L., González, C.T., Martin, C., Karunaratne, H., Watson, V.E. ve Quinn, R. A. (2025). Balance between bile acid conjugation and hydrolysis activity can alter outcomes of gut inflammation. *Nature Communications*, 16(1): 3434.
- Galperin, M.Y. ve Koonin, E.V. (2004). 'Conserved hypothetical' proteins: prioritization of targets for experimental study. *Nucleic acids research*, 32(18): 5452-5463.
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S. ve Cani, P. D. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14(8): 491-502.
- Gorbach, S., Doron, S. ve Magro, F. (2017). *Lactobacillus rhamnosus* GG. The microbiota in gastrointestinal pathophysiology, Elsevier: 79-88.
- Hernández-Gómez, J. G., López-Bonilla, A., Trejo-Tapia, G., Ávila-Reyes, S. V., Jiménez-Aparicio, A. R. ve Hernández-Sánchez, H. (2021). *In vitro* bile salt hydrolase (BSH) activity screening of different probiotic microorganisms. *Foods*, 10(3): 674.
- Hill, C., Scott, K., Klaenhammer, T., Quigley, E. ve Sanders, M. (2016). Probiotic nomenclature matters. *Gut Microbes*, 7(1): 1-2.
- Isolauri, E., Majamaa, H., Arvola, T., Rantala, I., Virtanen, E. ve Arvilommi, H. (1993). *Lactobacillus casei* strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats. *Gastroenterology*, 105(6): 1643-1650.
- Kim, S., Lee, J. Y., Jeong, Y. ve Kang, C.-H. (2022). Antioxidant activity and probiotic properties of lactic acid bacteria. *Fermentation*, 8(1): 29.
- Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B. ve Možina, S. S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 81(2): 121-126.
- Koponen, J., Laakso, K., Koskenniemi, K., Kankainen, M., Savijoki, K., Nyman, T. A., de Vos, W. M., Tynkkynen, S., Kalkkinen, N. ve Varmanen, P. (2012). Effect of acid stress on protein expression and phosphorylation in *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Journal of proteomics*, 75(4): 1357-1374.
- Kos, B., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J. ve Matošić, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 94(6): 981-987.
- Landersjö, C., Yang, Z., Huttunen, E. ve Widmalm, G. (2002). Structural Studies of the Exopolysaccharide Produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (ATCC 53103).

Biomacromolecules, 3(4): 880-884.

- Leccese Terraf, M. C., Mendoza, L. M., Juárez Tomás, M. S., Silva, C. ve Nader-Macías, M. (2014). Phenotypic surface properties (aggregation, adhesion and biofilm formation) and presence of related genes in beneficial vaginal lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 117(6): 1761-1772.
- Leska, A., Nowak, A. ve Czarnecka-Chrebelska, K. H. (2022). Adhesion and anti-adhesion abilities of potentially probiotic lactic acid bacteria and biofilm eradication of honeybee (*Apis mellifera* L.) pathogens. *Molecules*, 27(24): 8945.
- Liévin-Le Moal, V. ve Servin, A. L. (2014). Anti-infective activities of lactobacillus strains in the human intestinal microbiota: from probiotics to gastrointestinal anti-infectious biotherapeutic agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2): 167-199.
- Linhorst, A. ve Lübke, T. (2022). The human Ntn-hydrolase superfamily: structure, functions and perspectives. *Cells*, 11(10): 1592.
- Lopez-Corona, A. V., Valencia-Espinosa, I., González-Sánchez, F. A., Sánchez-López, A. L., Garcia-Amezquita, L. E. ve Garcia-Varela, R. (2022). Antioxidant, Anti-Inflammatory and Cytotoxic Activity of Phenolic Compound Family Extracted from Raspberries (*Rubus idaeus*): A General Review. *Antioxidants*, 11(6).
- Marchler-Bauer, A., Bo, Y., Han, L., He, J., Lanczycki, C. J., Lu, S., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, R. C. ve Gonzales, N. R. (2017). CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic acids research*, 45(D1): D200-D203.
- Markowiak, P. ve Śliżewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9): 1021.
- Mazzeo, M. F., Lippolis, R., Sorrentino, A., Liberti, S., Fragnito, F. ve Siciliano, R. A. (2015). *Lactobacillus acidophilus*—Rutin Interplay Investigated by Proteomics. *PloS one*, 10(11): e0142376.
- Meleady, P. (2018). Two-dimensional gel electrophoresis and 2D-DIGE. *Difference gel electrophoresis: methods and protocols*: 3-14.
- Ozturk, T., Ávila-Gálvez, M. Á., Mercier, S., Vallejo, F., Bred, A., Fraisse, D., Morand, C., Pelvan, E., Monfoulet, L.-E. ve González-Sarriás, A. (2024). Impact of lactic acid bacteria fermentation on (poly) phenolic profile and *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory properties of herbal infusions. *Antioxidants*, 13(5): 562.
- Pereira, D.M., Valentão, P., Pereira, J.A. ve Andrade, P.B. (2009). Phenolics: From chemistry to biology. *Molecules*, 14(6): 2202-2211.
- Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S. ve Lelong, C. (2010). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *Journal of proteomics*, 73(11): 2064-2077.

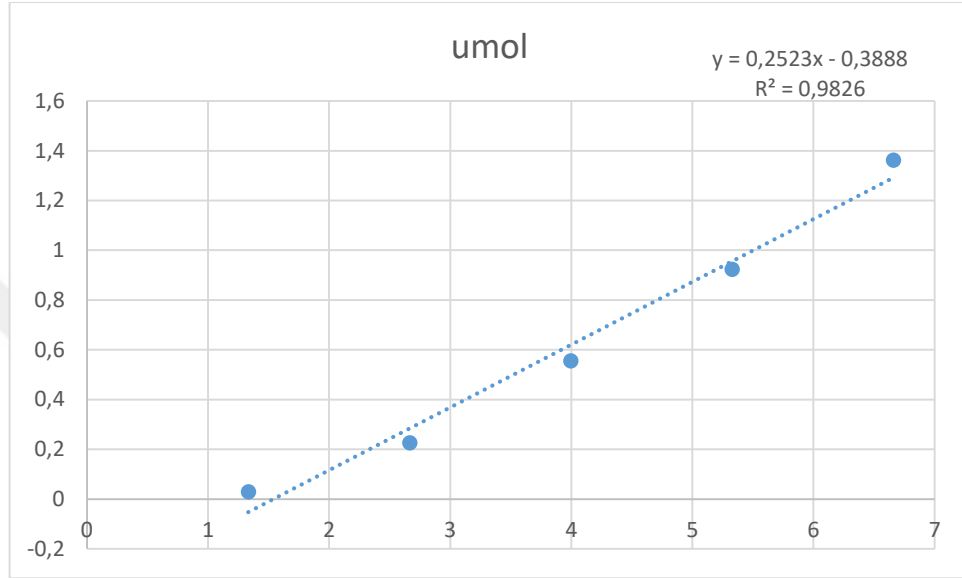
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. ve Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10): 1231-1237.
- Rigden, D. J., Jedrzejewski, M. J. ve Galperin, M. Y. (2003). Amidase domains from bacterial and phage autolysins define a family of γ -d, l-glutamate-specific amidohydrolases. *Trends in biochemical sciences*, 28(5): 230-234.
- Ruiz, L., Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., de Los Reyes-Gavilán, C. G., Margolles, A. ve Sánchez, B. (2011). How do bifidobacteria counteract environmental challenges? Mechanisms involved and physiological consequences. *Genes & nutrition*, 6: 307-318.
- Shakya, S., Danshiitsoodol, N., Noda, M. ve Sugiyama, M. (2024). Role of phenolic acid metabolism in enhancing bioactivity of Mentha extract fermented with plant-derived *Lactobacillus plantarum* SN13T. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 16(3): 1052-1064.
- Shang, F., Jiang, X., Wang, H., Chen, S., Wang, X., Liu, Y., Guo, S., Li, D., Yu, W. ve Zhao, Z. (2020). The inhibitory effects of probiotics on colon cancer cells: *In vitro* and *in vivo* studies. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 11(6): 1224.
- Sharma, R. ve Padwad, Y. (2020a). Plant polyphenol-based second-generation synbiotic agents: Emerging concepts, challenges, and opportunities. *Nutrition*, 77: 110785-110785.
- Sharma, R. ve Padwad, Y. (2020b). Probiotic bacteria as modulators of cellular senescence: emerging concepts and opportunities. *Gut Microbes*, 11(3): 335-349.
- Shehata, M., El Sohaimy, S., El-Sahn, M. A. ve Youssef, M. (2016). Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(1): 65-75.
- Siciliano, R. A. ve Mazzeo, M. F. (2012). Molecular mechanisms of probiotic action: a proteomic perspective. *Current opinion in microbiology*, 15(3): 390-396.
- Sivaranjani, A., Sivagami, G. ve Nalini, N. (2016). Chemopreventive effect of carvacrol on 1, 2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 12(2): 755-762.
- Tumbariski, Y., Peykova-Shapkova, I., Ivanova, M., Cholakov, R., Dutkiewicz, A. ve Grzymajło, K. (2025). Characterization and Selection of *Lactobacillus* Strains with Potential Probiotic Applications. *Applied Sciences*, 15(6): 2902.
- Tuomola, E., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E. ve Salminen, S. (2001). Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2): 393-398.
- Veldhuizen, E. J., Tjeerdsmā-van Bokhoven, J. L., Zweijtzer, C., Burt, S. A. ve Haagsman, H. P. (2006). Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(5): 1874-1879.

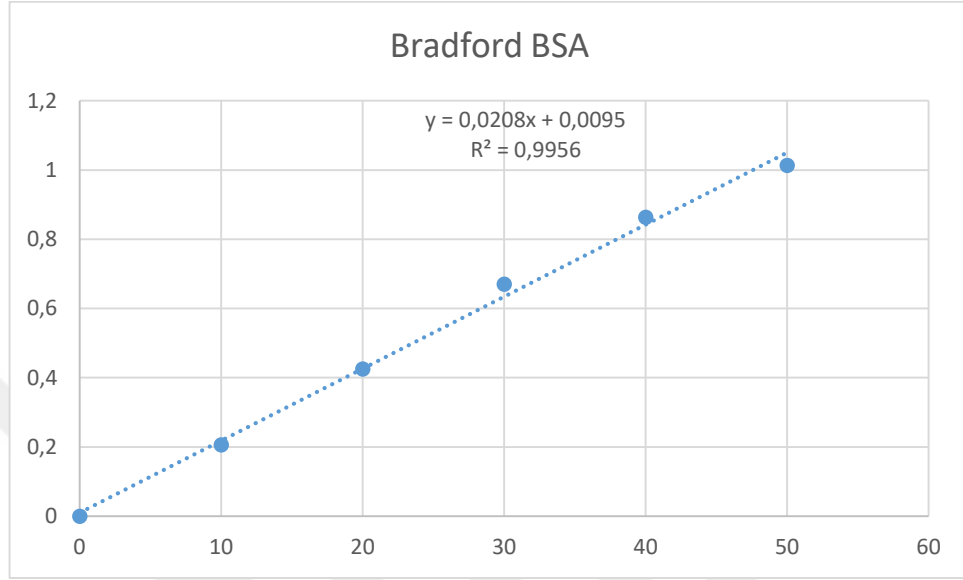
- Vélez, M. P., Petrova, M. I., Lebeer, S., Verhoeven, T. L., Claes, I., Lambrichts, I., Tynkkynen, S., Vanderleyden, J. ve De Keersmaecker, S. C. (2010). Characterization of MabA, a modulator of *Lactobacillus rhamnosus* GG adhesion and biofilm formation. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 59(3): 386-398.
- Wang, C., Liu, L., Guo, J., Jike, X., Xu, K., Li, B., Liu, L., Fang, Y., Xu, H. ve Lei, H. (2023). Phenolic profiles, antioxidant capacities and flavour volatiles in fig (*Ficus carica* L.) juices from five cultivars fermented by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus*. *International Journal of Food Science and Technology*, 58(11): 6025-6035.
- Xu, S., Liu, T., Radji, C. A. I., Yang, J. ve Chen, L. (2016). Isolation, identification, and evaluation of new lactic acid bacteria strains with both cellular antioxidant and bile salt hydrolase activities in vitro. *Journal of food protection*, 79(11): 1919-1928.
- Zhang, C., Zhang, Y., Xia, S., Zhu, S., Li, W., Aboelenin, S. M., Soliman, M. M., Li, H. ve Liu, X. (2021). iTRAQ-based proteomic analysis of the differential effects of digested soy peptides and digested soy protein isolates on *Lactobacillus rhamnosus*. *Food Bioscience*, 43: 101296.
- Zhang, Y., Zhang, C., Wang, J., Wen, Y., Li, H., Liu, X. ve Liu, X. (2025). Can proteins, protein hydrolysates and peptides cooperate with probiotics to inhibit pathogens? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 65(6): 1023-1036.

EKLER

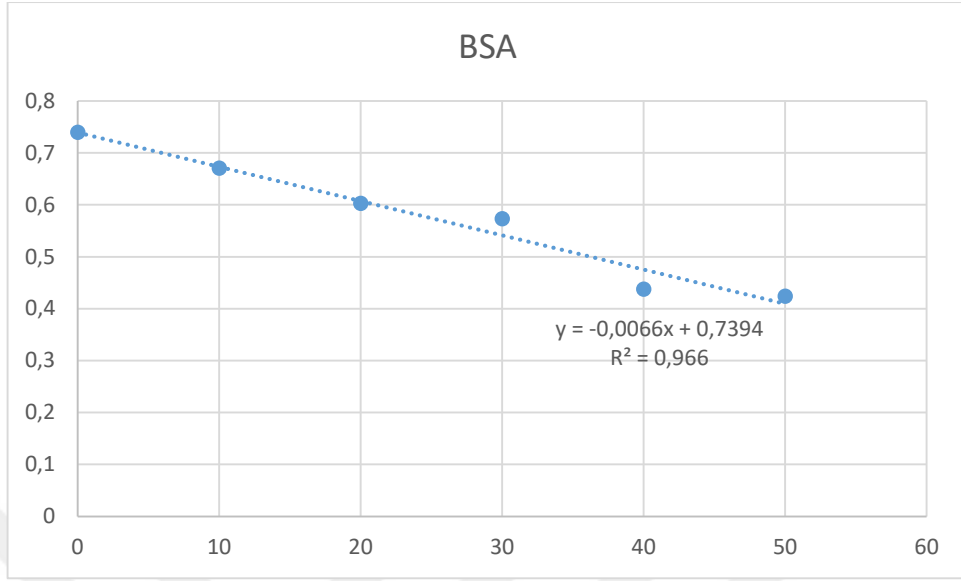
EK 1: Probiyotik Bakterilerin Safra Tuzu Hidrolaz (BSH) Enzim Aktivitesi için glisin standart grafiği.



EK 2: Probiyotik Bakterilerin Safra Tuzu Hidrolaz (BSH) Enzim Aktivitesi için Bradford BSA protein tayini Bradford standart grafiği.



EK 3: Proteom analizi için 2D Quant kit protein tayini BSA standart grafiği.



EK 4: 8 numaralı spotun MALDI-TOF/MS protein tanımlama analiz sonucu.



MASCOT Search Results

Protein View: tr|A0A2A5L7A6|A0A2A5L7A6_LACRH

**UPF0291 protein AWJ15_03705 OS=Lacticaseibacillus rhamnosus
OX=47715 GN=BWR10_07730 PE=3 SV=1**

Database: Lacticaseibacillus_rhamnosus
Score: 46
Expect: 0.47
Monoisotopic mass (M_r): 9734
Calculated pI: 9.30

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of tr|A0A2A5L7A6|A0A2A5L7A6_LACRH against nr.](#)

Search parameters

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Oxidation (M)
Mass values searched: 59
Mass values matched: 9

Protein sequence coverage: 69%

Matched peptides shown in **bold red**.

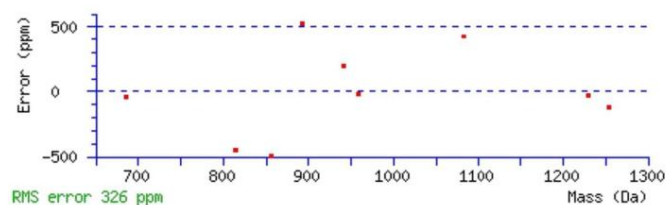
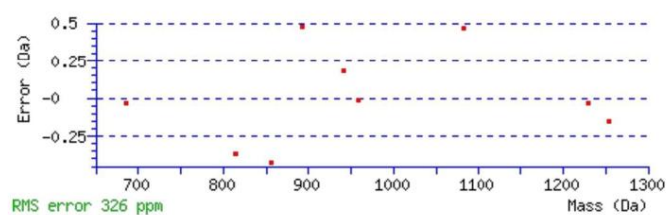
1 MAEQPKERLD RINELAKKDR SVGLTPEEKI ERQKLREAYL KDFRAGLRDQ
51 IEHTQVFDKK **GHEITSKKVQ** KIQREHGWR E D

Unformatted sequence string: **81 residues** (for pasting into other applications).

Sort by ☒ residue number ☐ increasing mass ☐ decreasing mass
Show ☒ matched peptides only ☐ predicted peptides also

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta M	Peptide
2 - 8	857.0260	856.0187	856.4402	-0.4215 1	M.AEQPKER.L
12 - 17	687.3727	686.3654	686.3963	-0.0308 0	R.INELAK.K
12 - 18	815.1324	814.1252	814.4912	-0.3660 1	R.INELAKK.D
19 - 29	1230.6028	1229.5956	1229.6252	-0.0296 1	K.DRSVGLTPEEK.I
21 - 29	959.4872	958.4800	958.4971	-0.0172 0	R.SVGLTPEEK.I
30 - 36	942.7670	941.7597	941.5770	0.1827 2	K.IERQKLR.E
35 - 41	892.9958	891.9885	891.5178	0.4707 1	K.LREAYLK.D
61 - 71	1254.5605	1253.5532	1253.7092	-0.1560 2	K.GHEITSKKVQK.I
72 - 79	1082.0262	1081.0189	1080.5577	0.4612 1	K.IQREHGWR.E

No match to: 681.9611, 700.4938, 701.3773, 709.2192, 716.3999, 738.3349, 754.2773, 819.0695, 823.0899, 829.4623, 835.0552, 841.0533, 842.5099, 853.5027, 855.0257, 861.0471, 871.0059, 877.0223, 889.4763, 906.5049, 908.9726, 926.8474, 994.1384, 1008.5174, 1045.5641, 1060.0407, 1066.0474, 1068.5334, 1079.0878, 1098.0028, 1116.5469, 1132.5405, 1190.5442, 1213.5767, 1240.6290, 1249.9425, 1271.0448, 1293.0368, 1309.0081, 1345.5417, 1430.7035, 1435.6480, 1462.7294, 1497.5216, 1545.7451, 1594.6926, 1671.8755, 1708.8050, 1734.8132, 1964.8881



Mascot: <http://www.matrixscience.com/>

EK 5: 29 numaralı spotun MALDI-TOF/MS protein tanımlama analiz sonucu.



MASCOT Search Results

Protein View: tr|A0A508YNS8|A0A508YNS8_LACRH

CHAP domain-containing protein OS=Lacticaseibacillus rhamnosus OX=47715
GN=E6L36_14775 PE=4 SV=1

Database: Lacticaseibacillus_rhamnosus
Score: 69
Expect: 0.0022
Monoisotopic mass (M_r): 42617
Calculated pI: 6.97

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of tr|A0A508YNS8|A0A508YNS8_LACRH against nr.](#)

Search parameters

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Fixed modifications: **Carbamidomethyl (C)**
Variable modifications: **Oxidation (M)**
Mass values searched: 53
Mass values matched: 13

Protein sequence coverage: 30%

Matched peptides shown in **bold red**.

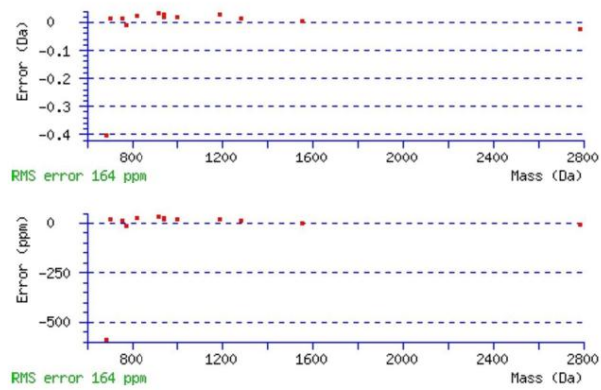
1 MKFNKAMMTL VAAVTLAGSV SAVTPVFADT SASIASNK**SE TNDLLKQIEA**
51 **ANTEVINLNK QIDAKNGEIS DATAKISATD AKIASLSGEI TAAQKNVAAR**
101 KNNLK**DQLIS LQK**KAGSSVS GNVYIDFVLN SQSLSDLIAR TMTVGKLSQA
151 SKDALDAVTV AK**DKLAALKS EQETARQTLV** STKASLETQK **SQLETLQKTA**
201 **SDKQDALNKE IADHKDELVA LQSQFAQEQS EAAKATQAAL** KTAAASTASS
251 STSSTSNKSA NSSVLSTGTS STNTSSNSGA SSTVISSNTA SGSGSHADYS
301 GSGNTYFPWQ CTWYVKSVAS WAGNGWNGA EWGASAAAAG FTVNHTPAAG
351 SIIVFAAGQS VGGQWTADGS YGHVAYVQSV SGDSVTITQG GMGFSSPTGP
401 NTQTISGASS YVYIHR

Unformatted sequence string: **416 residues** (for pasting into other applications).

Sort by ☒ residue number ☐ increasing mass ☐ decreasing mass
Show ☒ matched peptides only ☐ predicted peptides also

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta M	Peptide
39 - 46	919.5043	918.4970	918.4658	0.0312 0	K.SETNDLLK.Q
47 - 60	1556.8321	1555.8248	1555.8205	0.0042 0	K.QIEAANTEVINLNK.Q
66 - 75	1005.5054	1004.4981	1004.4774	0.0207 0	K.NGEISDATAK.I
83 - 95	1288.7257	1287.7185	1287.7034	0.0151 0	K.IASLSGEITAAQK.N
106 - 113	944.5604	943.5531	943.5338	0.0193 0	K.DQLISLQK.K
163 - 169	758.4888	757.4815	757.4698	0.0118 1	K.DKLAALK.S
170 - 176	820.4011	819.3938	819.3722	0.0216 0	K.SEQETAR.Q
177 - 183	776.4415	775.4342	775.4440	-0.0098 0	R.QLVSTK.A
191 - 198	946.5470	945.5398	945.5131	0.0267 0	K.SQLETLQK.T
199 - 209	1190.6281	1189.6208	1189.5939	0.0269 1	K.TASDKQDALNK.E
204 - 209	687.9591	686.9518	687.3551	-0.4033 0	K.QDALNK.E
210 - 234	2785.3414	2784.3341	2784.3566	-0.0225 1	K.EIADHKDELVALQSQFAQEQSEAAK.A
235 - 241	702.4279	701.4206	701.4072	0.0135 0	K.ATQAALK.T

No match to: 681.9393, 687.3896, 696.1281, 709.2529, 713.1968, 797.3826, 819.0959, 823.1241, 825.0674, 835.0630, 841.0349, 842.5309, 845.0492, 853.6029, 855.0314, 857.0131, 861.0295, 871.0279, 877.0053, 892.9774, 906.5258, 908.9560, 930.4823, 968.4965, 994.1607, 1024.5364, 1045.5893, 1066.0420, 1069.5313, 1072.0557, 1082.0258, 1088.0280, 1310.6644, 1539.7959, 1561.7404, 1578.7631, 1594.7303, 1685.7816, 1791.7449, 2211.0871



Mascot: <http://www.matrixscience.com/>