



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

***LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* ACS5 BAKTERİSİNDEN ELDE
EDİLEN EKZOPOLİSAKKARİTLERİN PREBİYOTİK VE
ANTİBİYOFİLM AKTİVİTELERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Abdulkerim KOCAOĞLU

DANIŞMAN

Prof. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ

AKSARAY, 2022

Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 192330407 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi Abdulkerim KOCAOĞLU tarafından hazırlanan **“LACTOBACILLUS RHAMNOSUS ACS5 BAKTERİSİNDEN ELDE EDİLEN EKZOPOLİSAKKARİTLERİN PREBİYOTİK VE ANTİBİYOFİLM AKTİVİTELERİ”** adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Tülden İNANAN

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Tez Savunma Tarihi: 07/01/2022

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Doç. Dr. Mehmet Ali HİNİS

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, akademik kurallara ve bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu, çalışmamda kullandığım verilerin orijinallliğini ve her türlü intihalden uzak olduğunu beyan ederim.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Abdulkerim KOCAOĞLU

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi ve gerek deney aşamasında gerekse tez yazımı aşamasında bilgi, tecrübe ve anlayışlarıyla akademik alanda bana daima yol gösteren ve destek olan, kendimi geliştirmemde büyük katkıları olan danışmanım Prof. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ'a çalışmada ihtiyaç duyulan kimyasalların temin edilmesini sağlayan Prof. Dr. Zehra NUR YÜKSEKDAĞ'a ve önemli deneyimleri ile her zaman yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Tülden İNANAN'a teşekkür ederim. Çalışmalarımı yapmama olanak sağlayan Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne (ASÜBTAM) ve yöneticilerine teşekkür ederim.

Çalışmamın gerçekleştirilmesinde yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Orhan ÇETİN, Abdulkadir DİKİCİ, Mehmet CAMBAZ, Hakan YÜCEDAĞ ve Alihan TOKSOY'a desteklerini benden esirgemeyen anneme, babama ve kardeşlerime teşekkür ederim.

Abdulkerim KOCAOĞLU

AKSARAY, 2022

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Probiyotik	3
2.2. Probiyotik Seçim Kriterleri	5
2.2.1. Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar.....	6
2.3. Prebiyotik.....	7
2.3.1. Prebiyotik kaynakları.....	8
2.3.2. Prebiyotiklerin elde edilmesi	9
2.3.3. Prebiyotik etki mekanizmaları	12
2.4. Sinbiyotik	12
2.5. Postbiyotik	13
2.5.1. Postbiyotiklerin etki mekanizmaları	15
2.5.2. Postbiyotiklerin sağlık üzerine etkileri	16
2.6. Parabiyotik.....	17
2.7. Biyofilm.....	18
2.7.1. Biyofilm oluşumu	19
2.8. Ekzopolisakkarit	20
2.8.1. Ekzopolisakkaritlerin kullanım alanları.....	21
2.8.2. Ekzopolisakkaritlerin prebiyotik olarak kullanımı	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM	25
3.1. Materyal.....	25
3.1.1. Çalışmada kullanılan bakteri kültürleri.....	25
3.1.2. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları	26
3.1.3. Çalışmalarda kullanılan besiyerleri	27
3.2. Yöntem	30
3.2.1. Bakteri kültürlerinin muhafazası	30
3.2.2. Bakterilerin ekzopolisakkarit üretimlerinin belirlenmesi	30
3.2.2.1. Kültür ortamında ekzopolisakkarit üretimlerinin belirlenmesi	30
3.2.2.2. Kültür ortamından kısmi saflaştırılan ekzopolisakkaritlerin lizofilizasyonu.....	32
3.2.3. Liyofilize ekzopolisakkaritin prebiyotik özelliklerinin belirlenmesi	34
3.2.3.1. ACS5 Liyofilize ekzopolisakkaritinin potansiyel probiyotik mikroorganizmalar tarafından fermentasyonun ve gelişim eğrilerinin belirlenmesi	35
3.2.3.2. Liyofilize ekzopolisakkaritin bağırsak patojenleri tarafından fermentasyonun belirlenmesi	36
3.2.3.3. Postbiyotiklerin fermentasyonu	36
3.2.3.4. Liyofilize ekzopolisakkaritin ve postbiyotiklerin gelişimi düzenleyici etkilerinin belirlenmesi	37
3.2.3.5. Liyofilize ekzopolisakkaritin prebiyotik skorunun belirlenmesi	38
3.2.3.6. Liyofilize ekzopolisakkaritin mide asidine direnci	39
3.2.4. Bağırsak patojen mikroorganizmalarının biyofilm	

aktivitelerinin belirlenmesi.....	41
3.2.4.1. Biyofilm aktivitelerinin kongo red yöntemi ile fenotipik olarak belirlenmesi.....	41
3.2.4.2. Biyofilm aktivitelerinin mikropate yöntemi ile belirlenmesi.....	41
3.2.4.3. Probiyotik, Prebiyotik, Postbiyotik, Sinbiyotik ve Parabiyoiklerin Antibiyofilm Aktivitesinin Belirlenmesi.....	43
3.2.5. Probiyotik prebiyotik, sinbiyotiklerin, postbiyotik ve parabiyoik antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi.....	45
4. ARASTIRMA BULGULARI	48
4.1. Bakterilerin Ekzopolisakkarit Üretiminin Belirlenmesi	48
4.1.1. Kültür ortamından elde edilen EPS'ler ile L-EPS'lerin EPS miktarlarının karşılaştırılması	48
4.2. Liyofilize Ekzopolisakkaritin Prebiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi	48
4.2.1. ACS5 Liyofilize ekzopolisakkaritin potansiyel probiyotik mikroorganizmalar tarafından fermentasyonun ve gelişim eğrilerinin belirlenmesi.....	48
4.2.2. Liyofilize ekzopolisakkaritin bağırsak patojen mikroorganizmaları tarafından fermentasyonun belirlenmesi	62
4.3. Postbiyotiklerin Fermentasyonu	65
4.4. Liyofilize Ekzopolisakkaritin ve Postbiyotiklerin Gelişimi Düzenleyici Etkilerinin Belirlenmesi	74
4.5. Liyofilize Ekzopolisakkaritin Prebiyotik Skorunun Belirlenmesi.....	75
4.6. Liyofilize Ekzopolisakkaritin Mide Asidine Direnci	80
4.7. Bağırsak Patojen Mikroorganizmalarının Biyofilm Aktivitelerinin Belirlenmesi	85
4.7.1. Biyofilm aktivitelerinin kongo red yöntemi ile fenotipik olarak belirlenmesi	85
4.7.2. Biyofilm aktivitelerinin mikropate yöntemi ile belirlenmesi	86
4.8. Probiyotik, Prebiyotik, Sinbiyotik, Postbiyotik ve Parabiyoiklerin Antibiyofilm Aktivitesinin Belirlenmesi.....	89
4.9 Probiyotik, Prebiyotik, Sinbiyotiklerin, Postbiyotik ve Parabiyoik Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	98
5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR	103
KAYNAKLAR	113
ÖZGEÇMİŞ.....	133

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***LACTOBACİLLUS RHAMNOSUS ACS5* BAKTERİLERİNDEN ELDE EDİLEN EKZOPOLİSAKKARİTLERİN PREBİYOTİK VE ANTİBİYOFİLM AKTİVİTELERİ**

Abdulkerim KOCAOĞLU

**Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ

ÖZET

Bu çalışmada *Lactobacillus rhamnosus* ACS5'ten elde edilen liyofilize ekzopolisakkaritin (L-EPS), potansiyel probiyotik mikroorganizmalar tarafından fermentasyonu ile gelişimi düzenleyici etkisi, mide asidine dirençliliği ve prebiyotik skor aktivitesinin belirlenmesiyle prebiyotik olarak kullanım potansiyelinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Ayrıca probiyotik, prebiyotik (ACS5-L-EPS), postbiyotik ve parabiyoitiklerin antibiyofilm ile antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. L-EPS'nin *Lactobacillus rhamnosus* EDS4, *Pediococcus acidilactici* 5008 ile *Saccharomyces cerevisiae* BD21 suşlarının gelişimini pozitif yönde etkilediği ve L-EPS'nin en yüksek gelişimi düzenleyici etkisinin *S. cerevisiae* BD21 (10,26 log kob/mL) suşunda olduğu gözlenmiştir. *P. acidilactici* 5008 suşunun 24. ve 48. saatte sırasıyla 2,30 ve 2,92 en yüksek prebiyotik skor aktivitesinin *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 patojeni ile olduğu belirlenmiştir. ACS5-L-EPS'nin mide asidinde hidrolizinin inulinden daha düşük olduğu tespit edilmiştir. ACS5-L-EPS'nin test edilen miktarlarının *Escherichia coli* ATCC 11229'ye karşı gösterdikleri biyofilm inhibisyon oranlarının *Listeria monocytogenes* ATCC 7644'ten yüksek olduğu belirlenmiştir. ACS5-postbiyotiğinin antibiyofilm aktivitesinin *E. coli* ATCC 11229 suşuna karşı $20,3 \pm 11,17$ iken *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşuna karşı $10,95 \pm 4,03$ oranında olduğu gözlemlenmiştir. Parabiyoitiklerin, *E. coli* ATCC 11229 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 bağırsak patojenlerinin üretmiş oldukları biyofilmler üzerinde sırasıyla %27,75 ve %65,25 inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir. Probiyotik, prebiyotik, sinbiyotiklerin ve postbiyotiklerin *E. coli* ATCC 11229 test bakterisine antimikrobiyal etkisinin, *L. monocytogenes* ATCC 7644'den yüksek olduğu belirlenirken parabiyoitiklerde antimikrobiyal etki tespit edilmemiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda *L. rhamnosus* ACS5'ten elde edilen ACS5-L-EPS'nin prebiyotik olarak kullanım potansiyeli olduğu öngörülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Ekzopolisakkarit, Prebiyotik, Biyofilm, Fermantasyon, Antibiyofilm.

Ocak, 2022; 133 sayfa

M.Sc. THESIS
PREBIOTIC AND ANTIBIOPILIM ACTIVITIES OF
EXOPOLISACHARIDES FROM *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* ACS5

Abdulkerim KOCAOĞLU

Aksaray University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biotechnology and Molecular Biology

Supervisor: Prof. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ

ABSTRACT

In this study, it was aimed to reveal the prebiotic potential of lyophilized exopolysaccharide (L-EPS), which was obtained from *Lactobacillus rhamnosus* ACS5 by determining the growth regulatory effect, gastric acid resistance and prebiotic score activity by fermentation with potential probiotic microorganisms. In addition, antibiofilm and antimicrobial activities of probiotics, prebiotics (ACS5-L-EPS), postbiotics, and parabiotics were determined. It was observed that ACS5-L-EPS positively affected the growth of *Lactobacillus rhamnosus* EDS4, *Pediococcus acidilactici* 5008, and *Saccharomyces cerevisiae* BD21 strains. The highest growth regulatory effect of ACS5-L-EPS was obtained in *S. cerevisiae* BD21 (log 10.26 cfu/mL). *P. acidilactici* 5008 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 pathogen strains showed the highest prebiotic score activity of 2.30 and 2.92 at 24 and 48 hours, respectively. It was determined that the hydrolysis of ACS5-L-EPS in gastric acid is lower than that of inulin. It was found that the biofilm inhibition rates of the tested concentrations of ACS5-L-EPS against *Escherichia coli* ATCC 11229 were higher than *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Antibiofilm activity of the ACS5-postbiotic was observed to be 20.3±11.17% against *E. coli* ATCC 11229, while it was found to be 10.95±4.03% against *L. monocytogenes* ATCC 7644. It was determined that parabiotics showed 27.75% and 65.25% inhibition on biofilms produced by *E. coli* ATCC 11229 and *L. monocytogenes* ATCC 7644 intestinal pathogens, respectively. While it was detected that the antimicrobial effect of probiotic, prebiotics, symbiotics, and postbiotics on *E. coli* ATCC 11229 test bacteria was higher than *L. monocytogenes* ATCC 7644, but no antimicrobial effect was obtained with parabiotics. As a result of the studies, it was suggested that ACS5-L-EPS obtained from *L. rhamnosus* ACS5 has the potential to be used as a prebiotic.

Keywords: Exopolysaccharide, Prebiotic, Biofilm, Fermentation, Antibiofilm.

January, 2022; 133 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Fenol sülfirik asit eklenmiş glikoz standartı görüntüsü.	31
Şekil 3.2. İzole edilen EPS'nin fenol sülfirik asit eklenmiş görüntüsü.	31
Şekil 3.3. Glikoz standart grafiği.	32
Şekil 3.4. Her birine 16 mL bakteri ekilen MRS besiyerlerinin 48 saat inkübasyon sonrası görünümü.	33
Şekil 3.5. EPS'lerin viyallere dağıtılmış, en az 1 gece -80 °C'de bekletilmiş ve liyofilize edilmiş hali.	34
Şekil 3.6. ACS5-L-EPS'in liyofilizasyon sonrası görüntüsü.	34
Şekil 3.7. DNS metodu için hazırlanan glikoz standartı.	40
Şekil 4.1. <i>L. rhamnosus</i> EDS4 suşunun %2 L-EPS-MRS ve %2 Glikoz-MRS besi ortamlarındaki gelişim eğrisi.	49
Şekil 4.2. <i>P. acidilactici</i> 5008 suşunun %2 L-EPS-MRS ve %2 Glikoz-MRS besi ortamlarındaki gelişim eğrisi.	49
Şekil 4.3. <i>S. cerevisiae</i> BD21 suşunun %2 L-EPS-YEPD ve %2 Glikoz-YEPD besi ortamlarındaki gelişim eğrisi.	50
Şekil 4.4. <i>L. rhamnosus</i> EDS4 suşunun %2 oranında L-EPS, glikoz, inülin içeren MRS ile glikozsuz MRS besi ortamlarındaki fermentasyon sonrası canlılıklarının karşılaştırılması.	53
Şekil 4.5. <i>L. rhamnosus</i> EDS4 suşunun %2 L-EPS-MRS besi ortamında fermentasyon sonrası 10^{-5} (A), 10^{-6} (B) ve 10^{-7} (C) dilisyonlarındaki kolonilerinin görüntüsü.	54
Şekil 4.6. <i>P. acidilactici</i> 5008 suşunun %2 oranında L-EPS, glikoz, inülin içeren MRS ile glikozsuz MRS besi ortamlarındaki fermentasyon sonrası canlılıklarının karşılaştırılması.	57
Şekil 4.7. <i>P. acidilactici</i> 5008 suşunun %2 L-EPS-MRS besi ortamında fermentasyon sonrası 10^{-5} (A), 10^{-6} (B) ve 10^{-7} (C) dilisyonlarındaki kolonilerinin görüntüsü.	58
Şekil 4.8. <i>S. cerevisiae</i> BD21 suşunun %2 oranında L-EPS, glikoz, inülin içeren YEPD ile glikozsuz YEPD besi ortamlarındaki fermentasyon sonrası canlılıklarının karşılaştırılması.	61
Şekil 4.9. <i>S. cerevisiae</i> BD21 suşunun %2 L-EPS-YEPD besi ortamında fermentasyon sonrası 10^{-5} (A), 10^{-6} (B) ve 10^{-7} (C) dilisyonlarındaki kolonilerinin görüntüsü.	62
Şekil 4.10. ACS5-L-EPS'nin bağırsak patojenleri tarafından fermentasyon grafiği.	64
Şekil 4.11. <i>L. rhamnosus</i> EDS4 suşunun %2 oranında postbiyotik, glikoz, inülin içeren MRS ile glikozsuz MRS besi ortamlarındaki fermentasyon sonrası canlılıklarının karşılaştırılması.	67
Şekil 4.12. <i>P. acidilactici</i> 5008 suşunun %2 oranında postbiyotik, glikoz, inülin içeren MRS ile glikozsuz MRS besi ortamlarındaki fermentasyon sonrası canlılıklarının karşılaştırılması.	70
Şekil 4.13. <i>S. cerevisiae</i> BD21 suşunun %2 oranında postbiyotik, glikoz, inülin içeren YEPD ile glikozsuz YEPD besi ortamlarındaki fermentasyon sonrası canlılıklarının karşılaştırılması.	73
Şekil 4.14. L-EPS'nin potansiyel probiyotik mikroorganizmaların gelişimini düzenleyici etkisi.	75
Şekil 4.15. L-EPS'nin ve ticari prebiyotik inulinin prebiyotik skor aktiviteleri (log kob/mL).	79

Şekil 4.16. ACS5-L-EPS'nin farklı pH' lardaki mide sıvısında farklı inkübasyon sürelerindeki % hidrolizi.	83
Şekil 4.17. İnülinin farklı pH' lardaki mide sıvısında farklı inkübasyon sürelerindeki % hidrolizi.	84
Şekil 4.18. Kongo Red Agarda (A) <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 suşunun orta derece biyofilm aktivitesini gösteren siyah ve kırmızı koloniler; (B) <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 suşunun zayıf biyofilm aktivitesini gösteren kırmızı koloniler.	86
Şekil 4.19. Patojen mikroorganizmaların mikropate yöntemine göre biyofilm yapma yetenekleri.	87
Şekil 4.20. (A) Kristal viyole boyanma sonrası ve (B) %33 glasiyel asetik asit ile çözdürülmüş biyofilmlerin mikropate görüntüsü.	89
Şekil 4.21. Prebiyotik ACS5-L-EPS'nin <i>E. coli</i> ATCC 11229 ve <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 11229 patojenleri ile antibiyofilm aktivitesi.	91
Şekil 4.22. Postbiyotik ve probiyotiklerin <i>E. coli</i> ATCC 11229 ve <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 patojenleri ile antibiyofilm aktivitesi.	93
Şekil 4.23. Postbiyotik ve prebiyotiklerin birlikte <i>E. coli</i> ATCC 11229 ve <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 patojenleri ile antibiyofilm aktivitesi.	94
Şekil 4.24. Parabiyoitiklerin prebiyotik ve postbiyotiklerin birlikte (sinbiyotik) <i>E. coli</i> ATCC 11229 ve <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 patojenleri ile biyofilm inhibisyonu.	97
Şekil 4.25. Postbiyotik(A), prebiyotik (B) ve inülin (C) antimikrobiyal petri görüntüleri.	99
Şekil 4.26. İnülinin (A), Prebiyotik (B) ve Postbiyotiklerin (C) <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 suşuna karşı antimikrobiyal etkileri.	100
Şekil 4.27. Sinbiyotiklerin <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 ve <i>E. coli</i> ATCC 11229 patojenleri ile antimikrobiyal aktivitesi.	101

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Probiyotik türlerin potansiyel faydaları.....	4
Çizelge 2.2. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar.....	7
Çizelge 2.3. Prebiyotik kaynakları.....	9
Çizelge 2.4. Prebiyotiklerin endüstriyel üretimi.....	11
Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan bakteriler ve suş kodları.....	26
Çizelge 3.2. Man Rogosa Sharpe (MRS) besiyerinin içeriği.....	27
Çizelge 3.3. Yeast Extract Pepton Dextrose (YEPD).....	28
Çizelge 3.4. M9 minimal besiyeri.....	28
Çizelge 3.5. Brain Heart infusion (BHI) besiyerinin içeriği.....	29
Çizelge 4.1. <i>L. rhamnosus</i> ACS5 suşunun kültür ortamından izole edilen ve liyofilize edilen EPS miktarları (mg/L).....	48
Çizelge 4.2. <i>L. rhamnosus</i> EDS4 suşunun %2 oranında L-EPS, glikoz, inülin içeren MRS ile glikozsuz MRS besi ortamlarındaki fermantasyon sonrası canlılıkları.....	52
Çizelge 4.3. <i>P. acidilactici</i> 5008 suşunun %2 oranında L-EPS, glikoz, inülin içeren MRS ile glikozsuz MRS besi ortamlarındaki fermantasyon sonrası canlılıkları.....	56
Çizelge 4.4. <i>S. cerevisiae</i> BD21 suşunun %2 oranında L-EPS, glikoz, inülin içeren YEPD ile glikozsuz YEPD besi ortamlarındaki fermantasyon sonrası canlılıkları.....	60
Çizelge 4.5. L-EPS'nin bağırsak patojenleri tarafından fermantasyonu.....	63
Çizelge 4.6. <i>L. rhamnosus</i> EDS4 suşunun %2 oranında postbiyotik, glikoz, inülin içeren MRS ile glikozsuz MRS besi ortamlarındaki fermantasyon sonrası canlılıklarının karşılaştırılması.....	66
Çizelge 4.7. <i>P. acidilactici</i> 5008 suşunun %2 oranında postbiyotik, glikoz, inülin içeren MRS ile glikozsuz MRS besi ortamlarındaki fermantasyon sonrası canlılıklarının karşılaştırılması.....	69
Çizelge 4.8. <i>S. cerevisiae</i> BD21 suşunun %2 oranında postbiyotik, glikoz, inülin içeren YEPD ile glikozsuz YEPD besi ortamlarındaki fermantasyon sonrası canlılıklarının karşılaştırılması.....	72
Çizelge 4.9. L-EPS'nin ve postbiyotiklerin potansiyel probiyotik mikroorganizmaların gelişimini düzenleyici etkisi.....	75
Çizelge 4.10. L-EPS'nin prebiyotik skor aktivitesi (log kob/mL).....	77
Çizelge 4.11. Ticari prebiyotik inulinin prebiyotik skor aktivitesi (log kob/mL).....	78
Çizelge 4.12. L-EPS ve inülinin farklı pH' daki mide sıvısında farklı inkübasyon sürelerindeki % hidrolizi.....	82
Çizelge 4.13. Bazı patojen bakterilerin Kongo Red yöntemi ile belirlenen biyofilm oluşumları.....	85
Çizelge 4.14. Patojen mikroorganizmaların mikropate yöntemi ile belirlenen biyofilm aktiviteleri.....	88
Çizelge 4.15. Prebiyotik ACS5-L-EPS'nin % biyofilm inhibisyonu.....	91
Çizelge 4.16. Probiyotik ve postbiyotiklerinin <i>E. coli</i> ATCC 11229 ve <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 suşlarının biyofilmlerini inhibisyon yüzdeleri.....	92

Çizelge 4.17. Postbiyotik ve prebiyotiklerin <i>E. coli</i> ATCC 11229 ve <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 suşlarının biyofilmlerini inhibisyon yüzdeleri.	94
Çizelge 4.18. Parabiyotiklerin prebiyotik ve postbiyotiklerin birlikte <i>E. coli</i> ATCC 11229 ve <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 patojenleri ile antibiyofilm aktivitesi.	96
Çizelge 4.19. Postbiyotik ve Prebiyotiklerin <i>E. coli</i> ATCC 11229 suşu üzerindeki antimikrobiyal etkisi.	98
Çizelge 4.20. <i>E. coli</i> ATCC 11229 ve <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 suşuna karşı probiyotik ve prebiyotik kombinasyonlarının antimikrobiyal etkisi.	99



SİMGELER VE KISALTMALAR

ATCC	Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
atm	Atmosferik Basınç
BHI	Brain Heart Infusion
Dk	Dakika
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
EPAA	Ekzopolisakkarit Akrilamid
EPSs	Ekzopolisakkaritler
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
FOS	Fruktooligosakkaritler
FTase	Fruktosil-transferaz
g	Gram
GI	Gastrointestinal
GOS	Galaktooligosakkaritler
GRAS	Genel Olarak Güvenli
HCl	Hidroklorik Asit
IMO	İzomaltooligosakkaritler
IPS	Hücre İçi Polisakkaritler
kob	Koloni Oluşturan Birim
L	Litre
LAB	Laktik Asit Bakterileri
L-EPS	Liyofilize EPS
log	Logaritma
mL	Mililitre
MRS	Man Rogosa ve Sharpe
Msp	Majör salgılanan proteinler
Mw	Yüksek moleküler ağırlık
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NB	Nutrient Broth
NCTC	Ulusal Tip Kültürleri Koleksiyonu
ng	Nanogram
nm	Nanometre
OD	Optik Dansite
pH	Asitlik Bazlık Birimi
QS	Quorum sensing
r-EPS	Salınan Ekzopolisakkarit
rpm	Dakikada Devir Sayısı
SCFA	Kısa Zincirli Yağ Asitleri
SF	Serum fizyolojik
sp.	Species (türleri)
TCA	Trikloroasetik Asit
TSB	Tryptic Soy Broth
XOS	Ksilooligosakkaritler

YEPD	Yeast Extract Pepton Dextrose
H₂SO₄	Sülfürük Asit
%	Yüzde
°C	Derece santigrat
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre



1. GİRİŞ

Günümüzde tüketicilerin gıda ürünlerini sadece açlıklarını gidermek ve vücutları için gerekli besin maddelerine ulaşmak için değil, aynı zamanda beslenme metabolizması ile ilgili bazı hastalık türlerini önlemek, fiziksel ve zihinsel sağlıklarını iyileştirmek için satın almaları nedeniyle fonksiyonel gıdalara olan talep artmaktadır (Betoret vd., 2011). Gıda ürünlerinin prebiyotiklerin yanı sıra probiyotiklerle zenginleştirilmesi, farklı fonksiyonel gıdaların geliştirilmesi için önemli teknolojik süreçlerden biridir (Bernat vd., 2015; Hashemi vd., 2015; Ziemer ve Gibson, 1998).

Bitkilerden, mantarlardan, makro alglerden ve diğer kaynaklardan elde edilen doğal polisakkaritler, etkili sağlık yararları nedeniyle fonksiyonel gıda bileşenleri olarak geniş çapta araştırılmıştır. Bu kompleks polisakkaritlerin çoğu sindirilemez olduğundan, en olası kullanım ve etki yerleri bağırsak mikrobiyotasıdır (Ríos-Covián vd., 2016). Bu bağlamda, son çalışmalarda doğal polisakkaritlerin bağırsak mikrobiyotası üzerindeki veya bununla ilişkili çalışmalarda artış görülmektedir (Mendis vd., 2016; Seong vd., 2019; Shang vd., 2017).

Bakteriyel ekzopolisakkaritlere (EPSs) olan ilgi artmıştır, çünkü bu biyopolimerler genellikle EPS üretimi için daha uygundur ve bitkilerden, deniz yosunlarından, hayvanlardan elde edilen diğer doğal polisakkaritlere göre daha fazla avantaj göstermektedir (Zayed vd., 2021). Bakterilerden elde edilen biyopolimerlerin biyosentezinin, pahalı, tehlikeli ve yenilenemez ham maddeler ile kimyasalların kullanıldığı metolarla karşılaştırıldığında daha uygulanabilir alternatif kaynak olduğu görülmektedir. Ayrıca bu moleküllerin, ilaç ve gıda gibi farklı endüstriyel sektörlerdeki birçok ticari uygulama için benzersiz, biyouyumlu ve çevre dostu kaynaklar olduğu bildirilmiştir (Yildiz ve Karatas, 2018).

Laktik asit bakterilerinden (LAB) elde edilen ekzopolisakkaritler (EPS), bu biyopolimerlerin fonksiyonel özelliklerinin yanı sıra Genel Olarak Güvenli (GRAS) statüleri nedeniyle son on yılda özel bir ilgi kazanmıştır (Dertli vd., 2016). EPS'nin gıda ürünlerinin fizikokimyasal özellikleri (Yilmaz vd., 2015) ve probiyotik fonksiyonlar üzerindeki rolü üzerinde çalışmalar bulunmaktadır (Horn vd., 2013).

Spesifik büyüme koşulları altında, *Lactobacillus* sp. türleri, gıda ve ilaç endüstrisinde potansiyel olarak kullanılabilir çok çeşitli EPS yapıları üretir (Donot vd., 2012).

Bu çalışma kapsamında; *Lactobacillus rhamnosus* ACS5'ten izole edilip liyofilize hale getirilen EPS'nin (ACS5-L-EPS)

- ✓ Prebiyotiklerin bağırsak mikroflorasında yararlı mikroorganizmaların gelişimlerini desteklerken, patojen mikroorganizmalar tarafından kullanılamamaları gerekmektedir. Bu nedenle *Lactobacillus rhamnosus* ACS5'ten izole edilen ve liyofilize edilen ACS5-L-EPS'nin mikroflorada bulunan mikroorganizmalar tarafından fermente edilebilirliğinin tespit edilmesi,
- ✓ Son zamanlarda bağışıklığı yetersiz bireyler gibi hassas kişilere canlı mikroorganizmaların (probiyotik vb.) verilmesinin işlevselliği ve güvenliği konusunda bazı endişeler dile getirilmiştir. Postbiyotikler, canlı mikroorganizmalar içermediğinden dolayı bu durumun çözümü olabileceği düşünülmektedir. *L. rhamnosus* ACS5'ten elde edilen ACS5-postbiyotiğinin mikroorganizmalar tarafından besin kaynağı olarak kullanılabilirliğinin belirlenmesi,
- ✓ Prebiyotiklerin bağırsakta bulunan yararlı mikroorganizmalar tarafından kullanılabilmesi için öncelikle mide asidine dirençli olup bağırsağa ulaşmaları gerekmektedir. ACS5-L-EPS'nin mide asidine direncinin araştırılması,
- ✓ Prebiyotikler bağırsak mikroflorasında bulunan mikroorganizmaların gelişimi düzenlemeye katkı sağlamaktadır. Prebiyotik ACS5-L-EPS (prebiyotik) ve *L. rhamnosus* ACS5-postbiyotiğinin potansiyel probiyotik mikroorganizmaların gelişimini düzenleyici etkilerinin tespit edilmesi,
- ✓ Prebiyotiklerin kullanılabilirliğinin belirlenmesi için prebiyotik skor önemlidir. *L. rhamnosus* ACS5'ten elde edilen ACS5-L-EPS'nin bağırsak patojenleri ile prebiyotik skorunun belirlenmesi,
- ✓ Biyofilmler insanlar da dahil olmak üzere tüm yüksek organizmalar, bitkilerde ve hayvanlarda kalıcı enfeksiyonlar, tıbbi cihazların ve implantların kontaminasyonu gibi olumsuz etkenlere neden olmaktadır. Araştırmada önce bağırsak patojenlerinin biyofilm yapma oranları tespit edilmiştir. ACS5-L-EPS (prebiyotik), parabiyoitik ve ACS5-postbiyotiklerinin biyofilm oluşturulan patojenler üzerindeki antibiyofilm aktivitelerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Probiyotik

Probiyotikler, yeterli miktarda tüketildiğinde konakçıya sağlık yararı sağlayan canlı organizmalar olarak tanımlanır (FAO/WHO, 2006). Gıda uygulamaları tanımı ise, “gıdanın bir parçası olarak yeterli miktarlarda tüketildiğinde konakçıya sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlanmaktadır (Pineiro ve Stanton, 2007). Tüketicilere gıda ürünleri veya diyet takviyeleri; toz, tablet ve kapsül formları şeklinde ulaşmaktadır. Probiyotikler, tüketilene kadar canlı kalmalı ve olumsuz mide koşullarına dayanıklı olmalı, bağırsak epiteline tutunarak kolonize olabilmelidirler. Yapılan birçok çalışmada probiyotiklerin gastrointestinal sistemden geçebilmek ve bağırsaklara yeterli miktarda ulaşabilmeleri için 10^6 - 10^8 kob/g olarak alınmaları gerektiği düşünülmektedir (Kim vd., 2018).

Tüketicilerin artan farkındalığı nedeniyle probiyotik tüketimi yaygınlık kazanmaktadır. İnsan vücudu çok sayıda mikroorganizma grubundan oluşmaktadır, ancak patojen mikroorganizmaların varlığı, sindirim sürecinde toksik maddelerin birikmesi nedeniyle bağışıklık sisteminin zayıflamasına ve birçok hastalığa neden olmaktadır. Probiyotiklerin yüksek dozlarda tüketilmesi, bu sorunların üstesinden gelmenin alternatif bir yolu olarak önerilmektedir (Reid vd., 2003). Probiyotik mikroorganizmaların gastrointestinal bozuklukların düzenlenmesini (Dodoo vd., 2017), alerjik reaksiyonların inhibisyonu (Cao vd., 2020; Dudek-Wicher vd., 2020; Zwicker vd., 2018), kardiyovasküler sistemin korunması (Cavallini vd., 2016; Dudek-Wichervd., 2020), antioksidan (Shi vd., 2019) ve antitümörijenik etkiler (Abdolalipour vd., 2020; Chuah vd., 2019; Mao vd., 2020) ve hipokolesterolemik özellikleri (Thakkar vd., 2020) üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır.

Probiyotik olarak kullanılan başlıca mikroorganizmalar; *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp., *Enterococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Bacillus* sp. ve mayalardır (Mollakhalilivd., 2017). LAB, normal olarak insan gastrointestinal sisteminde yaşayan en önemli probiyotik mikroorganizmalardır (König ve Fröhlich, 2017). Probiyotik türlerinin potansiyel faydaları Çizelge 2.1’ de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Probiyotik türlerin potansiyel faydaları.

Probiyotik tür	Potansiyel faydalar	Referanslar
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	• Daha fazla asit toleransı • Dehidrasyon işlemlerine karşı oldukça dirençli • Mikroplara neden olan mide ile ilgili rahatsızlığı yok etme potansiyeli • Antifungal ve antioksidan aktiviteler • Hipolipidemik aktiviteyi azaltmak	(Muhammad vd., 2017).
<i>Lactobacillus casei</i>	• Kolesterolün uzaklaştırılması • Kanseri hücreleri proliferasyonuna karşı aktivite • Osteoporoz ile ilişkili riski önleme • Yoğurt, peynir ve fermente süt gibi fonksiyonel süt ürünlerinin geliştirilmesi	(Dimitrellou vd., 2016).
<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	• Asidik koşullara toleranslıdır ve Gastrointestinal (GI) sistemde epitel dokuya tutunabilme • B1 vitamini, B2 vitamini, B9 vitamini ve B12 vitamini gibi temel B vitamini kompleksinin çoğunu üretme • <i>Helicobacter pylori</i> ve diğer patojenler için inhibitör görevi gören reuterin ve organik asitler gibi antimikrobiyal bileşiklerin üretme	(Liu vd., 2016).

Çizelge 2.1. (devam) Probiyotik türlerin potansiyel faydaları.

<i>Lactobacillus paracasei</i>	•Peynir olgunlaşması sırasında faydalı değişiklikler. • Peptidoliz artışı, • Lezzet arttırıcı olarak kullanılır. • Mikroflorayı kontrol etme kapasitesi	(Peralta vd., 2017).
<i>Bifidobacteria</i>	•Bağırsak mikroflorasını stabilize ederek insan sağlığını iyileştirir. • Patojenlere karşı mukozal savunma sistemini güçlendirir.	(Fritzen-Freire vd., 2012).
<i>Lactobacillus sakei</i>	•Gıda kaynaklı bir patojen olan <i>Listeriamonocytogenes</i>'e karşı dirençli aktivite sağlar. •Sosis fermantasyonu sırasında biyojenik amin birikimini azaltır.	(Ferreira vd., 2005).
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	• Fungusların neden olduğu bozulmayı azaltarak ekmeğin raf ömrünü artırır.	(Stefanello vd., 2019).
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	•Ürogenital, solunum veya sindirim kanallarındaki ishali ve bulaşıcı hastalıkları önlemede etkilidir. •Bir aşı adjuvanı olarak kullanılır.	(Li vd., 2016).
<i>Enterococcus faecium</i>	•Gıda muhafazasında potansiyel fayda gösterir ve bağışıklık uyarıcı özellikler sergiler.	(Kanmani vd., 2011).

2.2. Probiyotik Seçim Kriterleri

Probiyotiklerin taranması, adım adım temel bilimsel araştırmalarla ulaşılması gereken ilk ve en önemli adımdır. Bugüne kadar, farklı araştırma grupları tarafından birkaç probiyotik adayı rapor edilmiştir; ancak, kullanımları laboratuvar ölçeğinde sınırlı kalmaktadır. Bu probiyotiklerin tam ölçekli denemesinin yapılması, bu ürünleri pazarda ticarileştirebilmek için önemli görülmektedir. Potansiyel probiyotikleri seçmek için, etki mekanizmaları hakkında bilgi gerekmektedir (Pandiyan vd., 2012). Etkili ajanların doğru şekilde kurulmasına yardımcı olmak için bir probiyotiğin belirli özellikleri içermesi gerektiği yaygın olarak kabul edilmektedir (Priyodip vd., 2017).

Probiyotik seçim kriterleri;

(i) Konakçıya zararsız olmalıdır (Bezkorovainy, 2001),

(ii) İnvaziv ve kanserojen olmamalıdır (Tuomola vd., 2001),

- (iii) Konakçının hedef bölgesine etkili bir şekilde ulaşmalıdır (Pereira vd., 2018),
- (iv) Antibiyotik ve virölans direnç genleri içermeyen plazmite sahip olmalı (Lee vd., 1999),
- (v) Konakçı bağırsak mikroflorasında kolonize olabilmeli ve konak içinde çoğaltılmalıdır (Azizpour vd., 2009),
- (vi) *İn vitro* bulguların aksine aslında konakçı model sisteminde çalışmalıdır (Hasan ve Banerjee, 2020).

2.2.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar

Farklı gruptan mikroorganizmalar probiyotik olarak kullanılmaları için araştırılmıştır (Foligné vd., 2013; FAO/WHO 2001). Probiyotik olarak en fazla çalışılan *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsine ait bakteriler olarak bildirilmiştir ve GRAS statüsünde kabul edilmiştir (Tripathi ve Giri, 2014; Dimitrellou, vd., 2016). Laktobasiller, Bifidobakterilerden spesifik olarak düşük pH'a karşı daha yüksek direnç, süt ve diğer gıda substratlarına ise daha iyi uyum sağladıkları bildirilmiştir (Tripathi ve Giri, 2014). Ancak probiyotiklerden elde edilen özelliklerin ve faydaların sadece cinse değil, aynı zamanda suşa da bağlı olduğu tespit edilmiştir (Nuraida, 2015). Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar Çizelge 2.2.'de verilmiştir (Fijan, 2014).

Çizelge 2.2. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar.

Probiyotik türler	Probiyotik suşlar
<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. cellobiosus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. sakei</i> , <i>L. salivarius</i>
<i>Bifidobacterium</i> sp.	<i>B. adoloscentis</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. thermophilum</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. longum</i> ssp. <i>infantis</i> , <i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i>
<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>
<i>Streptococcus</i> sp.	<i>S. cremoris</i> , <i>S. diacetylactis</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. macedonicus</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. thermophilus</i>
<i>Bacillus</i> sp.	<i>B. cereus</i> , <i>B. clausii</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. mesentericus</i> , <i>B. subtilis</i>
Diğer laktik asit bakterileri	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i>
Mayalar	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ssp. <i>cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ssp. <i>boulardii</i>

2.3. Prebiyotik

Gibson ve Roberfroid (1995) tarafından prebiyotiklerin tanımı “kolondaki bir veya sınırlı sayıda bakterinin büyümesini ve/veya aktivitesini seçici olarak uyararak konakçıyı faydalı bir şekilde etkileyen sindirilemeyen bir gıda bileşeni” olarak yapılmıştır. Bu tanım 2016’da ‘sağlık yararı sağlayan konakçı mikroorganizmalar tarafından seçici olarak kullanılan bir substrat’ olarak güncellenmiştir (Steinert vd., 2016). Üst bağırsak yoluna dirençli ve sindirilmeyen prebiyotiklerin ilk özelliği, sindirim süreçlerinde hidroliz olmadan kolona ulaşması ve burada probiyotik mikroorganizmaların gelişimini etkili bir şekilde uyardığının (bifidobakteriler ve laktobasiller) gösterilmesidir (Gibson ve Collins, 1999; Macfarlane vd., 2008). Bir gıda bileşeninin prebiyotik olarak sınıflandırılması için;

- i. Mide asiditesine direnç,
- ii. Memeli enzimleri ile hidroliz edilmemeli ve gastrointestinal absorpsiyon,
- iii Bağırsak mikroflorası ile fermentasyon ve büyümenin seçici uyarılması ve/veya konakçının sağlığı ile ilişkili potansiyel olarak faydalı bağırsak bakterilerinin

aktivitesini arttırma ve seçici fermentasyon özelliklerini göstermesi gerekmektedir (Gibson vd., 2004; Wang, 2009).

Prebiyotiklerin fermentasyonu sonucunda;

- i. Kısa zincirli yağ asitlerinin ekspresyonunda veya bileşiminde değişiklik,
- ii. Lümen kolon pH'sında bir azalma,
- iii. Azotlu son ürünler ve indirgeyici enzimlerde azalma,
- iv. Konakçı sağlığı için faydalı olan mineral emilimi ve bağışıklık sistemi modülasyonu ile bağlantılı bağlayıcı proteinlerin veya aktif taşıyıcıların ekspresyonun artışına neden olduğu bildirilmiştir (Douglas ve Sanders, 2008; Ślizewska vd., 2012).

2.3.1. Prebiyotik kaynakları

Farklı kimyasal özelliklere ve yapılara sahip birçok prebiyotik bulunmaktadır Stowell (2006) yapmış olduğu çalışmada mevcut prebiyotikleri ortak özelliklerine göre kategorize etmiştir (Çizelge 2.3). İnülin, fruktooligosakkaritler (FOS), galaktooligosakkaritler (GOS), laktuloz ve polidektoz en çok bilinen prebiyotikler olarak kabul edilirken, izomaltooligosakkaritler (IMO), ksilooligosakkaritler (XOS) ve laktitol yeni tespit edilen prebiyotikler olarak kategorize edilmektedir. Son zamanlarda bakterilerden elde edilen EPS'lerin de prebiyotik olarak kullanılabildikleri bildirilmiştir. Mannitol, maltodekstrin, rafinoz, laktuloz ve sorbitol üzerine yapılmış çalışmalarda bu prebiyotiklerin sağlık üzerine etkileri bildirilmiştir (Yeo ve Liong, 2010; Vamanu ve Vamanu, 2010). Nişasta açısından zengin tam tahıllar sağlıklı bireylerin ince bağırsağında emilemediklerinden ve kısa zincirli yağ asitleri üretmek için kolonun mikroflorası tarafından fermente edilebildikleri için tüketimlerinin birçok sağlık yararına yol açtığı düşünülmektedir (Vaidya ve Sheth, 2011).

Çizelge 2.3. Prebiyotik kaynakları.

Prebiyotik türü	Prebiyotik kaynakları	Referanslar
Fruktooligosakkaritler	Kuşkonmaz, şeker pancarı, sarımsak, hindiba, soğan, enginar, buğday, bal, muz, arpa, domates ve çavdar	(Sangeetha vd., 2005).
İzomaltüloz	Bal, şeker kamışı suyu	(Lina vd., 2002).
Ksilooligosakkaritler	Bambu filizleri, meyveler, sebzeler, süt, bal ve buğday kepeği	(Vazquez vd., 2000).
Galaktooligosakkaritler	İnsan sütü ve inek sütü	(Alander vd., 2001).
Siklodekstrinler	Suda çözünür glukanlar	(Singh vd., 2002).
Rafinozooligosakkaritler	Baklagiller, mercimek, bezelye, fasulye, nohut ve hardal tohumları	(Johansen vd., 1996).
Laktuloz	Laktoz (Süt)	(Villamiel vd.,2002).
Laktosükroz	Laktoz	(Kawase vd., 2001).
Palatinoz	Sakkaroz	(Lina vd., 2002).
Maltooligosakkaritler	Nişasta	(Kaneko vd., 1994).
İzomaltooligosakkaritler	Nişasta	(Kaneko vd., 1994).
Arabinoksilooligosakkaritler	Buğday Kepeği	(Eeckhaut vd., 2008).

2.3.2. Prebiyotiklerin elde edilmesi

Prebiyotikler insan sağlığında önemli bir rol oynamaktadır. Kuşkonmaz, şeker pancarı, sarımsak, hindiba, soğan, enginar, buğday, bal, muz, arpa, domates, çavdar, soya fasulyesi, insan ve inek sütü, bezelye, fasulye vb. dahil olmak üzere farklı diyet gıda ürünlerinde doğal olarak bulunmaktadır (Varzakas vd., 2018).

Gıdalarda düşük konsantrasyonlarda bulunmaları nedeniyle endüstriyel olarak büyük ölçeklerde üretilmektedirler. Prebiyotiklerin bazıları hammadde olarak laktoz, sakkaroz ve nişasta kullanılarak elde edilmektedir (Sheraji vd., 2013; Panesar vd., 2013). Çoğu prebiyotikler endüstriyel ölçekte GOS ve FOS olarak sınıflandırıldığından, üretimleri ile ilgili birçok çalışma mevcuttur (Jovanovic-Malinovska vd., 2015).

FOS'lar prebiyotik olarak yaklaşık 36.000 bitkide mevcut olmasına rağmen (Havenaar vd., 1999), bu bitkilerden elde edilen FOS konsantrasyonu prebiyotik olarak değerlendirilmek için yeterli etkilere sahip değildir. Bu nedenle FOS'un sentezlenmesi için farklı çalışmalar yapılmıştır (Sangeetha vd., 2005; Yun, 1996). Glikosidaz ve glikosil-transferaz kullanılarak FOS'lar kimyasal olarak sentezlenebilmektedir. Reaksiyon son ürününün çok düşük olması, kullanılan bileşiklerin tehlikeli ve maliyetli olmasından dolayı endüstriyel ölçekte üretimi yapılamamaktadır (Çizelge 2.4). FOS üretiminde anahtar bir enzim olan Fruktosil-transferaz (FTase), sakkarozdan bir ya da üç fruktoz molekülünü transfer etmesiyle FOS'lar üretebilmektedir (Weijers vd., 2008).

GOS'lar ilk olarak nükleofilik ve elektrofilik yer değiştirme ile kimyasal olarak sentezlenmelerine rağmen, günümüzde bu yöntem endüstriyel ölçekte üretim için ekonomik olarak maliyetli olduğu için kullanılmamaktadır (Palcic, 1999; Weijers vd., 2008). GOS oluşumu için anahtar enzimler galaktosil-transferaz ve galaktosidazdır. Galaktosil-transferaz, yüksek miktarlarda GOS üretebilen stereoselektif bir enzimdir (Weijers vd., 2008). Bununla birlikte, GOS'un galaktosil-transferaz yoluyla biyokatalizi çok maliyetlidir, çünkü bu reaksiyonda substrat olarak nükleotid şekerlere ihtiyaç duyulmaktadır. Reaksiyonun maliyetini azaltmak için globotrioz üretimi (Bouhnik vd., 2004; Weijers vd., 2008) veya insan sütü oligosakkaritlerinin kullanılması gibi bazı yaklaşımlar bulunmaktadır (Albermann vd., 2001; Priem vd., 2002).

Çizelge 2.4. Prebiyotiklerin endüstriyel üretimi.

Prebiyotik türü	Prebiyotik endüstriyel üretim	Referanslar
Rafinoz oligosakkaritler	Bitki materyallerinden su, metanol veya etanol çözeltileri kullanılarak ekstrakte edilebilir	(Johansen Vd., 1996)
Galaktooligosakkaritler	Genellikle inek sütünden elde edilen laktozdan β -galaktosidazların etkisiyle üretilirler.	(Sako vd., 1999)
Laktuloz	Laktozun glikoz parçasını alkali bir izomerasyon işlemi uygulayarak fruktoz tortusuna dönüştürülmesiyle elde edilir.	(Villamiel vd., 2002)
Laktosükroz	Hammadde olarak laktoz ve sakkaroz kullanılarak üretilir	(Kawase vd., 2001)
Fruktooligosakkaritler	Üretim iki farklı şekilde gerçekleşebilir; β -fruktofuranosidaz enziminin transfruktosilasyon aktivitesi kullanılarak disakkarit sakkarozdan üretilirler ya da hindiba köklerinden ekstrakte edilebilen polisakkaritin kontrollü enzimatik hidrolizi ile elde edilebilir.	(Crittenden ve Playne 1996)
İzomaltuloz (Palatinoz)	Doğal olarak oluşan bir disakkarittir Sükrozdan $\alpha(1,2)$ -fruktozidden $\alpha(1,6)$ -fruktozid glikozidik bağın enzimatik olarak yeniden düzenlenmesi ve ardından kristalizasyon ile üretilir.	(Lina vd., 2002)
Glikosilsukroz	Siklomaltodekstrin glukano transferaz enzimi tarafından katalize edilen transglikosilasyon etkisi ile maltoz ve sakkaroz disakkaritlerinden üretilen bir trisakkarittir.	(Crittenden ve Playne 1996)
Maltooligosakkaritler	$\alpha(1:4)$ glikozidik bağ ile bağlanmış α -D-glikoz kalıntıları içerir. Ticari olarak nişastadan, çeşitli α -amilazlar tarafından hidroliz ile birleştirilen pullulanaz ve izoamilaz gibi dallanma enzimlerinin etkisiyle üretilirler.	(Crittenden ve Playne 1996)
Gentiooligosakkaritler	$\beta(1:6)$ glikozidik bağlarla bağlanmış birkaç glikoz kalıntısından oluşur. Nişastanın asit veya enzimatik hidrolizinden ve ardından elde edilen glikoz şurubunun β -glikozidaz enzimi tarafından katalize edilen transglikosilasyon etkisinden üretilirler.	(Crittenden ve Playne 1996)

2.3.3. Prebiyotik etki mekanizmaları

Prebiyotikler;

- Bağırsakta bulunan mikroflora üzerinde ve metabolik aktivitede olumlu etkileri arttırarak konakçı sağlığını etkileyebilir (Meurman ve Stamatova, 2018).
- Konak enzimleri tarafından sindirilemedikleri için kolondaki bağırsak bakterileri tarafından fermente edilir (Meurman ve Stamatova, 2018).
- Lipid metabolizmasındaki modülasyon, immünolojik ve bağırsak fonksiyonları üzerinde olumlu etkisi olan kalsiyum emilimini artırabilir (Pekmez vd., 2018).
- Yapılarına ve bileşimlerine bağlı olarak, bazı prebiyotikler karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilirler (Singh vd., 2017).
- Hepatik lipojenik enzimin düzenlenmesi, fermantasyon sonucunda propiyonik asit, bütirik asit gibi kısa zincirli yağ asitlerinin üretimini arttırabilir (Vonk ve Reckman, 2017).

2.4. Sinbiyotik

"Sinbiyotik" kelimesi sinerji anlamında olmasından dolayı bu terim prebiyotik bileşiklerin seçici olarak probiyotik organizmaları desteklediği ürünler için kullanılmaktadır (Cencic ve Chingwaru, 2010). Sinbiyotiklerin üst bağırsak yolundan geçiş sırasında probiyotik bakterilerin canlı kalma oranını arttırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Probiyotiklerin ve mikrobiyotada bulunan bakterilerin büyümesinin uyarıcı etkisinin yanı sıra kolonda daha verimli bir implantasyon, bağırsak homeostazını ve sağlıklı bir vücudu korumaya katkıda bulunmaktadır (Peña 2007).

Sinbiyotik formülasyonlarda kullanılan probiyotik türler; *Lactobacilli* sp., *Bifidobacterium* sp., *Saccharomyces boulardii*, *Bacillus coagulans* ve prebiyotik olarak FOS, GOS, XOS ve inülinidir.

İnsanlar tarafından sinbiyotik tüketiminin önerilen sağlık yararları;

- 1) Artan laktobasil ve bifidobakteri seviyeleri ve dengeli bağırsak mikrobiyotası,
- 2) Sirotik hastalarda karaciğer fonksiyonunun iyileştirilmesi,
- 3) İmmünomodülasyon yeteneğinin iyileştirilmesi,
- 4) Bakteriyel translokasyonun önlenmesi ve cerrahi hastalarda hastane enfeksiyonlarının insidansının azaltılması olarak bildirilmiştir (Zhang vd., 2010).

2.5. Postbiyotik

Probiyotiklerden elde edilen metabolitlerin insan sağlığı üzerinde yararlı etkilerinin olabileceği bilimsel çalışmalarda gösterilmiştir. Postbiyotikler, probiyotiklerden bir fermantasyon süreciyle üretilen ve/veya laboratuvar ölçeğinde saf formda üretilen çok çeşitli biyoaktif bileşiklerdir. Bu bileşiklerin sahip olduğu doğal biyolojik aktiviteler üzerine kapsamlı çalışmalar yapılmaktadır. Bazı çalışmalar, yalnızca bakteriyel metabolizmanın yan ürünleri olarak tasarlanan postbiyotiklere odaklanmış olsada (Tsilingiri ve Rescigno, 2013), bugüne kadar, hangi maddelerin postbiyotik olarak tanımlanabileceği konusunda hala araştırmacılar arasında bir fikir birliği sağlanamamıştır. Bazı araştırmacılar, "canlı olmayan veya inaktive mikrobiyal hücreler" olarak tanımlanan paraprobiyotikleri, postbiyotiklerin bir alt grubu olarak kabul etmektedirler (Cuevas González vd., 2020). Diğer araştırmacılar ise postbiyotikleri, belirli bakteri suşları tarafından çeşitli maddelerin fermantasyonu ve metabolizasyonu sonucu üretilen çeşitli bileşikler olarak tespit etmişlerdir. Stanton vd. (2005) ise canlı olmayan bakterilerin postbiyotik olarak tanımlanamayacağını, postbiyotik tanımının yalnızca bakteriyel metabolizma ürünleri ile sınırlı kalması gerektiğini bildirmişlerdir.

Probiyotikler tarafından üretilen çözünür bileşiklerin belirlenmesi, canlı bakterilerin verilmesi ile ilişkili riskleri önleyeceğini ve etkili yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için bir fırsat temsil edebileceği düşünülmektedir. Bu bileşikler, biyojenik özellikleri ile fermantasyon işlemi sırasında biyoaktif metabolitlerin mikrobiyal üretiminden kaynaklanan probiyotiklerle fermente edilmiş fonksiyonel gıdaların geliştirilmesi potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir (Stanton vd., 2005).

Postbiyotiklerin etki şekli, probiyotik bakterilerin metabolitlerinin varlığından dolayı probiyotiklere benzemektedir. Postbiyotiklerin gastrointestinal sistemde önerilen rolleri, yararlı bakterilerin hayatta kalması ve çoğalması için bağırsak ortamını iyileştirerek patojenlerin kolonizasyonunu önlemektir. Postbiyotiklerin öngörülen mekanizmasında mikrobiyal dengeyi modüle eden faydalı bakterilerin büyümesini teşvik ederek, antimikrobiyal etki gösteren organik asitlerin artmasıyla düşen pH'da patojenlerin gelişimini inhibe edilmesi, bağışıklık hücreleri ile bağışıklık fonksiyonunu indükleyerek patojenler tarafından oluşabilecek bağırsak hastalıklarını önleyebileceği düşünülmektedir (Sanz ve DePalma, 2009; Seo vd., 2010).

Genel olarak, postbiyotiklerin elementel bileşimleri; lipidler (bütirat, propiyonat, dimetil asetil türevli plazmalojen), proteinler (laktosepin, p40 molekülü), karbonhidratlar (galaktoz açısından zengin polisakkaritler ve teikoik asitler), vitaminler/ko-faktörler (B-grubu vitaminleri), organik asitler (propiyonik ve 3-fenillaktik asit) ve peptidoglikan türevli muropeptidler, lipoteikoik asitler gibi kompleks moleküllerden oluşmaktadır (Konstantinov vd., 2013; Tsilingiri ve Rescigno, 2013). Postbiyotikler fizyolojik işlevlerine göre immünomodülasyon, anti-inflamatuar, hipokolesterolemik, anti-obezojenik ve antioksidan gibi farklı etkiler gösterebilmektedir (Nakamura vd., 2016; Sawada vd., 1990; Shin vd., 2010).

Başlıca postbiyotik grupları şunlardır:

1. Karbonhidrat metabolitleri; anaerobik bakteriler, bağırsakta karbonhidrat fermantasyonu yoluyla kısa zincirli yağ asitleri (SCFA'lar) üretir. Polisakkarit, oligosakkarit, protein, peptit ve glikoprotein öncülerinden başlayarak oluşturulurlar. Özellikle, *Bacteroidetes* filumunun bakterileri iyi asetat ve propiyonat SCFA üreticileri iken *Firmicutes* filumundakiler verimli bütirat üreticileridir (Macfarlane, 2003).
2. Amino asit ve ilgili metabolitler; proteinler, *Bacillus*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* ve *Proteobacteria phyla* gibi birçok bakteri türü tarafından metabolize edilir (Gérard, 2013).
3. Lipid ve safra asidi metabolitleri; bağırsak mikrobiyotası, çeşitli modifikasyonlar yoluyla safra asitlerini değiştirir. Deoksikolik asit ve litokolik asit de dahil olmak üzere 20'den fazla farklı ikincil safra asidi

üretir ve ayrıca fosfatidilkolin, trimetilamin-N-oksit üretmek için metabolize edilir (Gérard, 2013).

2.5.1. Postbiyotiklerin etki mekanizmaları

Son yıllarda, çeşitli postbiyotiklerin potansiyel biyoaktivitesini ve/veya sağlık etkilerini değerlendirmek için *in vitro* ve *in vivo* modelleri kullanan önemli sayıda çalışma yapılmıştır. Araştırmalar bağırsak mikrobiyotasının, bağışıklık sisteminin gelişimi, patojenlere karşı savunma ve iltihaplanma dahil olmak üzere gastrointestinal sistemde çok çeşitli işlevleri etkilediğini göstermektedir (Klemashevich vd., 2014).

Bağırsak mikrobiyotası tarafından dönüştürülen amino asit türevleri, potansiyel postbiyotikler olan bir bileşik sınıfını oluşturur. Yapılan bir çalışmada, triptofandan türetilen indolün, ülseratif kolitten muzdarip ancak iyileşmeyen hastalarda fekal numunelerdeki indol konsantrasyonlarının azalmasını, mikrobiyotada disbiyoz ile bir bağlantısının olabileceği düşünülmüştür (Ou vd., 2013). Klemashevich vd., (2014) ise yaptıkları çalışmada indolün, bağırsak epitel hücrelerinde inflamasyon göstergelerini, proinflamatuvar transkripsiyon faktörlerini ve patojen kolonizasyonunu azaltırken, sıkı bağlantı direncini ve müsin üretimini arttırdığını tespit etmeleri sonucunda indolün postbiyotik bir molekül olabileceğini göstermişlerdir.

Generoso vd. (2011), paraprobiyotik *S. boulardii* CNCM I-745 uygulamasının bağırsak geçirgenliğini önlediğini ve sonuç olarak farelerde bağırsak tıkanıklığının neden olduğu bakteriyel translokasyonu azalttığını bulmuşlardır. Takadanohara vd. (2012), yaptıkları bir çalışmada *S. boulardii* KC-1317 suşunun postbiyotiklerinin, hafif stres kaynaklı bağırsak hiper geçirgenliği olan sıçanlarda bağırsak geçirgenliğini önemli ölçüde azalttığını tespit etmişlerdir. Postbiyotiklerin; kolon kanseri hücrelerine karşı antiproliferatif spesifik aktivitelerinin, bağışıklık tepkilerinin düzenlenmesi yoluyla pro-apoptotik hücre ölüm yollarının aktivasyonu ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Tiptiri-Kourpeti vd., 2016). *Lactobacillus* suşlarından elde edilen postbiyotiklerin metalloproteinaz-9 aktivitesini azaltarak kolon kanseri invazyonunu engellediği bildirilmiştir (Escamilla, vd., 2012).

Claes vd. (2012), *L. rhamnosus* GG suşun kültür süpernatantlarından saflaştırdıkları p40 ve p75 proteinlerinin hem murin hem de insan hücre kültürleri ile kültürlenmiş kolon eksplantları üzerindeki etkileri test edildiğinde bu proteinlerin TNF ile indüklenen bağırsak epitel hücrelerini ve organ kültürü hasarını önlediği, apoptozu inhibe ettiği ve proliferatif epitel hücre tepkilerini uyardığı gözlemlenmiştir.

2.5.2. Postbiyotiklerin sağlık üzerine etkileri

İnsanların aldıkları postbiyotik metabolitleri ince bağırsağa ulaştığında hemen sağlığı geliştirici etkilerini gösterebilmektedir. Postbiyotik metabolitlerin en iyi bilinen sağlık etkilerinden bazıları;

- Anti-inflamatuar aktivite (Tedelind vd., 2007),
- Antimikrobiyal peptitler patojenleri öldürür (Pelton, 2020),
- SCFA'lar bağışıklık sistemini düzenlemede önemli roller oynar (Venegas vd., 2019),
- Zayıf asidik bileşikler, optimal bağırsak asit/baz dengesini oluşturur (Hirshfield vd., 2003),
- Hidrojen peroksit, *Candida* gibi mayaların büyümesini baskılar (Nord ve Lidbeck, 1993),
- Fulvik asitler mineralleri bağlar ve hücrelere taşır (Stevenson vd.,1996),
- SCFA bütirat, epitel hücre büyümesi için birincil enerji kaynağıdır (Singh vd.,1997),
- Glutasyon güçlü antioksidan, detoksifikasyon ve bağışıklık sistemini güçlendirici etkilere sahiptir (Pastore vd., 2003),
- Fitoöstrojenler equol/enterolakton/enterodiol östrojen reseptörlerine bağlanarak daha düşük menopoz semptomları ve birçok hastalık için riskini önler (Knight ve Eden, 1996),
- Probiyotik kaynaklı besinlerle (B-vitaminleri ve amino asitler) ilişkili çok çeşitli faydalar sağlar (Lee vd., 2015),

2.6. Parabiyotik

ParaprobİYotikler, yeterli miktarlarda uygulandığında tüketicilere fayda sağlayan inaktİve edilmiş (canlı olmayan) mikrobiyal (probiyotik veya probiyotik olmayan) bozulmamış hücrelerdir. ParaprobİYotikler, canlı olmayan probiyotikler, inaktİve edilmiş probiyotikler veya hayalet probiyotikler olarak da tanımlanmaktadır (De Vuyst ve Degeest, 1999). ParaprobİYotikler; teikoik asitler, peptidoglikan türevli muropeptitler, yüzey çıkıntılı moleküller (pili, fimbriae, flagella), EPS'ler gibi polisakkaritler, hücre yüzeyi ilişkili proteinler, hücre duvarına bağlı biyosümfaktanlar, vb. yapılardan oluşmaktadır (Nataraj vd., 2020). Probiyotik hücrelerin inaktivasyonu, hücre yapısını tamamen bozmadan mikrobiyal hücre bileşenlerini (hücre zarları ve zarfları, proteinler, DNA, vb.) ve fizyolojik fonksiyonları (enzim aktiviteleri ve zar seçiciliği) değiştirebilen fiziksel veya kimyasal işlemler kullanılarak gerçekleştirilebilir (Siciliano vd., 2021).

Probiyotik ürünlerin endüstriyel olarak işlenmesi ve depolanması, probiyotik etkiler için önemli bir gereklilik olan probiyotik hücre canlılığını ciddi şekilde bozabileceğinden, hala teknolojik zorlukları temsil etmektedir. Probiyotik ürünler aslında her ikisi de insan sağlığı üzerindeki faydalı etkilere katkıda bulunabilecek canlı ve cansız hücreler içermektedir (Adams, 2010; Fiore vd., 2020). Ancak probiyotiklerin özellikle yaşlılar ve bağışıklığı yetersiz bireyler gibi hassas kişilere verildiğinde, gıdalardaki canlı mikroorganizmaların işlevselliği ve güvenliği konusunda bazı endişeler dile getirilmiştir (Doron ve Snyderman., 2015).

ParaprobİYotiklerin kullanımı, probiyotiklerin dezavantajların birçoğunun üstesinden gelinmesini sağlamaktadır. Parabiyotikler yeni fonksiyonel gıdaların tasarımında farklı perspektiflere yol açarak, endüstriyel işleme ve pazarlamayı önemli ölçüde kolaylaştırmaktadır. ParaprobİYotikler, kimyasal veya fiziksel özellikleri nedeniyle probiyotiklerin hayatta kalması için uygun olmayan (meyve suyu gibi) birçok gıdaya eklenebilmektedir. Ayrıca, paraprobİYotikler gıda matrisleri ile doğrudan etkileşime girmezler ve organoleptik özelliklerini değİştirmeZler (Guimarães vd., 2020).

Parabiyotikler, gıdanın güvenliğini sağlarken, gıdanın sağlığı geliştirici özelliklerini tamamen bozmadan ısıt işlemden önce eklenebilirler ve antibiyotik tedavilerinden etkilenmezler (Almada vd., 2016).

Paraprobiyotiklerin inaktive hücreleri, probiyotik olarak sağlık etkilerinde rolü olabilecek metabolitleri (bakteriosinler, laktik asit, vitaminler vb.) ve enzimleri üretememektedirler. Bu özellikleri sayesinde paraprobiyotik içeren yeni gıdalar, depolama ve taşıma koşullarından daha az etkilenmekte, böylece daha uzun bir raf ömrü garanti ederek ekonomik avantajlar sağlamaktadır. Parabiyotiklerin bu özellikleri fonksiyonel gıda pazarını daha güvenli ve daha istikrarlı ürünlerle harekete geçirmek için önemli bir fırsat sunabilmektedir (Almada vd., 2016).

2.7. Biyofilm

Doğada bakteriler, çevredeki değişikliklere yanıt verebilen ve uyum sağlayabilen özel görevleri yerine getirerek birbirine ve/veya yüzeylere (biyofilm) bağlı olarak sabit topluluklar oluşturabilirler (Costerton vd., 1999; O'Toole vd., 2000; Hall-Stoodley ve Stoodley, 2002). Biyofilmler, hücrelerin sıklıkla birbirine ve/veya bir yüzeye yapışan, kendi ürettiği hücre dışı polimerik maddelerden (EPS) oluşan bir matris içine gömüldüğü mikroorganizma kümeleri olarak tanımlanmıştır. Mikroorganizmalar biyofilm içinde işbirlikçi bir şekilde yaşarlar (Costerton vd., 1995). Mikroorganizmaların ortamdaki en baskın yaşam tarzı olan biyofilmler, tüm organik materyalin %50 ila %90'ını oluşturan EPS'den oluşur (Flemming vd., 2000). Biyofilm oluşumu, mikrobiyal bağlanma ile başlayan, ardından hücre-hücre iletişiminde yer alan EPS, sinyal moleküllerinin üretimi ve hücrelerin planktonik forma dağılması ile biten çok aşamalı bir süreçtir (Characklis vd., 1990). Planktonik yaşam tarzından farklı olarak, biyofilmler; çevresel, kimyasal ve mekanik streslere karşı koruma sağlamaktadır. Matris, bakteriler arasındaki boşluğu doldurarak mekanik bir kohezyon stabilitesi üretir. Bu stabilite sayesinde biyofilmlere gömülü mikroorganizmalar yüksek bir hayatta kalma potansiyeline sahip olmaktadır (Azeredo vd., 2017).

Biyofilmler, dünya üzerindeki en yaygın ve başarılı yaşam biçimlerinden biridir. Su, toprak, tortu ile yeraltı ortamlarındaki çoğu elementin biyojeokimyasal döngü süreçlerini yönlendirirler. Bitkiler, hayvanlar ve insanlar da dahil olmak üzere tüm yüksek organizmalarda kalıcı enfeksiyonlar, tıbbi cihazların ile implantların kontaminasyonuna neden olabilen biyofilm oluşturan mikroorganizmalar tarafından kolonize edilmektedir. Biyofilmlerin biyoteknolojik uygulamaları, içme suyunun filtrasyonunu, atık suyunun, katı atıkların bozunmasını ve biyoyakıtların yanı sıra

kimyasalların üretimi gibi biyoteknolojik süreçlerin biyokatalizi içermektedir (Donlan ve Costerton, 2002).

2.7.1. Biyofilm oluşumu

Biyofilm oluşumu, mikrobiyal bağlanma ile başlayan, ardından hücre-hücre iletişimde yer alan EPS, sinyal moleküllerinin üretimi ve hücrelerin planktonik forma dağılmasıyla sonuçlanan çok aşamalı bir süreçtir (Characklis vd., 1990; Azeredo vd., 2017). EPS moleküllerinin matris içinde kendi kendine organizasyonu, matrisin mekanik özelliklerini de belirleyen EPS bileşenleri arasındaki moleküller arası etkileşimlere ve biyofilmdeki organizmaların fizyolojik aktivitesine dayanır (Flemming ve Wingender, 2010). EPS molekülleri, biyofilm kümelerindeki hücrelerin mikrokoloniler içinde bulunduğu bir mekansal organizasyon üreten sürekli, dinamik bir süreç olan biyofilm mimarisinin oluşumuna aracılık eder (Neu ve Lawrence., 2015). Ayrıca EPS molekülleri, biyofilm hücreleri arasındaki boşluğu doldurup şekillendirerek, hücrelerin çevresini ve yaşam koşullarını doğrudan belirler ve biyofilme mekanik stabilite sağlar (Persat vd., 2015). Biyofilmlerin karmaşıklığı, 10^8 ila 10^{11} arasında değişen yüksek hücre yoğunluklarından kaynaklanmaktadır (Flemming vd., 2016). Bu yüksek yoğunluklu ortamlarda bakteriler, çekirdek algılama (QS, Quorum sensing) olarak bilinen hücre-hücre etkileşimi yoluyla fizyolojik süreçlerini iletişim kurar ve düzenler. Bu hücre-hücre etkileşimi, mikropların sosyal yaşamlarını çeşitli davranış kalıplarıyla koordine etmelerini sağlar (Balan vd., 2021).

2.8. Ekzopolisakkarit

Ekzopolisakkaritler (EPS), bakteri üremesi sırasında çevrelerine salgılanan glikoz, fruktoz, mannoz ve galaktoz vb. şekerlerin veya şeker türevlerinin dallanmış, tekrarlayan birimlerini içeren uzun zincirli polisakkaritlerdir (Ismail ve Nampoothiri, 2010). Polisakkaritler bakteri hücrelerini kuruma, toksik metallerin nüfuz etmesi, fagositoz, faj saldırısından koruma ve biyofilm üretmesini sağlamaktadır (Gauri vd., 2009; Öztürk vd., 2009). EPS üreten bakterilerin geniş çeşitliliği arasında, LAB sentezledikleri herhangi bir sağlık riski taşımayan ve GRAS olarak kabul edilen polimerlerin dikkat çekici özelliği nedeniyle özel ilgi görmüştür. Ayrıca EPS üreten LAB'ın kullanılması geliştirilmiş doku ve stabilite ile güvenli, doğal ve sağlıklı bir son ürün ile sonuçlanmaktadır (Ismail ve Nampoothiri, 2010).

LAB tarafından üretilen EPS'ler iki kategoriye ayrılabilir: sadece bir tür monosakkarit içeren homopolisakkaritler ve boyutları di- ile hepta sakkaritler arasında değişen, şeker olmayan moleküller de içerebilen tekrar eden birimlerden oluşan heteropolisakkaritler. Homopolisakkaritler α -D-glukanlar, β -D-glukanlar, fruktanlar ve poligalaktan olmak üzere dört gruba ayrılabilir. Farklı bakteri suşlarından elde edilen EPS'lerdeki farklılıklar dallanma derecesine ve farklı bağlantı gruplarına bağlıdır (De Vuyst ve Degeest, 1999). Zincir omurgası boyunca birkaç kimyasal fonksiyonel grubun varlığı, diğer fonksiyonel gruplarla değiştirilme ve/veya küçük moleküllere, oligomerlere veya diğer polimerlere kovalent olarak bağlanabilen bölgeler oluşturma kabiliyeti verir (Oskuee vd., 2009; Torchilin 2012).

Mikrobiyal polisakkaritler, hücredeki lokalizasyonlarına göre aşağıdaki kategorilere ayrılır: (1) hücre içi polisakkaritler, (2) yapısal polisakkaritler ve (3) hücre dışı polisakkaritler.

Hücre içi polisakkaritler; bu polisakkaritler büyük ölçüde *Pleurotus* spp., *Ganoderma* spp., *Phlebia* spp., *Inonotus* spp., *Tricholoma mongolicum* ve *Trametes versicolor* gibi mantarlarda ve *Bacteroides* gibi bazı bakterilerde bulunur (Zhang vd., 2019)

Yapılan çalışmalarda, hücre içi polisakkaritlerin (IPS) mükemmel antioksidan ve anti-kanser aktivitesinin yanı sıra, onları biyomedikal uygulamalar için yararlı adaylar haline getiren immünomodülatör etkileri bildirmiştir (Zhao vd., 2016; Klosterhoff vd., 2018; Song vd., 2018; Yang vd., 2018).

Yapısal polisakkaritler, hücreye sertlik ve şekil vererek yapısal bütünlük sağladıkları için yapısal polisakkaritler olarak adlandırılırlar. Yapısal polisakkaritler arasında peptidoglikan, nişasta, kitin ve selüloz vb. bulunur. Frei ve Preston (1964), hem fiziksel hem de kimyasal teknikleri kullanarak bazı mikroorganizmaların (*Penicillus*, *Halimeda*, *Udotea*, *Caulerpa* ve *Dichotomosiphon*) hücre duvarlarını incelediklerinde, hücre duvarlarının bileşiminde selüloz olmadığını ve ana yapısal polisakkarit olarak β -1,3-ksilanın varlığını tespit etmişlerdir.

Mikrobiyal hücre dışı polisakkaritler, çeşitlendirilmiş bir doğa sunar ve toplu şekilde EPS olarak adlandırılan dört ana hücre dışı polisakkarit sınıfı (mikrokapsüller ve balçık polisakkaritler, poliamidler, inorganik polianhidritler ve poliesterler) bulunmaktadır (Nwodo vd., 2012).

EPS' nin bileşenleri arasında, polisakkaritler %10-90'a (a/a) karşılık gelebilir; aljinat, jellan, selüloz, hyaluronik asit ve ksantan en yaygın olanlarıdır (Schmid vd., 2015; Vu vd., 2009). EPS'de diğer birçok polisakkarit türü bulunur, ancak çoğu durumda türleri ve kimyasal yapıları belirlenmemiştir (Seviour vd., 2019). EPS'nin bir diğer önemli bileşeni, %10-60 (a/a) oranındaki proteindir. Protein, EPS yapışmasında, ayrıca mikrobiyal hücrelerin toplanmasında, su ile besinlerin emilmesinde, depolanmasında ve korumada önemli bir rol oynamaktadır (More vd., 2014). Ayrıca EPS'de bulunan proteinler hücre dışı enzimler olarak işlev görebilmektedir. Hücre dışı nükleik asitler, hümik asit ve diğer maddelerle birlikte bu bileşenler, tipik olarak heterojen dağılımlar gösteren EPS kompozitlerini oluşturur (Decho ve Gutierrez, 2017).

2.8.1. Ekzopolisakkaritlerin kullanım alanları

Suda çözünür polimerler, temel olarak gıda, farmakoloji (Craig, 2002), tıp (Kainthan vd., 2006) ve doku mühendisliğine odaklanan uygulamalarda sayısız avantaj sunar (Nair ve Laurencin, 2006).

EPS'lerin kullanım alanındaki çeşitlilik, ağırlıklı olarak biyolojik olarak uyumlu, parçalanabilir, emilebilir olması ve toksik olmayan özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Baines vd., 1996; Nair vd., 2007; Noettelet vd., 2008; Schmaljohann, 2006; Tao vd., 2006). Ayrıca, çeşitli ilaç türleri için nanotaşıyıcı olarak kullanılmak üzere sulu çözeltilerdeki polimer nano agregatların davranışının hazırlanmasına ve anlaşılmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır (Malam vd., 2009). EPS'lerin farklı uygulama alanlarının olması araştırmacıların dikkatini çekmiştir ve bu konuda yapılan çalışmalar artmıştır.

Çeşitli mikrobiyal EPS türlerinin tanımlanması ve karakterizasyonu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir, ancak sadece birkaçının önemli ticari değere sahip olduğu tespit edilmiştir (Patel vd., 2010). Agar, 1892'den beri mikroorganizmaların daha iyi büyümesi için çeşitli ortamlarda jelleştirici ajan olarak yaygın olarak kullanılırken, *Gemmatimonas aurantiaca* gibi bazı tatlı su türleri, agar ortamından ziyade gellan sakızı ortamında büyüebilir ve koloni oluşturabilir. Ekzopolisakkarit, akrilamid (EPAA) olarak adlandırılan biyopolimerin laboratuvarlarda agar yerine kullanılabilir iyi bir alternatif olduğu bildirilmiştir. EPAA'nın temel özelliği, mikrobiyal süşun mikrobiyal büyümesini, koloni morfolojisini ve biyokimyasal özelliklerini etkilememesidir. EPAA, sudaki ve soğuk ortamlardaki mikroorganizmaların çevresinde koruyucu mikro habitatlar sağlar. Pullulan gibi diğer EPS'ler, düzenli olarak tekrarlanan D-glukopiranozil birimlerinden oluşan lineer bir homopolisakkarittir. Pullulanda, D- glukopiranozil grupları α -1,3 ve α -1,6 glikosidik bağları ile birleşmiştir (Patel vd., 2010).

Algler, bitkiler ve bakteriler tarafından üretilen birçok polisakkarit türü, gıda katkı maddelerinde tekstüre edici maddeler, emülsifiye edici maddeler veya viskozite arttırıcılar olarak ve fermente sütün kıvamı ile dokusunu arttırmak için yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu polisakkaritlerin kullanımı, gıda üretimi sırasında gıdaya katıldığında gıda endüstrisi için çekici olabilir ve yeni nesil gıda koyulaştırıcılar olarak kullanılabilirler (Zhang vd., 2011). Yoğurt üretimi sırasında peynir altı suyu ayrılmasının (sineresis) önlenmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilen LAB tarafından EPS üretimine artan bir ilgi olmuştur. Ayrıca, GRAS durumları ve reolojik özellikleri nedeniyle, gıda fermentasyonunda kullanım, gelişmiş stabiliteye sahip güvenli ve doğal ürünlerin üretilmesine yol açabilir (Singh ve Saini, 2017). LAB'ların

çeşitliliğinden yararlanılarak çeşitli EPS'ler elde edilebilir. LAB suşları arasında *Streptococcus thermophilus*, probiyotik özellikleri ve yoğurt hazırlamada starter kültür olarak kullanılabilir. Kullanılan bakteri türüne, kültür koşullarına ve ortam bileşimine bağlı olarak üretilen EPS'lerin yapısı, bileşimi ve veriminin değiştiği bildirilmiştir (Kanamarlapudi ve Kuddada, 2017). Son yıllarda pek çok alanda doğal polimerlerin kullanımına olan ilginin artması, bakterilerden EPS üretmeye yönelik araştırmaların geliştirilmesine yol açmıştır. Eşsiz yapısal özellikler, bakteriyel EPS'leri kimya, tıp ve gıda endüstrisi alanlarında özellikle ilgi çekici hale getirmiştir (Kanmani vd., 2011).

EPS'ler; biyoflokülanlar, biyoabsorbanlar, kapsülleyici malzemeler, ağır metal çıkarıcı maddeler, ilaç taşıyıcı maddeler, iyon değişim reçineleri ve hidrofobik moleküller için konakçı olarak da kullanılabilir (Liu vd., 2010; Ismail ve Nampoothiri, 2010). Bakteriyel polisakkaritler, çeşitli tıbbi ve farmasötik endüstrilerde immün sistemi uyarıcı, immünomodülatör, antitümör, antiviral, antiinflamatuvar ve antioksidan ajanlar olarak ilgi çeken bir alternatif haline gelmiştir (Liu vd., 2010; Pan ve Mei, 2010). Dekstranlar, ksantan, gellan, pullulan, maya glukozları ve bakteriyel aljinatlar gibi mikrobiyal EPS'ler potansiyel olarak birçok endüstride gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Freitas vd., 2009; Wang vd., 2008). EPS'ler, su tutma kapasitesinin yüksek olmasından dolayı ekmek, yoğurt ve peynir gibi fermente süt ürünlerinin reolojik özelliğini, dokusunu ve duyarlılığını geliştirmek için gıda endüstrisinde viskoz, stabilize edici ve emülsifiye edici ajanlar olarak yaygın olarak tercih edilmektedir (Garai-Ibabe vd., 2010). EPS'lerin teknolojik özelliklerinin yanı sıra antioksidan, antikanser, anti-inflamatuvar, antiviral aktiviteler ve kolesterol düşürücü gibi potansiyel sağlık yararları da bulunmaktadır (Liu vd., 2010; Nakajima vd.,1992; Pan ve Mei, 2010).

2.8.2. Ekzopolisakkaritlerin prebiyotik olarak kullanımı

Prebiyotikler, bağırsak mikrobiyotasını uyaran canlı olmayan ve sindirilemeyen bileşenler olarak tanımlanmaktadır. Genellikle, polimerizasyon dereceleri 2 ila 20 monomer arasında değişen oligosakkaritlerden oluşmaktadır. Sağlığa faydalı bakteriler tarafından metabolize edilirler ve patojenik organizmalara karşı savaşmak için bağışıklığı geliştirmektedirler (Blatchford vd., 2013).

Ruas-Madiedo vd. (2002) LAB'lardan elde edilen EPS'lerin farklı düzeylerde insan fizyolojisindeki etkisini bildirmiş ve EPS'nin, prebiyotik potansiyellerinin yanı sıra, kan kolesterolünü düşürücü, immünomodülatör, antitümöral ve antiülser ajanlar olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, LAB tarafından salgılanan EPS'lerin, bitki kaynaklı diyetten türetilen polisakkaritlere benzer potansiyel bir prebiyotik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Badel vd., 2011; Caggianiello vd., 2016; Korcz vd., 2018; Salazar vd., 2016). Özellikle, gastrointestinal (GI) yolunun zorlu koşullarına dayanma kapasitesinin farklı EPS'ler arasında farklı olmasının; EPS'lerin fizikokimyasal özelliklerine (Ruijsenaars vd., 2000), bağırsak mikrobiyotasının modülasyon yeteneklerine ve EPS'nin elde edildiği suşa özgü olduğu gösterilmiştir (Ryan vd., 2015).

EPS'lerin prebiyotik olarak kullanımlarının belirlenmesinde öncelikle EPS'lerin bağırsakta bulunan mikroorganizmalar tarafından fermentasyonunu değerlendirilmiştir (DalBello vd., 2001; Das vd., 2014; Hongpattarakere vd., 2012; Tang vd., 2020). Genel olarak EPS'nin prebiyotik etkisi, EPS'yi enzimatik olarak sindirebilen faydalı ve/veya probiyotik bakterilerin (esas olarak LAB ve bifidobakteriler) seçici olarak büyümesini teşvik ederken, patojen mikroorganizmaların inhibisyonu istenilen ana özelliklerden biridir (Prete vd., 2021).

Das vd. (2014), ticari prebiyotik inülin ile karşılaştırıldığında, glukan-DM5'in önemli ölçüde daha düşük sindirilebildiğini ve gastrointestinal kanalda daha uzun süre kalabileceğini göstermiştir. Bu araştırmacılar, glukan-DM5'in probiyotik bakteriler için alternatif bir karbon kaynağı olarak tek başına veya sinbiyotikler şeklinde probiyotik bakterilerle birlikte, insanların gastrointestinal sağlığını etkileme ve iyileştirme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir.

Mahdi vd. (2017), yaptıkları çalışmada sitotoksik etkisi olmayan EPS'nin, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikallerinin söndürülmesi ve lipid peroksidasyonunun inhibisyonu üzerinde bir antioksidan etki göstermiştir. Bu biyolojik özellikler birlikte ele alındığında, EPS'nin bakteriyel biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlar için yeni terapötik stratejilerin tasarımı potansiyel bir prebiyotik ajan olarak kullanılabileceğini önermiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan bakteri kültürleri

Çalışmada prebiyotik özellikleri belirlenmek üzere EPS kaynağı olarak kullanılan *Lactobacillus rhamnosus* ACS5 suşu Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür stoklarından temin edilmiştir. *L. rhamnosus* ACS5 suşu, TÜBİTAK/TBAG 107T486 kodlu ve “Türkiye’nin Geleneksel Peynirlerinde Bulunan Propiyonik Asit Bakteri Türlerinin Belirlenerek, Bazı Probiyotik ve Starter Özelliklerinin Araştırılması” isimli projede kullanılan Türkiye’nin geleneksel ev yapımı peynirlerinden izole edilmiş ve Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen FEF 05/2012-57 kodlu proje kapsamında 16S rRNA dizi analizlerine göre tanımlanmıştır. Çalışmada kullanılacak olan bu suş probiyotik bakteride olması gereken; asit üretimi, antimikrobiyal aktivite, antikolesteromik aktivite, otoagregasyon, koagregasyon ve antibiyotiklere direnç, oksalat degradasyonu, EPS üretim aktiviteleri çalışılmış olan 38 suş arasından yüksek EPS üretici suş olarak belirlenmiş ve üretilen EPS’nin prebiyotik ve antibiyofilm özellikleri belirlenmek üzere seçilmiştir. Çalışmalarda kullanılan diğer test bakterileri ise Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı Kültür Koleksiyonu’ndan alınmıştır. Tez çalışmasında kullanılan bakteriler ve suş kodları Çizelge 3.1’de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan bakteriler ve suş kodları.

Suşlar	Kodları
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ACS5
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	EDS4
<i>Pediococcus acidilactici</i>	5008
<i>Saccharomyces cerevisia</i>	BD21
<i>Enterococcus faecium</i>	RI51
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11229
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Streptococcus mutans</i>	NCTC 8177
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644

3.1.2. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları

Tez çalışmasında test bakterisi olarak kullanılan bakterilerin geliştirilmesi ve aktifleştirilmesinde; *E. faecium* RI51, *E. coli* ATCC 11229, *S. epidermidis* ATCC 12228, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. mutans* NCTC 8177 bakterileri için Nutrient Broth (NB, Merck) besiyeri, *L. monocytogenes* ATCC 7644 için Tryptic Soy Broth (TSB, Merck) besiyeri, *L. rhamnonsus* ACS5, *P. acidilactici* 5008 bakterileri için Man Rogosa ve Sharpe (MRS) besiyeri veya MRS Agar besi ortamları ve *S. cerevisiae* BD21 mayası için Yeast Extract Pepton Dextrose (YEPD) kullanılmıştır. MRS Broth besiyerine %2 oranında bakteri ekimi yapılmış ve 37°C’de 18-24 saat geliştirilen kültürler, en az iki kez aktifleştirildikten sonra çalışmaya alınmıştır. Prebiyotik skor, antimikrobiyal aktivite, biyofilm ve antibiyofilm çalışmalarında kullanılan patojen mikroorganizmaların aktifleştirilmesi NB besiyerine %2 oranında bakteri ekimleri yapılarak 37°C’de 24 saat inkübe edilerek yapılmıştır

Çalışmalarda kullanılan bakterilerin saflıkları Gram boyama yapılarak mikroskopik olarak incelenerek kontrol edilmiştir.

3.1.3. Çalışmalarda kullanılan besiyerleri

Laktik asit bakterilerinin geliştirilmesinde Çizelge 3.2’de içeriği belirtilen Man Rogosa ve Sharpe (MRS) besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri içerisindeki bileşenler tartılarak üzerlerine 1000 mL distile suya tamamlanmış ve manyetik karıştırıcı yardımıyla tamamen homojen hale getirilmiştir. Besiyerlerinin pH’ı 1 M NaOH ve 1 M HCl kullanılarak $6,8 \pm 0,2$ ayarlanarak otoklavda 121°C ’de 15 dk steril edilerek çalışmalarda kullanılmıştır. MRS broth besiyeri Çizelge 3.2’de verilen bileşenler 1000 mL’ye tamamlanarak çözülerek otaoklavda 121°C 1 atm’de 15 dk. steril edilmiştir. Katı besiyeri hazırlamak için %1,5 oranında agar kullanılmıştır. MRS besiyeriyeri hazırlanırken %1’lik Magnezyum sülfat $7\cdot\text{H}_2\text{O}$ solüsyonundan 20 mL ve %1’lik Sodyum asetat $3\cdot\text{H}_2\text{O}$ solüsyonundan 5 mL eklenmiştir (De Man vd., 1960)

Çizelge 3.2. Man Rogosa Sharpe (MRS) besiyerinin içeriği.

Bileşenler	Miktar (g/L)
Pepton	10
Et ekstraktı	8
Maya ekstraktı	4
Glikoz	20
Tween 80	1
Di potasyum hidrojen ortofosfat	2
Magnezyum sülfat $7\cdot\text{H}_2\text{O}$	0,2
Amonyum sitrat	2
Sodyum asetat $3\cdot\text{H}_2\text{O}$	5
Manganez sülfat	0,05

S. cerevisiae BD21’nın geliştirilmesinde içeriği Çizelge 3.3’de verilen YEPD besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri içerisindeki bileşenler tartılarak üzerlerine 1000 mL distile su eklenmiş ve manyetik karıştırıcı yardımıyla tamamen homojen hale getirilmiştir. Besiyerinin pH’ı 1 M NaOH ve 1 M HCl kullanılarak $6,8 \pm 0,2$ ayarlanarak otoklavda 121°C ’de 15 dk steril edilerek çalışmalarda kullanılmıştır. Katı besiyeri hazırlamak için %1,5 oranında agar kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. Yeast Extract Pepton Dextrose (YEPD).

Bileşenler	Miktar (g/L)
Pepton	20
Maya ekstraktı	10
Dekstroz	20

Liyofilize EPS'lerin (L-EPS) bağırsak patojen mikroorganizmaları tarafından fermente edilmesini belirlemek için yapılan çalışmalarda patojenler için Çizelge 3.4'de içeriği belirtilen M9 minimal besiyeri (M9M) kullanılmıştır (Song ve Wei, 2010). Çizelgedeki maddeler belirtilen miktarlarda tartılıp, bir miktar distile su ile manyetik karıştırıcıda homojen hale gelinceye kadar karıştırılmış ve son hacim 1000 mL olmak üzere pH $6,2 \pm 0,02$ 'ye ayarlanmıştır. Besiyeri otoklavda 121°C 'de 15 dk steril edilerek hazırlanmıştır.

Çizelge 3.4. M9 minimal besiyeri.

Bileşenler	g/L
KH_2PO_4	3,0
Na_2HPO_4	6,0
NH_4Cl	1
NaCl	0,5
CaCl_2	0,003

Kongo red yöntemiyle patojenlerin biyofilm yapma yeteneklerinin fenotipik olarak değerlendirilmesinde içeriği Çizelge 3.5'te verilen Brain Heart infusion (BHI) besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri içerisindeki bileşenler tartılarak üzerlerine 1000 mL distile su eklenmiş ve manyetik karıştırıcı yardımıyla tamamen homojen hale getirilmiştir. BHI besiyeri hazırlandıktan sonra üzerine 50 g sakkaroz ve 10 g agar ilave edilmiş ve besiyerinin pH'ı 1 M NaOH ve 1 M HCl kullanılarak $6,8 \pm 0,2$ ayarlanarak otoklavda 121°C 'de 15 dk steril edilerek çalışmalarda kullanılmıştır. Otoklavdan sonra BHI agar 55°C 'ye kadar soğutulduktan sonra 8 g/L konsantrasyonunda Kongo red solüsyonu

0,45 µm disposable filtre ile steril edilerek aseptik koşullarda besiyerine ilave edilmiştir. Katı besiyeri hazırlamak için %1,5 oranında agar kullanılmıştır.

Çizelge 3.5. Brain Heart infusion (BHI) besiyerinin içeriği.

Bileşim	g/L
Buzağı beyni (200 g'dan infüzyon)	12,5
Sığır kalbi (250 g'dan infüzyon)	5,0
Pepton	10,0
Glikoz	2,0
NaCl	5,0
Na ₂ HPO ₄	2,5

Çalışmalarda kullanılan serum fizyolojik çözeltisi (SF) ise %0,875 oranında NaCl tartılarak saf su içerisinde çözündürülmesi ve otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilmesiyle elde edilmiştir.

Fosfat tamponu, 8,0 g NaCl, 5,2 g K₂HPO₄, 7,1 g Na₂HPO₄ ve 2,0 g KCl tartılarak bir miktar distile suda çözülmüş ve son hacmi distile su ile 1000 mL'ye tamamlanarak manyetik karıştırıcıda tüm maddeler homojen hale gelinceye kadar karıştırılıp, pH 7,20 ± 0,02'ye ayarlanarak hazırlanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bakteri kültürlerinin muhafazası

Çalışmalarda kullanılan suşlar uygun besiyerlerinde iki kez aktifleştirilmiştir. Kryo tüpler içerisine 0,4 mL gliserol eklenmiş ve otoklavda 121°C’de 15 dk steril edilmiştir. Saflık kontrolü yapılan aktif kültürlerden 0,6±0,02 mL alınarak içerisinde steril gliserol bulunan tüplere aktararak, hazırlanan stoklar -40°C’de muhafaza edilmiş ve bütün stoklar 6 ayda bir yenilenmiştir.

3.2.2. Bakterilerin ekzopolisakkarit üretimlerinin belirlenmesi

3.2.2.1. Kültür ortamında ekzopolisakkarit üretimlerinin belirlenmesi

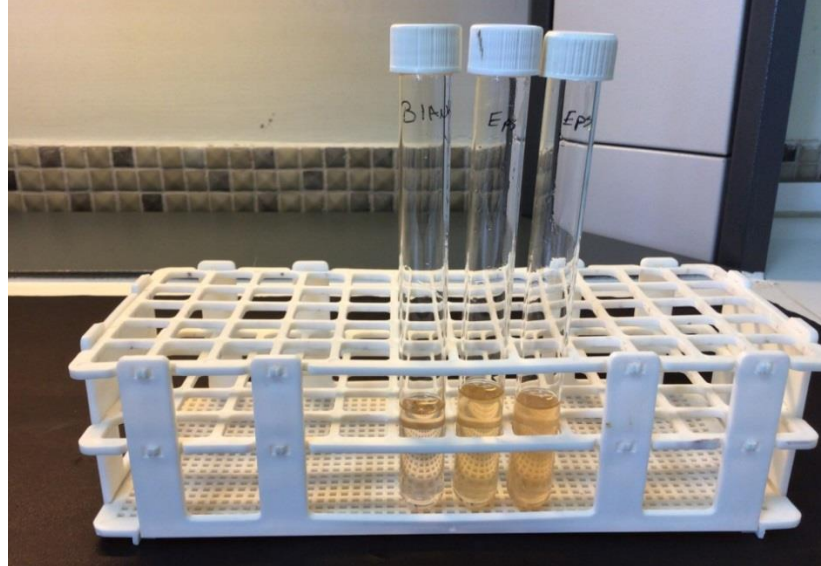
L. rhamnosus ACS5 suşunun kültür ortamında EPS üretimini tespit etmek için MRS broth besiyerinde (Merck) aktifleştirilen suşun 2. aktifinin optik yoğunluğu 600 nm’de 0,6±0,02 (Thermo Scientific, genesys 10s UV-VIS) ayarlanarak, MRS besiyerine %2 oranında aşılanmış ve 37°C’de 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra örneklerden 1’er mL alınarak steril ependorflara aktararak örnekler 100°C’de 15 dk boyunca kaynatılmış ve buz üzerine alınarak soğutma işlemi gerçekleştirilmiştir. Örneklerin ısıları oda sıcaklığına geldikten sonra 12000 rpm’de 15 dk 4°C’de santrifüj (Gyrozen, 1848R) işlemi uygulanarak süpernatant kısmı steril ependorflara aktarılmıştır. Protein ve peptitlerin çöktürülmesini sağlayabilmek için süpernatantın üzerine 1,7 µL triklor asetik asit (TCA) (%85) (Merck) eklenmiş ve 4°C’de 2 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işlemi tamamlandıktan sonra süpernatant temiz ependorfa alınarak üzerine 1 (örnek): 3 (alkol) oranında saf (absolute) alkol eklenerek karıştırılmış ve 4°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. EPS’nin çöktürülmesi için 24 saatlik inkübasyondan sonra örnekler 12000 rpm’de 30 dk 4°C’de santrifüj (Gyrozen, 1848R) edilmiştir. Pellet kısmında bulunan alkol dökülerek 500 µL alkol eklenmiş ve 12000 rpm’de 30 dk 4°C’de santrifüj (Gyrozen, 1848R) işlemi tekrardan uygulanmıştır. Pellet kısmındaki alkol dökülerek 40°C’de kurumaya bırakılmıştır (Kšoňzeková vd., 2016).

Kültürlerin ürettiği EPS miktarlarını hesaplamak için elde edilen EPS 1 mL steril saf suda çözülerek, üzerine 0,5 mL fenol ve 5 mL sülfirik asit (H₂SO₄) eklendikten sonra oda sıcaklığında 10 dk boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örnekler vorteks (İka vortex, Geni vs3) yardımıyla karıştırılmış ve 30°C’de 15-20 dk

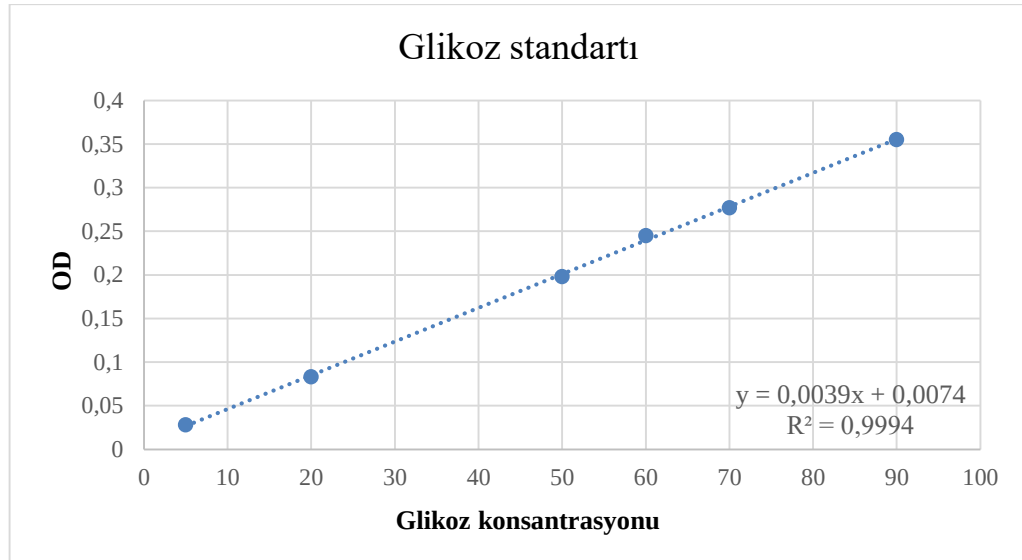
inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örneklerin optikal yoğunluğu spektrofotometrede 490 nm’de (Thermo Scientific, genesys 10s UV-VIS) ölçülmüştür (Dubois, 1956). Kültürlerin ürettiği EPS miktarlarını hesaplamak için 5-100 mg/L arasında değişen oranlarda (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2) glikoz çözeltisi kullanılarak bir standart çıkarılmış ve bu standarta göre üretilen EPS miktarı mg/L cinsinden belirlenmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.1. Fenol sülfirik asit eklenmiş glikoz standartı görüntüsü.



Şekil 3.2. İzole edilen EPS’nin fenol sülfirik asit eklenmiş görüntüsü.



Şekil 3.3. Glikoz standart grafiği.

3.2.2.2. Kültür ortamından kısmi saflaştırılan ekzopolisakkaritlerin lizofilizasyonu

L. rhamnosus ACS5 suşundan elde edilen EPS'ler prebiyotik ve antibiyofilm özelliklerinin belirlenmesi için lizofilize edilmiştir. EPS'lerin lizofilizasyonu Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ denetiminde yapılmıştır. Lizofilizasyon işleminin aşamaları;

1. *L. rhamnosus* ACS5 suşundan 5 mL MRS broth besiyerine %2'lik (5 mL brotha 100 µL bakteri) ekim yapılarak 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir.
2. Aktif kültürler karıştırılarak 8 mL (İka vortex, geni vs3) MRS broth besiyerlerine 160 µL ekim yapılmış ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Bu işlem elimizde her biri 8 mL olmak üzere toplam 8 adet broth olacak şekilde uygulanmıştır.
3. Dört adet 800 mL MRS broth hazırlanmış ve 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir. Büyük hacim MRS'ler otoklavdan çıkarılarak oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Her bir 800 mL'lik MRS besiyerine 2. aktifini yapmış olduğumuz bakterilerden 2 tanesi karıştırılarak (İka vortex, geni vs3) ekilmiş ve 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır (Bu aşamada 4 adet 800 mL büyük hacim MRS besiyerlerinin her birine 16 mL bakteri ekilmiştir) (Şekil 3.4.).

4. Büyük hacim besiyerleri etüvden çıkartıldıktan sonra 80°C'de 10 dk boyunca sıcak su banyosunda inkübe edilerek ve daha sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Ardından her bir 800 mL'lik besiyerine %4 TCA (Merck) eklenerek manyetik karıştırıcıda uygun rpm'de TCA çözünene kadar karışmaya bırakılmıştır. TCA çözündükten sonra örnekler 4000 rpm'de 25 dk boyunca santrifüjlenmiş (Gyrozen, 1848R) ve süpernatant mezürde toplanmıştır. Toplanan süpernatant ölçülerek süpernatantın 2 katı alkol (%96'lık) eklenmiş ve uygun şişelere paylaştırıldıktan sonra +4°C'de 1 gece bekletilmiştir.

5.+4°C'den alınan örnekler 4000 rpm'de 25 dk santrifüjlenmiş (Gyrozen, 1848R) ve süpernatant atılmış ve kalan alkol uçurulmuştur. Her bir falkondaki pellet 2 mL distile su kullanarak pipetaj ile çözdürülmüş ve 500'er µL olacak şekilde viyallere dağıtılmış, -80°C'de 1 gece bekletilerek liyofilizatöre hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.5). Christ alpha, 2-4 LDplus cihazında liyofilizasyonu yapılarak L-EPS çalışmalarda kullanılmıştır (Şekil 3.6) (Kanmani vd., 2011).



Şekil 3.4. Her birine 16 mL bakteri ekilen MRS besiyerlerinin 48 saat inkübasyon sonrası görünümü.



Şekil 3.5. EPS'lerin viyalere dağıtılmış, en az 1 gece -80 °C'de bekletilmiş ve liyofilize edilmiş hali.



Şekil 3.6. ACS5-L-EPS'in liyofilizasyon sonrası görüntüsü.

3.2.3. Liyofilize ekzopolisakkaritin prebiyotik özelliklerinin belirlenmesi

L. rhamnosus ACS5 suşundan elde edilen L-EPS'lerin prebiyotik özellikleri belirlemek için potansiyel probiyotik mikroorganizmalar tarafından fermente edilmesi, gelişimi düzenleyici etkilerinin belirlenmesi, bağırsak patojenleri ile karşılaştırılmalı olarak prebiyotik skor aktiviteleri ve farklı pH'lardaki mide asidine direnci araştırılmıştır.

Yapılan çalışmalarda ACS5-L-EPS'nin prebiyotik özelliklerinin tespit edilmesinde ticari prebiyotik olan inulin (inulin from chicory, Sigma) kontrol olarak kullanılmıştır. Probiyotik suşların geliştikleri kültür ortamından hücreler ayrıldıktan sonra kültür filtratları 0,45 µm çapındaki mikrofiltre ile steril edilerek postbiyotik olarak kullanılmaktadır (Utami ve Mahdi, 2017). Tez çalışmamızda *L. rhamnosus* ACS5 suşundan elde edilen kültür süpernatantları postbiyotik olarak (ACS5-postbiyotik) test edilmiştir.

3.2.3.1. Liyofilize ekzopolisakkaritin potansiyel probiyotik mikroorganizmalar tarafından fermentasyonun ve gelişim eğrilerinin belirlenmesi

L. rhamnosus ACS5 suşundan elde edilen ACS5-L-EPS'lerin potansiyel probiyotik *L. rhamnosus* EDS4, *P. acidilactici* 5008 bakterileri ve *S. cerevisiae* BD21 mayası tarafından fermente edilmesi ve bu mikroorganizmaların gelişim eğrileri Ksande, vd. (2019)'nin kullandıkları metot modifiye edilerek belirlenmiştir. EPS'nin fermente edilebilirliğinin araştırılmasında *L. rhamnosus* EDS4 ile *P. acidilactici* 5008 suşları için MRS broth besiyerinden ve *S. cerevisiae* BD21 mayası içinse YEPD besiyerinden karbon kaynağı tamamen çıkarılmıştır. Karbon kaynağı olarak besiyerlerine çıkarılan karbon kaynağı (%2) kadar L-EPS eklenmiştir. Negatif kontrol olarak karbon kaynağı tamamen çıkarılmış besiyerleri (Glikozsuz MRS ve Glikozsuz YEPD) ve pozitif kontrol olarak glikozlu-MRS ve Glikozlu-YEPD besiyerleri kullanılmıştır. Karşılaştırma yapabilmek amacıyla karbon kaynağı çıkarılan MRS ve YEPD besiyerlerine %2 oranında inülin eklenmiştir. Aktifleştirilen mikroorganizmaların optik yoğunlukları (OD) 600 nm'de $0,6 \pm 0,02$ olarak ayarlanmıştır. OD'leri ayarlanan kültürlerden hazırlanan besiyerlerine %2'lik ekimler yapılmıştır. Ekim yapılan kültürlerden 0, 6, 12, 24 ve 48 saatlerin sonunda örnekler alınarak OD değerleri ölçülmüş ve seri dilisyonları yapılmıştır. Ekimler sonucunda 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Koloni sayıları sayılıp log/mL şeklinde hesaplanmıştır (3.1) (Gürgün ve Halkman, 1990).

$$\text{kob/mL} = \log_{10} \left(\frac{\text{koloni sayısı} \times \text{seyreltme faktörü}}{\text{Ekilen hacim (mL)}} \right) \quad (3.1)$$

Koloni sayısı: inkübasyon sonunda petrilere sayılan koloni sayısı; Seyreltme faktörü: Petrilere ekim yapılan dilisyon oranı (10^n).

3.2.3.2. Liyofilize ekzopolisakkaritin bağırsak patojenleri tarafından fermantasyonun belirlenmesi

Bağırsak patojenlerinin ACS5-L-EPS'yi fermente edilebilmesinin belirlenmesinde *E. coli* ATCC 11229, *E. coli* ATCC 35218 ve *E. faecalis* ATCC 29212 suşları kullanılmıştır. Bağırsak patojenlerinin aktif kültürleri hazırlanmış ve OD'leri 600 nm'de $0,6 \pm 0,02$ (Thermo Scientific, genesys 10s UV-VIS) olarak ayarlanmıştır. Hazırlanan M9 minimal besiyerlerinden %2 oranında glikoz, inülin, L-EPS ve karbon kaynağı olmayan 4 farklı besiyer ortamı hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerlerine OD'si $0,6 \pm 0,02$ olan her bağırsak patojeninden ayrı ayrı %2 oranında ekim yapılarak 37°C 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra L-EPS'lerin patojen mikroorganizmalar tarafından fermente edilerek, canlılıkları üzerinde uyarıcı etkisini tespit etmek için 4 farklı grup besiyerinden 10^{-1} - 10^{-7} seri dilüsyonlar hazırlanarak NA besi ortamı içeren petrilere yayma ekimleri yapılmış 37°C 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda NA besiyer ortamında üreyen koloniler tespit edilerek canlı bakteri sayısı Bölüm 3.2.3.1'de verilen formüle göre (3.1) log kob/mL şeklinde hesaplanmıştır (Kansande vd., 2019).

3.2.3.3. Postbiyotiklerin fermantasyonu

L. rhamnosus ACS5'ten elde edilen metabolitlerin (postbiyotiklerin), potansiyel probiyotik *L. rhamnosus* EDS4, *P. acidilactici* 5008 bakterileri ve *S. cerevisiae* BD21 mayaları tarafından fermente edilmesi araştırılmıştır. *L. rhamnosus* ACS5 suşunun aktif kültürlerinin OD'leri 600 nm de $0,6 \pm 0,02$ 'ye ayarlanarak (Thermo Scientific, genesys 10s UV-VIS) MRS broth besiyer ortamına %2 oranında inoküle edilerek 37°C 'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra *L. rhamnosus* ACS5 suşunun kültürü 5000 rpm'de 15 dk. santrifüj edilerek supernatant ayrılmış 0,45 µm filtre ile

steril edilerek postbiyotik elde edilmiştir. Elde edilen ACS5-postbiyotiği karbon kaynağı tamamen çıkartılan MRS besiyerine %2 oranında eklenerek test edilmiştir. Pozitif kontrol olarak glikozlu MRS ve negatif kontrol olarak glikozsuz MRS besiyerleri kullanılmıştır. Ayrıca karşılaştırma amacıyla MRS besiyerine ticari prebiyotik %2 inülin eklenerek deney grupları oluşturulmuştur. *S. cerevisiae* BD21 mayası için test, pozitif ve negatif kontrol besiyerleri Bölüm 3.2.3.1’de anlatıldığı gibi postbiyotiklerin fermantasyonunu çalışması için de kullanılmıştır. Hazırlanan besiyerlerine *L. rhamnosus* EDS4, *P. acidilactici* 5008 ve *S. cerevisiae* BD21 suşlarının aktif kültürlerinden (OD $0,6\pm0,02$) %2 oranında inoküle edilerek 37°C’de inkübasyona bırakılarak 0, 6, 12, 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde 100 µL örnekler alınarak serum fizyolojik (%0,875’lik) ile 10^{-1} ’den 10^{-7} ’ye kadar seri dilüsyonlar yapılmıştır. 10^{-1} - 10^{-7} dilüsyonlarından MRS agar besi ortamlarına yayma plak yöntemi ile ekimler yapılarak canlı bakteri sayısını tespit etmek üzere 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası besiyerinde oluşan tüm koloniler sayılmış ve canlı bakteri sayımı Bölüm 3.2.3.1’de verilen formüle göre (3.1) log kob/mL şeklinde hesaplanmıştır (Kansande vd., 2019).

3.2.3.4. Liyofilize ekzopolisakkaritin ve postbiyotiklerin gelişimi düzenleyici etkilerinin belirlenmesi

L. rhamnosus ACS5 suşundan elde edilen ACS5-L-EPS ve ACS5-postbiyotiğinin gelişimi düzenleyici aktivitesi *L. rhamnosus* EDS4, *P. acidilactici* 5008 ve *S. cerevisiae* BD21 suşları ile test edilmiştir. ACS5-postbiyotiği ve ACS5-L-EPS karbon kaynağı tamamen çıkartılan MRS besiyerine %2 oranında eklenerek besiortamları oluşturulmuştur. Bu çalışma da *L. rhamnosus* EDS4 ve *P. acidilactici* 5008 suşları için kontrol grubu olarak MRS broth (glikozlu) ve MRS broth’a %2 oranında inülin eklenmiş besiyerleri kullanılmıştır. *S. cerevisiae* BD21 suşu için kontrol grubu olarak YEPD broth (glikozlu) ve YEPD broth’a %2 oranında inülin eklenmiş besiyerleri hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerlerine *L. rhamnosus* EDS4, *P. acidilactici* 5008 ve *S. cerevisiae* BD21 suşlarının aktif kültürleri 600 nm’de $0,6\pm0,02$ değerine ayarlanarak (Thermo Scientific, genesys 10s UV-VIS) %2 oranında ekilmiş ve 37°C’de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda %2 ACS5-postprobiyotikli MRS broth, %2 ACS5-L-EPS içeren MRS broth, glikozlu- MRS broth ve %2 inulin içeren MRS broth besi ortamlarından 100 µL örnekler alınarak serum fizyolojik (%0,875’lik)

ile 10^{-1} 'den 10^{-7} 'ye kadar seri dilüsyonlar yapılmıştır. 10^{-1} - 10^{-7} dilüsyonlarından MRS agar besi ortamlarına yayma plak yöntemi ile ekimler yapılarak canlı bakteri sayısını tespit etmek üzere 37°C 'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası besiyerinde oluşan tüm koloniler sayılmış ve canlı bakteri sayımı Bölüm 3.2.3.1'de verilen formüle göre (3.1) log kob/mL şeklinde hesaplanmıştır (Tang vd., 2020).

3.2.3.5. Liyofilize ekzopolisakkaritin prebiyotik skorunun belirlenmesi

Prebiyotik aktivite, test edilen substratın bir mikroorganizmanın gelişmesini diğerlerine göre pozitif yönde desteklediğini, glikoz gibi prebiyotik olamayan bir karbonhidratla karşılaştırmalı olarak belirlenmesidir. Test edilen karbonhidratların pozitif bir prebiyotik aktivite puanı varsa, (1) probiyotik suşlar tarafından glikoz kadar metabolize edilirler ve (2) probiyotikler tarafından seçici olarak metabolize edilirler, ancak diğer bağırsak bakterileri tarafından metabolize edilemezler. Bu çalışmada *L. rhamnosus* ACS5 suşundan elde edilen ACS5-L-EPS' nin prebiyotik aktivite skoru; potansiyel probiyotik olarak *L. rhamnosus* EDS4, *P. acidilactici* 5008 ve *S. cerevisiae* BD21 suşları üzerinde bağırsak patojeni olarak *E. coli* ATCC 11229, *E. coli* ATCC 35218 ve *E. faecalis* ATCC 29212 suşları ile patojenlerin karışık kültürleri kullanılarak test edilmiştir.

Prebiyotik aktivite skorunda potansiyel probiyotik *L. rhamnosus* EDS4 ve *P. acidilactici* 5008 suşlar için %2 L-EPS ve %2 glikoz içeren 2 farklı MRS broth ve *S. cerevisiae* BD21 suşu içinse iki farklı YEPD broth besiyerleri hazırlanmıştır. Ayrıca kontrol grubu olarak %2 oranında inulin ilave edilen MRS besi ortamı kullanılmıştır. Hazırlanan besiyerlerine *L. rhamnosus* EDS4, *P. acidilactici* 5008 ve *S. cerevisiae* BD21 suşlarının aktif kültürleri 600 nm'de $0,6 \pm 0,02$ değerine ayarlanarak (Thermo Scientific, genesys 10s UV-VIS) %2 oranında ekilmiş ve 37°C 'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 0., 24. ve 48. saatlerinde 100 μL örnekler alınarak serum fizyolojik (%0,875'lik) ile 10^{-1} 'den 10^{-7} 'ye kadar seri dilüsyonlar yapılmıştır. 10^{-1} - 10^{-7} dilüsyonlarından MRS agar besi ortamlarına yayma plak yöntemi ile ekimler yapılarak canlı bakteri sayısını tespit etmek üzere 37°C 'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası besiyerinde oluşan tüm koloniler sayılmış ve Bölüm 3.2.3.1'de verilen koloni sayım formülüne göre (3.1) toplam bakteri sayısı log kob/mL olarak hesaplanmıştır.

Bağırsak patojenleri için %2 L-EPS ve %2 glikoz içeren iki farklı M9 Minimal broth besiyeri (Çizelge 3.4.) besiyerleri hazırlanmıştır. *E. coli* ATCC 11229, *E. coli* ATCC 35218 ve *E. fecalis* ATCC 29212 suşlarından M9 minimal besiyerinde (Çizelge 3.4.) aktifleştirilerek OD'leri 600 nm'de $0,6 \pm 0,02$ 'ye ayarlanmıştır. Hazırlanan %2 L-EPS içeren M9 Minimal besiyeri ile %2 glikozlu M9 Minimal besiyerlerine OD'leri ayarlanan *E. coli* ATCC 11229, *E. coli* ATCC 35218 ve *E. fecalis* ATCC 29212 suşlarından ayrı ayrı ve bu suşların karışık kültürlerinden (1:1:1) %2 oranında ekim yapılmış ve 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 0. 24. ve 48. saatlerinde 100 µL örnekler alınarak serum fizyolojik (%0,875'lik) ile 10^{-1} 'den 10^{-7} 'ye kadar seri dilüsyonlar yapılmıştır. 10^{-1} - 10^{-7} dilüsyonlarından Nutrient agar (NA) besi ortamlarına yayma plak yöntemi ile ekimler yapılarak canlı bakteri sayısını tespit etmek üzere 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası besiyerinde oluşan tüm koloniler sayılmış ve Bölüm 3.2.3.1'de verilen koloni sayım formülüne göre (3.1) toplam bakteri sayısı log kob/mL olarak hesaplanmıştır (Huebner vd., 2007). L-EPS' nin prebiyotik aktivite skor formülü (3.2) kullanılarak 24 ve 48 saat için ayrı ayrı tespit edilmiştir.

Potansiyel prebiyotik ve enterik mikroorganizmaların log kob/mL değerleri hesaplandıktan sonra (3.2)'de belirtilen denkleme göre prebiyotik skor aktivitesi hesaplanmıştır (Huebner vd., 2007).

$$\text{Prebiyotik skor} = \left[\frac{\text{Prebiyotikli ortamda prebiyotik OD değeri 24 saatteki}}{\text{Prebiyotikli ortamda prebiyotik OD değeri 0 saatteki}} - \frac{\text{Glikozlu ortamda prebiyotik OD değeri 24 saatteki}}{\text{Glikozlu ortamda prebiyotik OD değeri 0 saatteki}} \right] - \left[\frac{\text{Prebiyotikli ortamda enterik OD değeri 24 saatteki}}{\text{Prebiyotikli ortamda enterik OD değeri 0 saatteki}} - \frac{\text{Glikozlu ortamda enterik OD değeri 24 saatteki}}{\text{Glikozlu ortamda enterik OD değeri 0 saatteki}} \right] \quad (3.2)$$

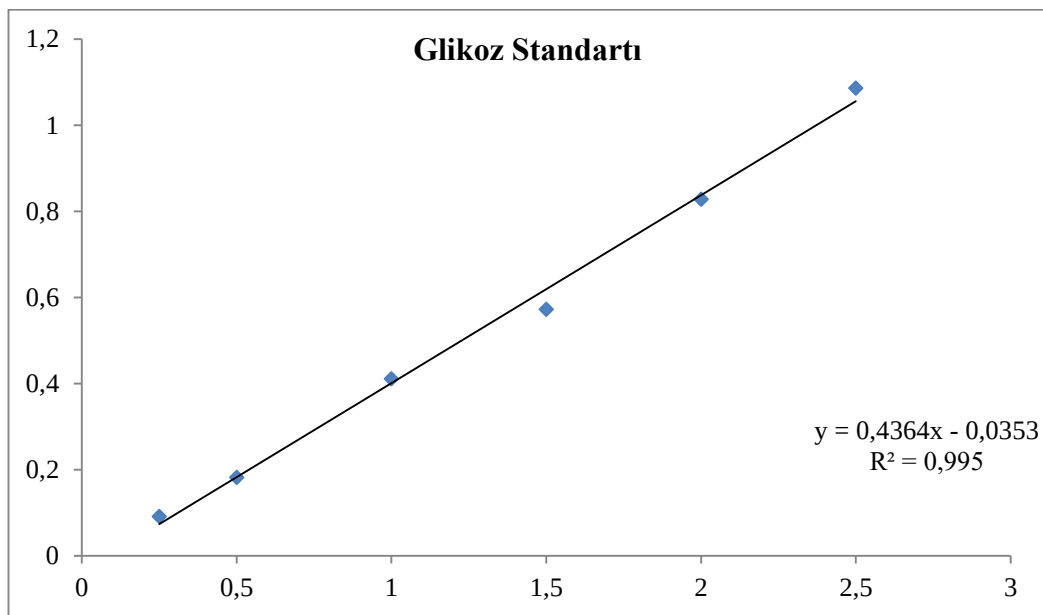
Prebiyotikli ortamda prebiyotik OD değeri: Glikoz çıkartılıp aynı oranda L-EPS eklenen besi ortamında geliştirilen potansiyel prebiyotiklerin OD değerleri; Prebiyotikli ortamda enterik OD değeri: Glikoz çıkartılıp aynı oranda L-EPS eklenen besi ortamında 1:1:1 oranında eklenip geliştirilen bağırsak patojenlerinin OD değerlerini göstermektedir.

3.2.3.6. Liyofilize ekzopolisakkaritin mide asidine direnci

ACS5-L-EPS ile kontrol grubu olarak ticari prebiyotik inulinin farklı pH'daki mide sıvısı ile hidrolizi Wichienchot vd. (2009)'un metoduna göre belirlenmiştir. Yapay mide sıvısı (8 g/L NaCl; 0,2 g/L KCl; 8,25 g/L Na₂HPO₄.2H₂O; 14,35 g/L NaH₂PO₄; 0,1 g/L CaCl₂.2H₂O; 0,18 MgCl₂.6H₂O) hazırlanarak pH'ı 5 M HCL ile 2 paralel

olacak şekilde pH 1, 2, 3, 4 ve 5'e ayarlanmıştır. Saf su içerisinde %1 oranında L-EPS ve inülin çözeltileri hazırlanmıştır. L-EPS mide asidine dirençliliğini belirlemek için farklı pH'lardaki mide asitlerinden 5 mL alınarak üzerine %1 oranındaki L-EPS'den 5 mL eklenerek 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol grubu olan ticari prebiyotik inulin için de aynı işlemler yapılmıştır. İnkübasyondaki farklı pH'daki mide sıvılarından 0, 0,5, 1, 2, 3, 4 ve 5. saatlerde örnekler alınarak total şeker ve indirgenmiş şeker miktarları hesaplanmıştır.

İndirgenen şeker miktarı Robertson vd. (2001)'un dinitrosalisilik asit (DNS) metodu ile tespit edilmiştir. Bu metoda göre; farklı pH'daki ACS5-L-EPS ve inulin içeren mide sıvılarından 0, 0,5, 1, 2, 3, 4 ve 5. saat zaman aralıklarında 150 µL örnek alınarak üzerine 150 µL DNS çözeltisi eklenmiştir. Örnekler karıştırıldıktan (İka vortex, Geni vs3) sonra 100°C'de 5 dk. süresince kaynar suda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda örnekler hızlı bir şekilde buz üstünde soğutulmuştur. Soğutulan örneklerin üzerine 1,5 mL saf su eklenerek spektrofotometrede (Thermo Scientific, genesys 10s UV-VIS) 540 nm'de okuma işlemi yapılmıştır. Kör için 75 µL saf su ile içerisinde L-EPS veya inülin bulunmayan mide sıvısından 75 µL eklenerek DNS metodu uygulanmıştır. ACS5-L-EPS'nin ve inülinin mide asidinde yüzde hidrolizini hesaplamak için 0,5-2,5 mg/mL arasında değişen oranlarda glikoz çözeltisi kullanılarak bir standart çıkartılmış ve bu standarta göre hidroliz sonrası mide asidinde indirgenmiş ACS5-L-EPS ve inülin miktarı mg/mL cinsinden belirlenmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. DNS metodu için hazırlanan glikoz standartı.

Total şeker miktarı fenol sülfirik asit metoduna göre Bölüm 3.2.3.1’de anlatıldığı gibi belirlenmiştir (Dubois vd., 1956). ACS5-L-EPS ve inülinin farklı pH’daki mide sıvılarında ve farklı sürelerdeki hidroliz yüzdeleri aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{Hidroliz} = \left[\frac{\text{İndirgenmiş şeker miktarı}}{\text{Total şeker miktarı-Başlangıçtaki indirgenmiş şeker}} \right] \times 100 \quad (3.3)$$

İndirgenmiş şeker miktarı: DNS metoduna göre hesaplanan şeker miktarı; Total şeker miktarı: Fenol sülfirik asit metoduna göre hesaplanan şeker miktarı; Başlangıçtaki şeker miktarı: 0.saatte hesaplanan şeker miktarı belirlenmiştir.

3.2.4. Bağırsak patojen mikroorganizmalarının biyofilm aktivitelerinin belirlenmesi

3.2.4.1. Biyofilm aktivitelerinin kongo red yöntemi ile fenotipik olarak belirlenmesi

Patojen mikroorganizmalarının biyofilm oluşturma yeteneklerinin fenotipik olarak değerlendirilmesinde Arciola vd. (2002)’de kullandıkları metot uygulanmıştır. *E. faecium* RI51, *E. coli* ATCC 11229, *S. epidermidis* ATCC 12228, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. mutans* NCTC 8177, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *M. luteus* NRRL-B 4375 ve *Bacillus cereus* RSKK 863 patojenlerinin biyofilm aktivitesini belirlemek için patojenlerin aktif kültürlerinden Kongo Red-BHI agar üzerine çizgi ekim yapılmış ve 37°C’de 24 saat aerobik ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, Kongo Red-BHI agar üzerinde siyah koloni oluşturan bakteriler güçlü (+++), kırmızı koloni oluşturanlar zayıf (+), hem kırmızı hem de siyah koloni oluşturanlar ise orta derecede biyofilm pozitif (++) olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4.2. Biyofilm aktivitelerinin mikropate yöntemi ile belirlenmesi

Kongo red yönteminin sonuçlarına göre biyofilm yapma yetenekleri fenotipik olarak değerlendirilen ve en iyi biyofilm yapma yeteneği belirlenen *E. coli* ATCC 11229, *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşları ile zayıf biyofilm aktivitesi gösteren *B. cereus* RSKK 863, *E. faecium* RI51, *E. faecalis* ATCC 29212, *M. luteus* NRRL-B 4375, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. mutans* NCTC 8177, mikroorganizmalarının biyofilm yapma oranları mikropate yöntemi ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

Mikroplate yönteminde test edilecek olan bağırsak patojen mikroorganizmalarının OD'leri 620 nm dalga boyunda $0,5 \pm 0,02$ olarak ayarlanmıştır. Bu çalışmada steril boş besiyeri kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak ayrıca fenotipik olarak zayıf biyofilm aktivitesi tespit edilen *E. faecium* RI51 suşuda kullanılmıştır. OD'leri ayarlanan mikroorganizmalar ve kontrol grupları 96 kuyucuklu mikroplate kuyularına 200 µL eklenmiş ve 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Biyofilm oluşumunu tespit etmek için, inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra kuyulardaki sıvı faz uzaklaştırılmıştır. Kültür ortamından oluşabilecek kalıntıları temizlemek amacıyla kuyular steril SF (%0,875) ile 3 kez yıkanmıştır. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra kuyular 200 µL %95'lik metanol ile 15 dk. fikse edilmiştir. Ardından kuyuların içerisinde bulunan metanol uzaklaştırılmış ve kuruma işlemi için plak oda sıcaklığında 45 dk. bekletilmiştir. Boyama işlemi için her kuyuya 200 µL %1'lik kristal viyole solüsyonu eklenmiş ve 45 dk. bekletilmiştir. Boyama işleminin ardından, boya kuyulardan uzaklaştırılmış ve kuyularda boya kalıntısı kalmayacak şekilde distile su kullanılarak yıkama işlemi yapılmıştır. Boyalar ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra mikroplate oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kurutma işleminden sonra, kuyulara tutunmuş olan boyaları çözdürmek için kuyulara 200 µL %33'lük glasiyal asetik asit eklenmiş ve 15 dk. beklenmiştir. Bekleme süresi tamamlandıktan sonra plaklar mikropalak okuyucuda (Epoch, Biotek) 630 nm'de okutulmuştur. Altı paralel olacak şekilde hazırlanan örneklerin absorbans değerlerinin ortalamaları alınarak biyofilm yapma oranları hesaplanmıştır (Sayem vd., 2011).

Test edilen suşların biyofilm aktivitesi aşağıda verilen formüller baz alınarak belirlenmiştir. Buna göre;

- ✓ $OD \leq OD_c$ ise biyofilm aktivitesi yok,
- ✓ $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$ ise zayıf biyofilm aktivitesi,
- ✓ $2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$ ise orta düzey biyofilm aktivitesi,
- ✓ $4 \times OD_c < OD$ ise güçlü biyofilm aktivitesi şeklinde değerlendirilmiştir

OD_c: Kontrol grubu ortalama OD+3×kontrol grubu standart sapması: OD: Biyofilm üreten patojenin ortalama OD'si olarak hesaplanmıştır (Stepanović vd., 2007).

3.2.4.3. Probiyotik, Prebiyotik, Postbiyotik, Sinbiyotik ve Parabiyotiklerin Antibiyofilm Aktivitesinin Belirlenmesi

Probiyotik (*L. rhamnosus* ACS5), prebiyotik (ACS5-L-EPS), postbiyotik (*L. rhamnosus* ACS5'tan elde edilen metabolitler), parabiyotik (*L. rhamnosus* ACS5'un ısı ile inaktive edilmiş hücreleri) parabiyotik ile prebiyotik (sinbiyotik) ve postbiyotik ile prebiyotik (sinbiyotik) kombinasyonlarının antibiyofilm aktivitesi Sayem vd. (2011)'in metoduna göre belirlenmiştir. Ticari bir prebiyotik olan inülinin antibiyofilm aktivitesi de test edilmiştir. Probiyotik, prebiyotik, sinbiyotik, post ve parabiyotiklerin antibiyofilm aktivitesini belirlemek için fenotipik ve spektrofometrik en yüksek biyofilm üreticileri olarak tespit edilen *L. monocytogenes* ATCC 7644 ve *E. coli* ATCC 11229 (her bir patojen için ayrı deney seti oluşturulmuştur) kullanılmıştır.

Probiyotiklerin antibiyofilm aktivitesi;

L. rhamnosus ACS5'un bakteri süspansiyonlarını elde etmek için aktif kültürleri inkübasyondan sonra SF ile 2 kez yıkanarak OD'leri 600 nm'de $0,6 \pm 0,02$ 'ye (Thermo Scientific, genesys 10s UV-VIS) ayarlanmıştır. OD'leri ayarlanan ACS5 kültüründen 96 kuyucuklu mikropate 20 µL eklenmiş ve aynı kuyuların içerisine OD'leri 620 nm'de $0,5 \pm 0,02$ 'ye ayarlanan *L. monocytogenes* ATCC 7644 ve *E. coli* ATCC 11229 kültürlerinden 180 µL ilave edilmiştir. Kontrol gruplarında ise 20 µL SF ve 180 µL *L. monocytogenes* ATCC 7644 ve *E. coli* ATCC 11229 mikroorganizmalardan eklenmiş ve probiyotik olarak *L. rhamnosus* ACS5' in antibiyofilm aktivitesi test edilmiştir.

Prebiyotiklerin antibiyofilm aktivitesi;

L. rhamnosus ACS5'ten izole edilen ACS5-L-EPS'ler (prebiyotik) suda çözülerek otoklavda 121 °C' de 15dk. sterilize edilmiştir. Mikropate'in kuyulularına ACS5-L-EPS'nin 50 µg, 75 µg, 100 µg, 150 µg, 200 µg ve 250 µg miktarlarından 20 µL aktarılmıştır. Aynı kuyuların içerisine optik yoğunluğu 620 nm'de $0,5 \pm 0,02$ 'ye ayarlanan *L. monocytogenes* ATCC 7644 ve *E. coli* ATCC 11229 patojenlerinden eklenmiştir. Kontrol grubu olarak kullanılacak olan kuyulara ise 20 µL saf su ve 180 µL patojen mikroorganizmalar eklenerek prebiyotiklerin antibiyofilm aktivitesi araştırılmıştır.

Postbiyotik antibiyofilm aktivitesi;

L. rhamnosus ACS5'ten elde edilen ACS5-postbiyotiğinden mikroplatedeki kuyulara 20 µL eklenmiş ve üzerlerine 180 µL OD'leri ayarlanmış olan patojen mikroorganizmalar eklenerek postbiyotiklerin antibiyofilm aktivitesi belirlenmiştir. Bu çalışmada kontrol grubu olarak 20 µL boş MRS besiyeri ve 180 µL patojen mikroorganizmalar içeren kuyular kullanılmıştır.

Postbiyotik ve prebiyotik kombinasyonlarının antibiyofilm aktivitesi;

L. rhamnosus ACS5'ten izole edilen ACS5-L-EPS (prebiyotik) saf su içerisinde 50 µg, 75 µg, 100 µg, 150 µg, 200 µg ve 250 µg miktarları elde edilecek şekilde çözdürülmüştür. Mikroplatedeki kuyulara 10 µL hazırlanan konsantrasyonlardan ve 10 µL postbiyotik eklenerek üzerlerine 180 µL OD'leri ayarlanmış olan patojen mikroorganizmalar ilave edilerek postbiyotik ve prebiyotik kombinasyonlarının antibiyofilm aktivitesi belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak kullanılacak kuyulara 10 µL saf su, 10 µL boş MRS besiyeri ve 180 µL patojen mikroorganizmalar eklenmiştir.

Parabiyotiklerin ve sinbiyotiklerin antibiyofilm aktivitesi;

Parabiyotiklerin eldesi için, *L. rhamnosus* ACS5'in aktif kültürleri 3500 rpm'de 30 dk. santrifüj (Gyrozen, 1848R) edilmiştir. Santrifüjden sonra pellet 2 kez fosfat tamponu ile yıkanarak aynı tamponla 5 mL içerisinde resüspanse edilmiş ve 600 nm'de OD değeri ölçülmüştür. Hazırlanan bakteri süspansiyonu (9,93 log kob/mL) 80 °C'de 30 dk. su banyosunda inkübe edilerek bakterilerin inaktivasyonu yapılmıştır. Kontrol için inaktivasyondan sonra agar besiyerlerine ekim yapılarak 37°C'de 24 saat inkübe edilmiş ve canlı bakteri olmadığı gözlenerek parabiyotikler hazırlanmıştır (Amiri vd., 2021). Elde edilen parabiyotiklerden mikroplate'in kuyularına 20 µL eklenmiş ve aynı kuyuların içerisine OD'leri 620 nm'de $0,5 \pm 0,02$ 'ye ayarlanan patojen mikroorganizmalar eklenerek parabiyotiklerin antibiyofilm aktivitesi belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak kullanılacak kuyulara 20 µL fosfat tamponu ve 180 µL patojen mikroorganizmalar eklenmiştir. *L. rhamnosus* ACS5'ten izole edilen ACS5-L-EPS'ler (prebiyotik) 50 µg, 75 µg, 100 µg, 150 µg, 200 µg ve 250 µg miktarları elde edilecek şekilde saf su içerisinde çözdürülmüştür. Hazırlanan konsantrasyonlardan 96

kuyucuklu mikropate 10 µL eklenmiş ve aynı kuyu içerisinde 10 µL parabiyotik ile 180 µL OD'leri ayarlanmış olan patojen mikroorganizmalar eklenerek sinbiyotiklerin antibiyofilm aktivitesi belirlenmiştir. Bu çalışmada kontrol grubu olarak 10 µL fosfat tamponu, 10 µL saf su ve 180 µL patojen mikroorganizmalar eklenmiştir.

Antibiyofilm çalışmaları ticari bir prebiyotik olan inülin kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Antibiyofilm çalışmaları test edilen ACS5-L-EPS konsantrasyonları ile inülin konsantrasyonları eşit tutulmuştur. Mikropate yönteminde kontrol grubu olarak steril boş besiyeri ve patojen mikroorganizmalar kullanılmıştır. Antibiyofilm çalışması için hazırlanan mikropateler 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Antibiyofilm aktivite çalışmaları 4 paralelli ve 2 tekrarlı şekilde yapılmıştır. İnkübasyon sonrası probiyotik, prebiyotik, sinbiyotik, post ve parabiyoitiklerin antibiyofilm aktivitesini tespit etmek için biyofilm oluşumları Bölüm 3.2.3.2.' de anlatıldığı gibi tespit edilmiştir. Biyofilm inhibisyon yüzde oranları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır;

$$\% \text{ Biyofilm İnhibisyonu} = [(OD_{\text{Kontrol}} - OD_{\text{Örnek}}) / OD_{\text{Kontrol}}] \times 100 \quad (3.4)$$

OD_{Kontrol}: Deney grupları için oluşturulan kontrol gruplarının 630 nm'de okunan OD değeri; OD_{Örnek}: Deney gruplarının 630 nm'de okunan OD değeri olarak hesaplanmıştır (Sayem vd., 2011).

3.2.5. Probiyotik prebiyotik, sinbiyotiklerin, postbiyotik ve parabiyotiklerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi

Hazırlanan probiyotik, prebiyotik, sinbiyotik, postbiyotik ve parabiyotiklerin antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Test bakterileri *L. monocytogenes* ATCC 7644 TSB ve *E. coli* ATCC 11229 Nutrient sıvı besiyerlerinde aktifleştirilen ve 37°C geliştirilen 24 saat'lik aktif kültürler %0,875'lik serum fizyolojik çözeltisi ile 2 kez yıkanarak OD değerleri 620 nm'de 0,6±0,02 olarak ayarlanmıştır. OD'leri ayarlanmış bakteri süspansiyonundan steril plaklara 100 µL aktarılmıştır. Bu işlem sonrası daha önceden hazırlanıp, 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiş olan ve yaklaşık olarak 50°C'ye kadar soğutulmuş olan *L. monocytogenes* ATCC 7644 için Tryptic Soy Agar (TSA, Merck) ve *E. coli* ATCC 11229 için NA katı besiyerlerinden 20 mL ilave edilip, besiyeri ve test bakterilerinin homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır.

Homojenlik sağlandıktan sonra petri kabı içerisindeki besiyelerinin donması için 2 saat süre bekletilmiştir. Donan katı besiyeri üzerinde 9,50 mm çapındaki steril çubukla kuyular aılımtır. Bu kuyulara hazırlanan probiyotik, prebiyotik, sinbiyotik, postbiyotik ve parabiyoitikerden 100 µL ilave edilmiş ve 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılımtır. Inkübasyon sonunda kuyu çevresinde oluşan zonların çapı kumpas ile ölçülmüştür (Reinheimer vd., 1990).



3.2.6. İstatiksel değerlendirme

L-EPS ile postbiyotiklerin fermentasyon ve gelişimi düzenleyici çalışmaları 2 paralelli ve 3 tekerrürlü yapılmış ve ortalama değerler verilmiştir. Biyofilm ve antibiyofilm çalışmaları 4 paralelli ve 3 tekerrürlü olarak yapılmış ve bulunan değerlerin ortalama sonuçları verilmiştir. Diğer çalışmalarda 2 paralelli ve 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Elde edilen veriler, SPSS 18.0 istatiksel programda değerlendirilmiştir. ACS5-L-EPS' nin *L. rhamnosus* EDS4, *P. acidilactici* 5008 bakterileri ve *S. cerevisiae* BD21 maya suşu tarafından 24 saatlik fermentasyonu sonucu L-EPS-MRS, Glikozlu-MRS, Glikozsuz MRS ve inulin içeren besiortamlarındaki canlılıklarının ortalaması arasındaki farkın önemi One-way ANOVA ile belirlenmiştir.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Ekzopolisakkarit Üretiminin Belirlenmesi

4.1.1. Kültür ortamından elde edilen EPS'ler ile L-EPS'lerin EPS miktarlarının karşılaştırılması

Çalışmada kullanılan *L. rhamnosus* ACS5 suşunun kültür ortamında ürettiği EPS ve aynı koşullarda geliştirildikten sonra liyofilizasyon cihazında kısmi saflaştırma ile elde edilen L-EPS'lerin miktarları Bölüm 3.2.2.1'de anlatıldığı gibi fenol sülfirik asit metodu ile belirlenmiştir ve sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir. *L. rhamnosus* ACS5 suşundan elde edilen L-EPS miktarlarının, kültür ortamından elde edilen EPS miktarlarına göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

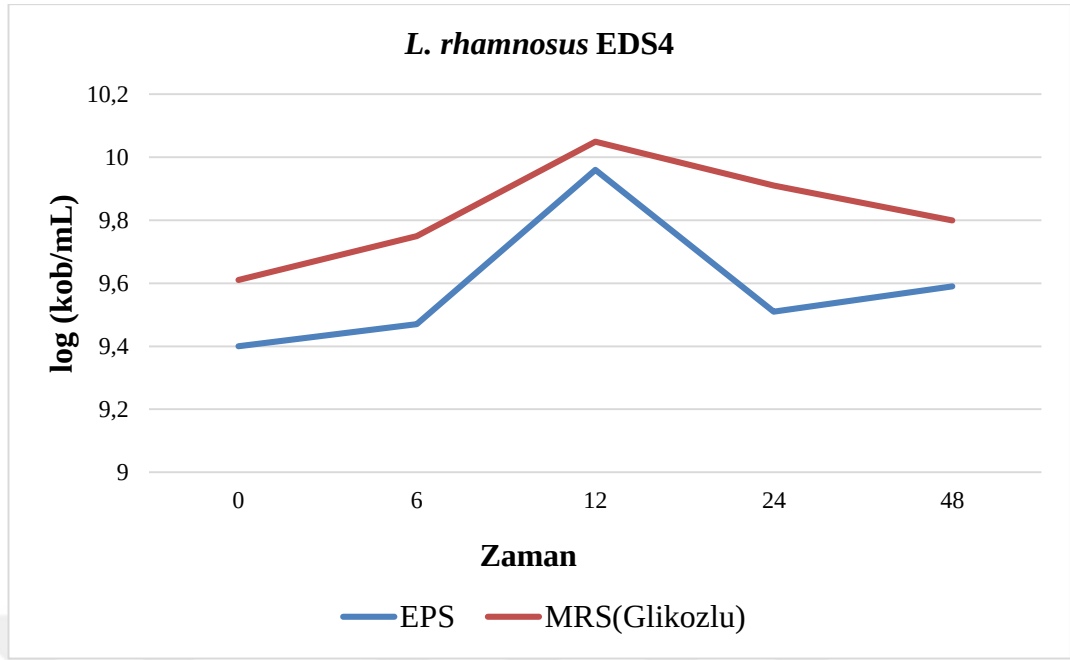
Çizelge 4.1. *L. rhamnosus* ACS5 suşunun kültür ortamından izole edilen ve liyofilize edilen EPS miktarları (mg/L).

Suş	EPS	L- EPS
<i>L. rhamnosus</i> ACS5	503,04±26,56	633,04±0,99

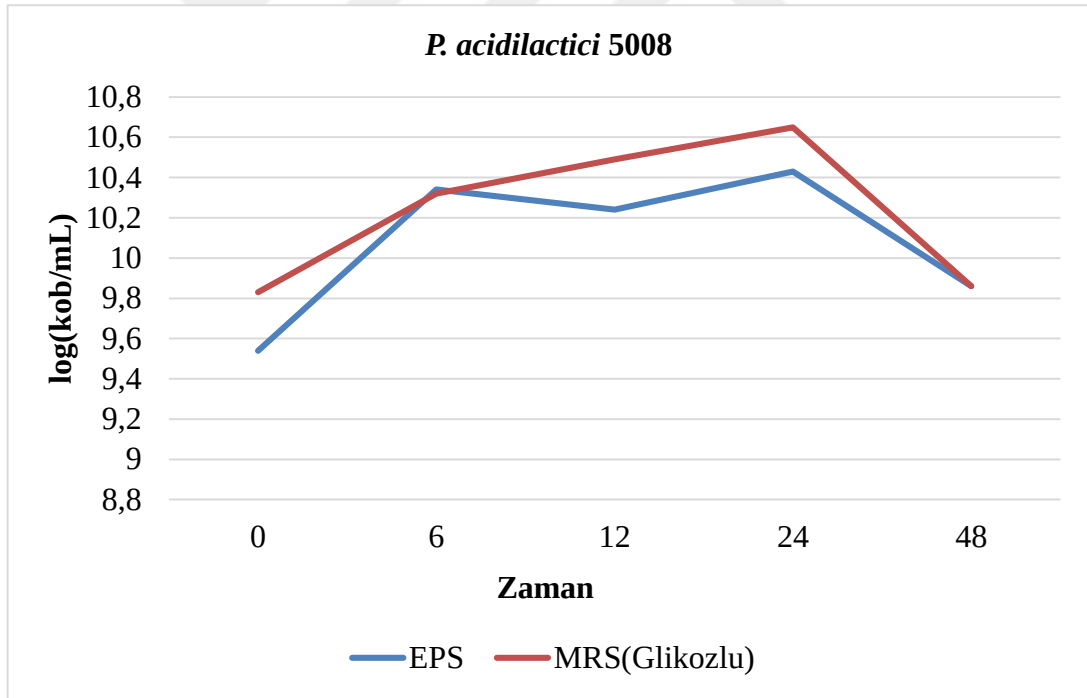
4.2. Liyofilize Ekzopolisakkaritin Prebiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi

4.2.1. ACS5 Liyofilize ekzopolisakkaritin potansiyel probiyotik mikroorganizmalar tarafından fermentasyonun ve gelişim eğrilerinin belirlenmesi

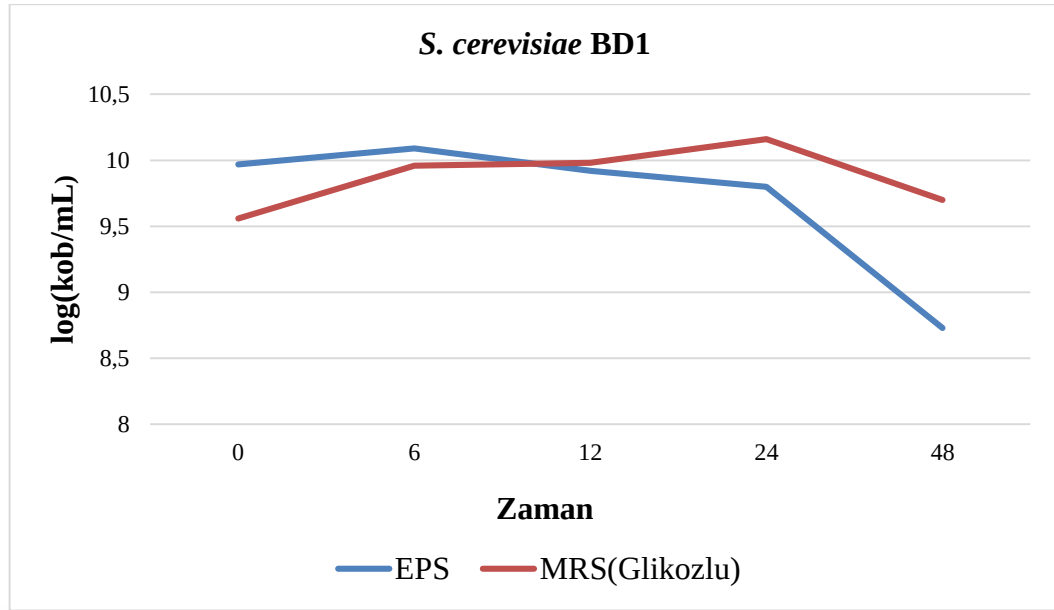
L. rhamnosus EDS4, *P. acidilactici* 5008 ve *S. cerevisiae* BD21 suşları, *L. rhamnosus* ACS5'ten elde edilen ACS5-L-EPS'nin prebiyotik aktivitesinin araştırılmasında test bakterileri olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada test suşları ACS5-L-EPS içeren besi ortamında geliştirilerek EPS'yi fermente etme özellikleri araştırılmış ayrıca gelişim eğrileri çıkarılarak uygun gelişme süreleri yapılacak çalışmalarda kullanmak için belirlenmiştir. *S. cerevisiae* BD21 10,16 log kob/mL (Şekil 4.3) ve *P. acidilactici* 5008 10,65 log kob/mL (Şekil 4.2) suşlarının en iyi gelişimleri 24. saat olarak gözlemlenirken, *L. rhamnosus* EDS4'ün en iyi gelişimi 18. saatte 10,05 log kob/mL (Şekil 4.1) olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.1. *L. rhamnosus* EDS4 suşunun %2 L-EPS-MRS ve %2 Glikoz-MRS besi ortamlarındaki gelişim eğrisi.



Şekil 4.2. *P. acidilactici* 5008 suşunun %2 L-EPS-MRS ve %2 Glikoz-MRS besi ortamlarındaki gelişim eğrisi.



Şekil 4.3. *S. cerevisiae* BD21 suşunun %2 L-EPS-YEPD ve %2 Glikoz-YEPD besi ortamlarındaki gelişim eğrisi.

Yapılan çalışmada potansiyel probiyotik suşların (*L. rhamnosus* EDS4, *P. acidilactici* 5008 ve *S. cerevisiae* BD21 L-EPS'yi fermente edebilme yetenekleri glikozu çıkarılarak yerine %2 oranında L-EPS ilave edilen besi ortamında geliştirilerek araştırılmıştır (Şekil 4.5). *L. rhamnosus* EDS4 suşunun EPS'yi 48 saat boyunca fermente edebildiği ve canlılığını sürdürdüğü belirlenmiştir. *L. rhamnosus* EDS4'ün glikozu ve L-EPS'yi (10,74 ve 10,45 log kob/mL) en yüksek 12. saatte fermente edebildiği belirlenmiştir. Şekil 4.4'de gösterildiği gibi inülin fermentasyonunda 12. saatten sonra düşüş olduğu tespit edilmiştir. Negatif kontrol olarak kullanılan glikozu tamamen çıkarılan MRS besiyeri ile kıyaslandığında L-EPS içeren MRS besiyerinde *L. rhamnosus* EDS4 suşunun çalışılan bütün saatler için (0, 6, 12, 24, 48) canlılık oranları daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan glikozlu-MRS besi ortamında 0-48 saatlik inkübasyon süresince en yüksek canlılık (9,61-10,05 log kob/mL) gözlemlenirken, *L. rhamnosus* ACS5 suşundan elde edilen ve prebiyotik özelliği test edilen L-EPS'de 0-48 saatlik inkübasyon süresince *L. rhamnosus* EDS4 suşunun canlılığın (9,40-9,96 log kob/mL), ticari prebiyotik inulinde gözlemlenen canlılıktan (7,98-9,95 log kob/mL) yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

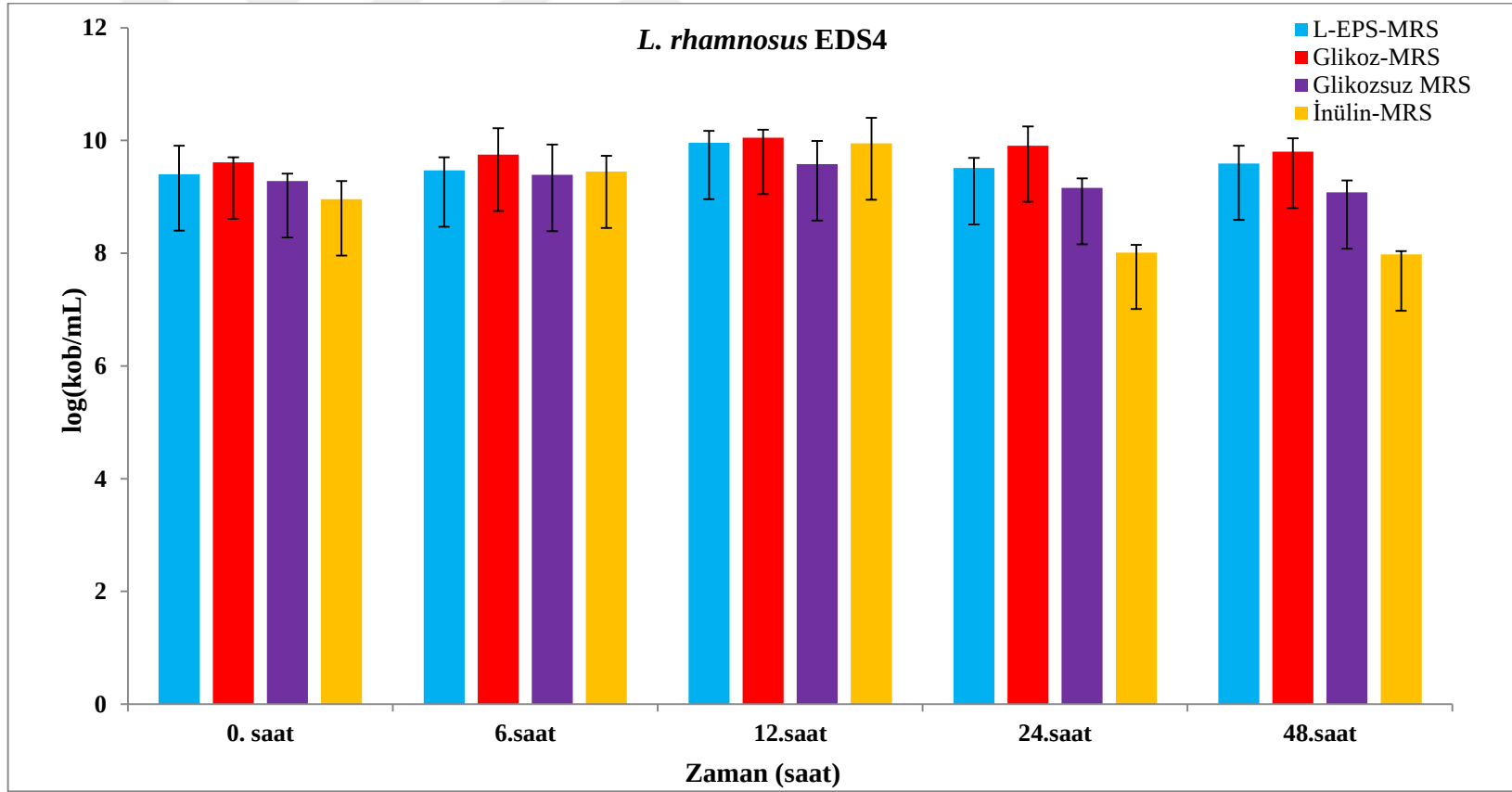
ACS5-L-EPS' nin *L. rhamnosus* EDS4 suşu tarafından 24 saatlik fermentasyonu sonucu L-EPS-MRS, glikozlu-MRS, glikozsuz MRS ve inulin içeren besi ortamlarındaki canlılıkları istatistiksel olarak analiz edildiğinde ortalama en yüksek

canlılık Glikozlu-MRS besi ortamında (9,91 log kob/mL) olarak belirlenmiştir. L-EPS içeren besi ortamındaki canlılığın (9,50 log kob/mL) ise inulin-MRS ortamındaki canlılıktan (8,01 log kob/mL) yüksek olduğu ve ortalamaları arasındaki farkın $P<0,05$ düzeyinde anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Glikozlu-MRS besi ortamındaki canlılık ile Glikozsuz-MRS ($P=0,046$) ve inulinli-MRS'deki canlılığının ortalaması arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$). Glikozsuz-MRS ile inulinli MRS besi ortamlarındaki canlılıklar arasındaki farkın anlamlı olduğu belirlenmiştir ($P=0,005<0,05$).

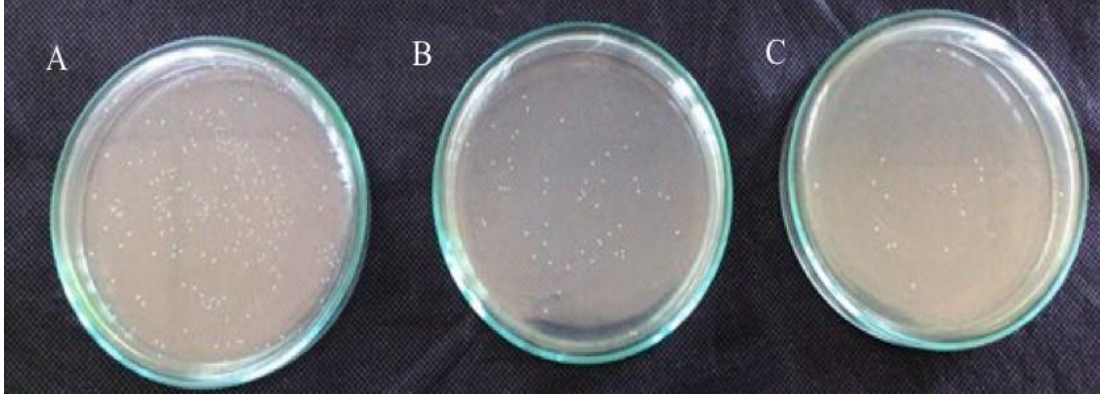


Çizelge 4.2. *L. rhamnosus* EDS4 suşunun %2 oranında L-EPS, glikoz, inülin içeren MRS ile glikozsuz MRS besi ortamlarındaki fermantasyon sonrası canlılıkları.

<i>L.rhamnosus</i> EDS4	L-EPS-MRS		Glikoz-MRS		Glikozsuz MRS		İnülin-MRS	
	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD
0. saat	9,40±0,51	0,60±0,02	9,61±0,09	0,59±0,04	9,28±0,13	0,60±0,08	8,96±0,32	0,60±0,07
6. saat	9,47±0,23	1,20±0,05	9,75±0,47	1,55±0,13	9,39±0,54	1,04±0,11	9,45±0,28	0,84±0,16
12. saat	9,96±0,21	1,18±0,12	10,05±0,14	1,77±0,18	9,58±0,41	1,02±0,17	9,95±0,45	0,83±0,21
24. saat	9,51±0,18	0,92±0,07	9,91±0,34	1,86±0,07	9,16±0,17	0,88±0,04	8,01±0,14	0,70±0,05
48. saat	9,59±0,32	0,32±0,04	9,80±0,24	1,94±0,14	9,08±0,21	0,20±0,04	7,98±0,06	0,27±0,07



Şekil 4.4. *L. rhamnosus* EDS4 suşunun %2 oranında L-EPS, glikoz, inülin içeren MRS ile glikozsuz MRS besi ortamlarındaki fermantasyon sonrası canlılıklarının karşılaştırılması.



Şekil 4.5. *L. rhamnosus* EDS4 suşunun %2 L-EPS-MRS besi ortamında fermentasyon sonrası 10^{-5} (A), 10^{-6} (B) ve 10^{-7} (C) dilisyonlarındaki kolonilerinin görüntüsü.

P. acidilactici 5008 suşunun L-EPS, glikoz ve inülini fermentasyonu araştırılmış ve sonuçlar Çizelge 4.3 ile Şekil 4.6’da verilmiştir. *P. acidilactici* 5008 suşunun negatif kontrol olarak kullanılan glikozsuz MRS besi ortamında 0-48 saatlik inkübasyon süresince gelişiminin düşük olduğu gözlemlenmiştir. *P. acidilactici* 5008 suşunun ACS5-L-EPS içeren besi ortamındaki canlılıklarının 6., 12. ve 24 saatlik inkübasyon sürelerinde pozitif kontrol olarak kullanılan glikozlu-MRS ile ticari prebiyotik içeren MRS besi ortamlarındaki canlılık değerlerinin çok yakın olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.6). *P. acidilactici* 5008 suşunun ACS5-L-EPS içeren besi ortamındaki fermentasyonun ve buna bağlı olarak canlılığının 0-24 saatlik inkübasyon süresince artış (9,54-10,43 log kob/mL) gösterdiği, 48. saatte ise canlılık 0,57 log kob/mL’lik bir düşüş belirlenmiştir (Şekil 4.7). *P. acidilactici* 5008 suşu ticari prebiyotik inülin içeren MRS besi ortamında 6., 12. ve 48. inkübasyon sürelerinde yüksek gelişim gösterirken (sırasıyla; 10,21-10,70 ve 10,29 log kob/mL), pozitif kontrol glikozlu-MRS ile L-EPS-MRS besi ortamlarında en yüksek canlılıklarını 24 saatlik inkübasyon süresinde göstermiştir (Çizelge 4.3). *P. acidilactici* 5008 suşunun test edilen besi ortamlarında 24. saatten sonra canlılık oranlarında düşüş tespit edilmiştir. Glikoz içeren MRS besi ortamı ile kıyaslandığında L-EPS-MRS besi ortamında *P. acidilactici* 5008 suşunun benzer canlılık oranları gösterdiği ve L-EPS’yi glikoz gibi fermente edebildiği belirlenmiştir.

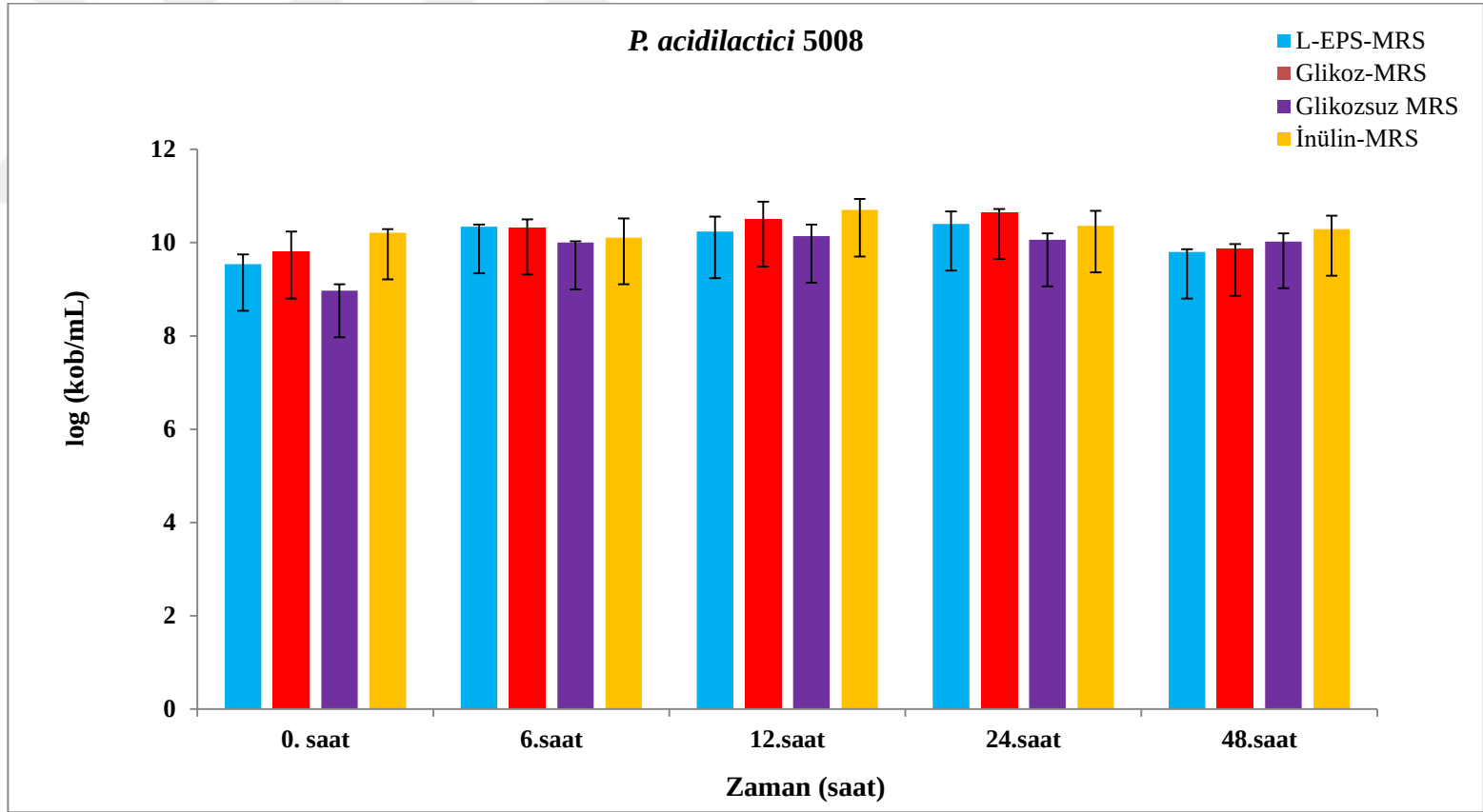
L-EPS’ nin *P. acidilactici* 5008 suşu tarafından 24 saatlik fermentasyonu sonucu L-EPS-MRS, Glikozlu-MRS, Glikozsuz MRS ve inulin içeren besi ortamlarındaki canlılıkları istatistiksel olarak analiz edildiğinde ortalama en yüksek canlılık Glikozlu-MRS besi ortamında (10,65 log kob/mL) olarak belirlenmiştir. ACS5-L-EPS içeren

besiortamındaki canlılığın (10,43 log kob/mL) ise inulin-MRS ortamındaki canlılıktan (10,36 log kob/mL) yüksek olduğu ancak ortalamaları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($P>0,05$). L-EPS-MRS besiortamındaki canlılık ile Glikozsuz-MRS'deki canlılığının ortalaması arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$). Glikozlu-MRS ile Glikozsuz-MRS besiortamlarındaki canlılıklar arasındaki farkın anlamlı olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$).

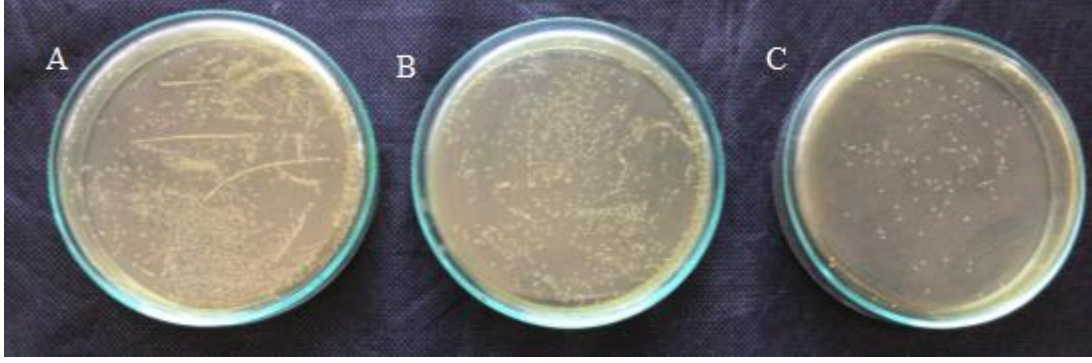


Çizelge 4.3. *P. acidilactici* 5008 suşunun %2 oranında L-EPS, glikoz, inülin içeren MRS ile glikozsuz MRS besi ortamlarındaki fermantasyon sonrası canlılıkları.

<i>P. acidilactici</i> 5008	L-EPS-MRS		Glikoz-MRS		Glikozsuz MRS		İnülin-MRS	
	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD
0. saat	9,54±0,21	0,60±0,02	9,83±0,44	0,59±0,04	8,97±0,14	0,60±0,07	10,21±0,08	0,60±0,17
6. saat	10,34±0,05	1,16±0,08	10,32±0,18	1,61±0,06	10,01±0,03	1,16±0,05	10,11±0,41	1,17±0,11
12. saat	10,24±0,32	1,19±0,12	10,49±0,39	1,80±0,13	10,14±0,25	1,20±0,14	10,70±0,24	1,16±0,08
24. saat	10,43±0,27	1,12±0,09	10,65±0,07	1,80±0,07	10,06±0,14	1,15±0,21	10,36±0,32	1,11±0,04
48. saat	9,86±0,06	1,09±0,05	9,86±0,11	1,88±0,02	10,02±0,18	1,12±0,18	10,29±0,29	1,08±0,17



Şekil 4.6. *P. acidilactici* 5008 suşunun %2 oranında L-EPS, glukoz, inülin içeren MRS ile glukozsuz MRS besi ortamlarındaki fermantasyon sonrası canlılıklarının karşılaştırılması.



Şekil 4.7. *P. acidilactici* 5008 suşunun %2 L-EPS-MRS besi ortamında fermentasyon sonrası 10^{-5} (A), 10^{-6} (B) ve 10^{-7} (C) dilisyonlarındaki kolonilerinin görüntüsü.

S. cerevisiae BD21 maya suşunun L-EPS, glikoz ve inülini fermentasyonu araştırılmış ve sonuçlar Çizelge 4.4 ile Şekil 4.8’de verilmiştir. *S. cerevisiae* BD21 maya suşunun negatif kontrol olarak kullanılan glikozsuz YEPD besi ortamında 0-48 saatlik inkübasyon süresince fermentasyona bağlı gelişimin ACS5-L-EPS ve glikoz içeren besi ortamlarından düşük olduğu ancak ticari prebiyotik inulin ile karşılaştırıldığında 12. ve 24. saatlerde canlılığın glikozsuz besi ortamında daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. *S. cerevisiae* BD21 maya suşunun %2 oranında L-EPS eklenen YEPD besi ortamındaki fermentasyona bağlı canlılığının 0-48 saatlik inkübasyon süresinde 12, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda ticari prebiyotik inulinden yüksek olduğu tespit edilmiştir. *S. cerevisiae* BD21 maya suşunun L-EPS içeren besi ortamında 12 saatlik inkübasyon süresi sonunda, pozitif kontrol olarak kullanılan Glikozlu-YEPD besi ortamı ile yaklaşık eşit üreme gösterirken, 24 ve 48 saatlik inkübasyondan sonra fermentasyona bağlı canlılığın Glikozlu-YEPD besi ortamında daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmada ACS5-L-EPS’nin *S. cerevisiae* BD21 tarafından 48 saat boyunca fermente edildiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.9). *S. cerevisiae* BD21 suşunun en yüksek canlılık oranları sırasıyla L-EPS, glikoz ve inülin içeren besi ortamlarında $10,09 \pm 0,25$, $10,16 \pm 0,09$ ve $10,21 \pm 0,05$ log kob/mL olarak tespit edilmiştir. Ticari bir prebiyotik olan inülin ile kıyaslandığında L-EPS içeren besi ortamında *S. cerevisiae* BD21 suşunun fermentasyona bağlı canlılık oranının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

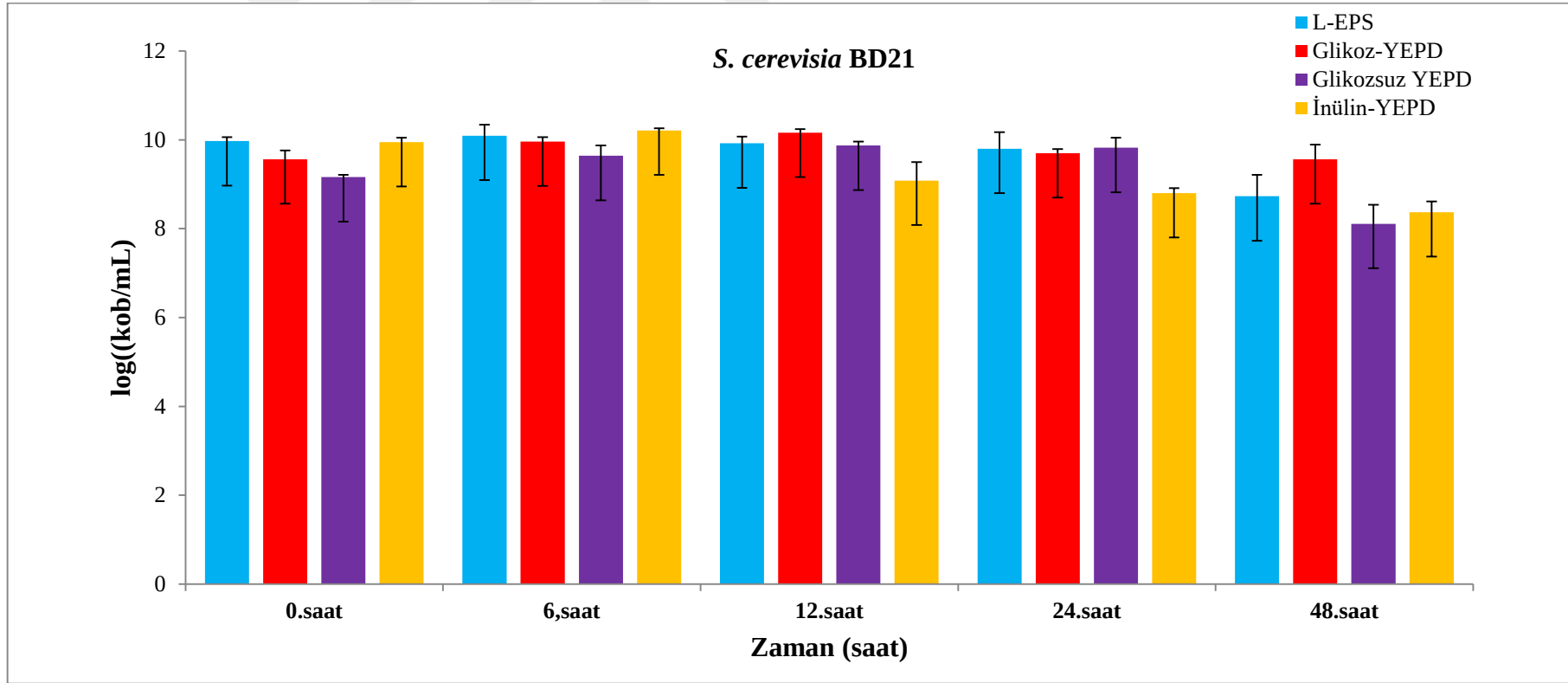
ACS5-L-EPS’ nin *S. cerevisiae* BD21 maya suşu tarafından 24 saatlik fermentasyonu sonucu L-EPS-YEPD, Glikozlu-YEPD, Glikozsuz YEPD ve inulin içeren besi ortamlarındaki canlılıkları istatistiksel olarak analiz edildiğinde ortalama en

yüksek canlılık Glikozlu-YEPD besiortamında (10,16 log kob/mL) olarak belirlenmiştir. L-EPS içeren besiortamındaki canlılığın (9,90 log kob/mL) ise inulin-YEPD ortamındaki canlılıktan (8,80 log kob/mL) yüksek olduğu ve ortalamaları arasındaki farkın $P<0,05$ düzeyinde anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Glikozlu-YEPD besiortamındaki canlılık ile İnulinli-YEPD'deki canlıklarının ortalaması arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$). Glikozsuz-YEPD ile İnulinli YEPD besiortamlarındaki canlılıklar arasındaki farkın anlamlı olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$).

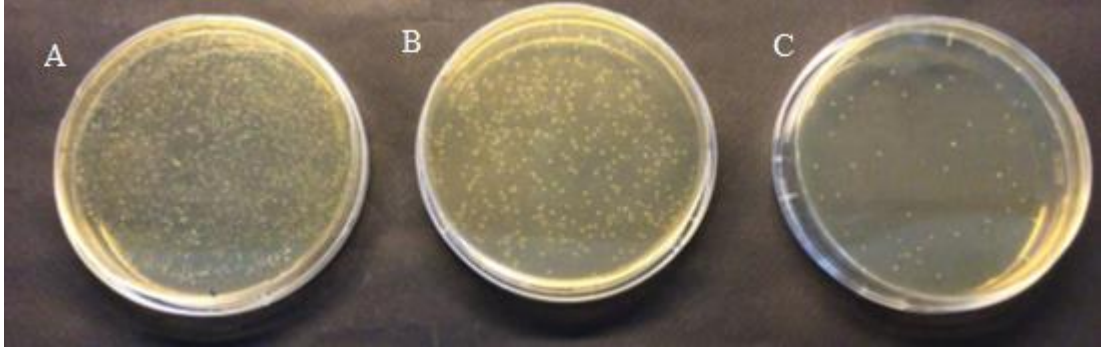
Yapılan çalışmalar sonucunda ACS5-L-EPS'nin denenen bütün potansiyel probiyotik mikroorganizmalar tarafından fermente edilebildiği tespit edilmiştir. ACS5-L-EPS varlığında en iyi gelişim *P. acidilactici* 5008 suşunda gözlemlenmiştir. ACS5-L-EPS'nin bakterilere olan etkisinin mayalara göre daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. *S. cerevisiae* BD21 suşunun %2 oranında L-EPS, glikoz, inülin içeren YEPD ile glikozsuz YEPD besi ortamlarındaki fermantasyon sonrası canlılıkları.

<i>S. cerevisiae</i> BD21	L-EPS-YEPD		Glikoz-YEPD		Glikozsuz YEPD		İnülin-YEPD	
	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD
0. saat	9,97±0,09	0,60±0,03	9,56±0,23	0,60±0,02	9,16±0,05	0,61±0,06	9,95±0,18	0,59±0,05
6. saat	10,09±0,25	0,87±0,14	9,96±0,10	1,19±0,21	9,64±0,23	0,89±0,04	10,21±0,05	0,64±0,07
12. saat	9,92±0,15	0,81±0,08	9,98±0,08	1,36±0,18	9,87±0,09	0,87±0,02	9,08±0,42	0,69±0,03
24. saat	9,8±0,37	0,73±0,04	10,16±0,09	1,62±0,13	9,82±0,23	0,79±0,11	8,80±0,11	0,70±0,08
48. saat	8,73±0,48	0,69±0,02	9,70±0,33	1,87±0,16	8,11±0,43	0,64±0,08	8,37±0,24	0,68±0,12



Şekil 4.8. *S. cerevisiae* BD21 suşunun %2 oranında L-EPS, glikoz, inülin içeren YEPD ile glikozsuz YEPD besi ortamlarındaki fermantasyon sonrası canlılıklarının karşılaştırılması.



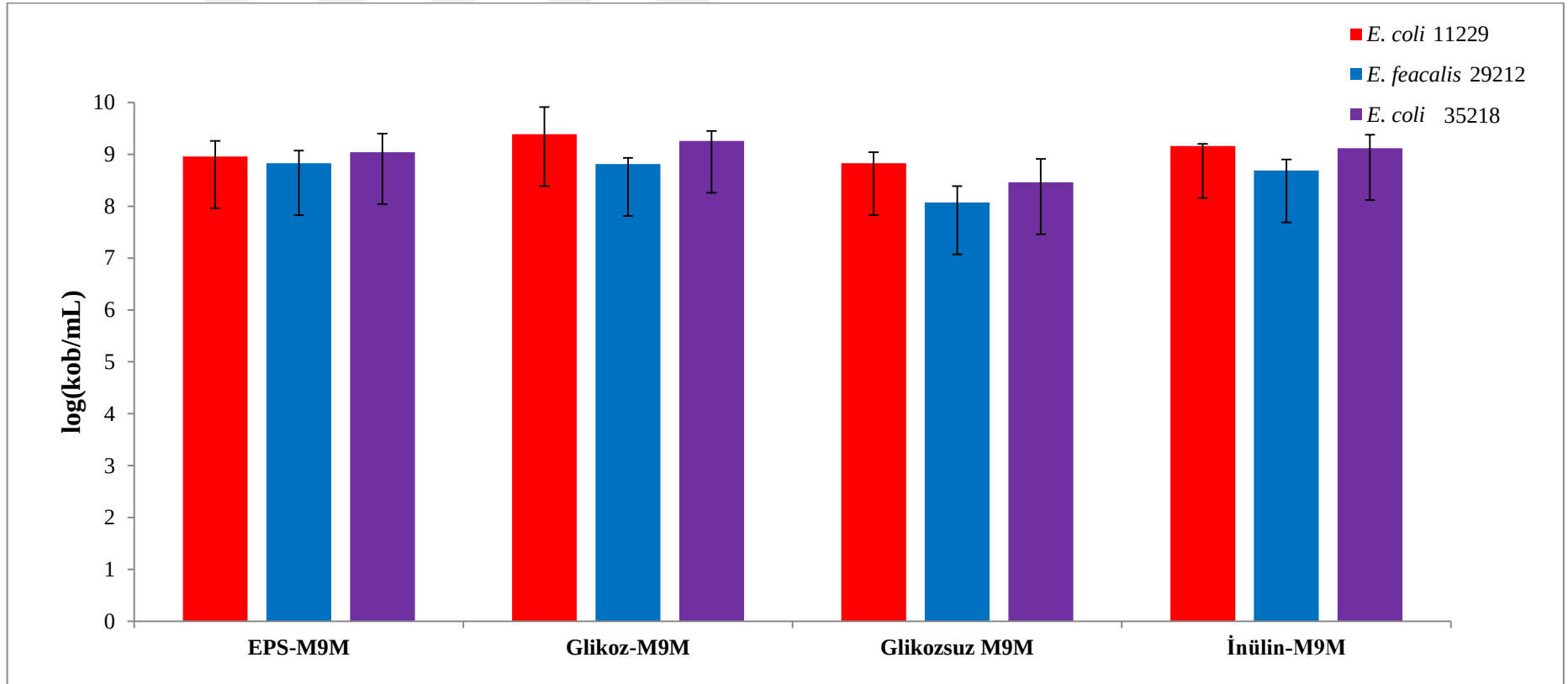
Şekil 4.9. *S. cerevisiae* BD21 suşunun %2 L-EPS-YEPD besi ortamında fermentasyon sonrası 10^{-5} (A), 10^{-6} (B) ve 10^{-7} (C) dilisyonlarındaki kolonilerinin görüntüsü.

4.2.2. Liyofilize ekzopolisakkaritin bağırsak patojen mikroorganizmaları tarafından fermentasyonun belirlenmesi

Prebiyotiklerin bağırsak mikroflorasında yararlı mikroorganizmaların gelişimleri desteklerken patojen mikroorganizmalar tarafından kullanılamamaları gerekmektedir. Bu doğrultuda L-EPS'nin bağırsak patojeni mikroorganizmalar tarafından (*E. coli* ATCC 11229, *E. coli* ATCC 25218 ve *E. faecalis* ATCC 29212) fermente edilme yeteneği araştırılmış ve sonuçlar Çizelge 4.5 ile Şekil 4.10'da verilmiştir. *E. coli* ATCC 11229 suşu glikoz ve inülin içeren besiortamlarında en yüksek canlılık oranını gösterirken, fermentasyon ve buna bağlı canlılığının ACS5-L-EPS ve glikozsuz besiortamlarında daha düşük olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.5). *E. faecalis* ATCC 29212 suşunun ACS5-L-EPS içeren besi ortamında fermentasyona bağlı canlılık oranı en düşük glikoz içeren M9 Minimal (M9M) besi ortamında (8,81 log kob/mL) tespit edilirken, *E. coli* ATCC 35218 suşu en düşük gelişimini ACS5-L-EPS içeren M9 minimal besi ortamında (9,04 log kob/mL) göstermiştir. ACS5-L-EPS varlığında en düşük canlılık oranı *E. faecalis* ATCC 29212 suşunda gözlemlenmiştir. Test edilen bağırsak patojenlerinin en iyi glikoz içeren besi ortamında gelişim gösterdikleri ve ticari prebiyotik olan inulini ACS5-L-EPS'den daha iyi fermente edebildikleri gözlemlenmiştir. Bir karbonhidrat polimerinin prebiyotik olarak kullanılabilmesi için bağırsak patojenleri tarafından fermente edilmemesi gerekmektedir. Yapılan çalışma ile ACS5-L-EPS'nin bağırsak patojen mikroorganizmaları tarafından fermente edilmediği belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. L-EPS'nin bağırsak patojenleri tarafından fermentasyonu.

Besiyerleri	L-EPS-M9M		Glikoz- M9M		Glikozsuz M9M		İnülin-M9M	
Suşlar	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD
<i>E. coli</i> 11229	8,96±0,3	0,76±0,05	9,39±0,52	1,01±0,17	8,83±0,21	0,50±0,02	9,16±0,04	0,83±0,06
<i>E. feacalis</i> 29212	8,83±0,24	0,70±0,08	8,81±0,12	1,26±0,06	8,07±0,32	0,92±0,09	8,69±0,21	0,96±0,05
<i>E. coli</i> 35218	9,04±0,36	0,72±0,15	9,26±0,19	0,70±0,07	8,46±0,45	0,75±0,04	9,12±0,26	0,73±0,11



Şekil 4.10. ACS5-L-EPS'nin bağırsak patojenleri tarafından fermantasyon grafiği.

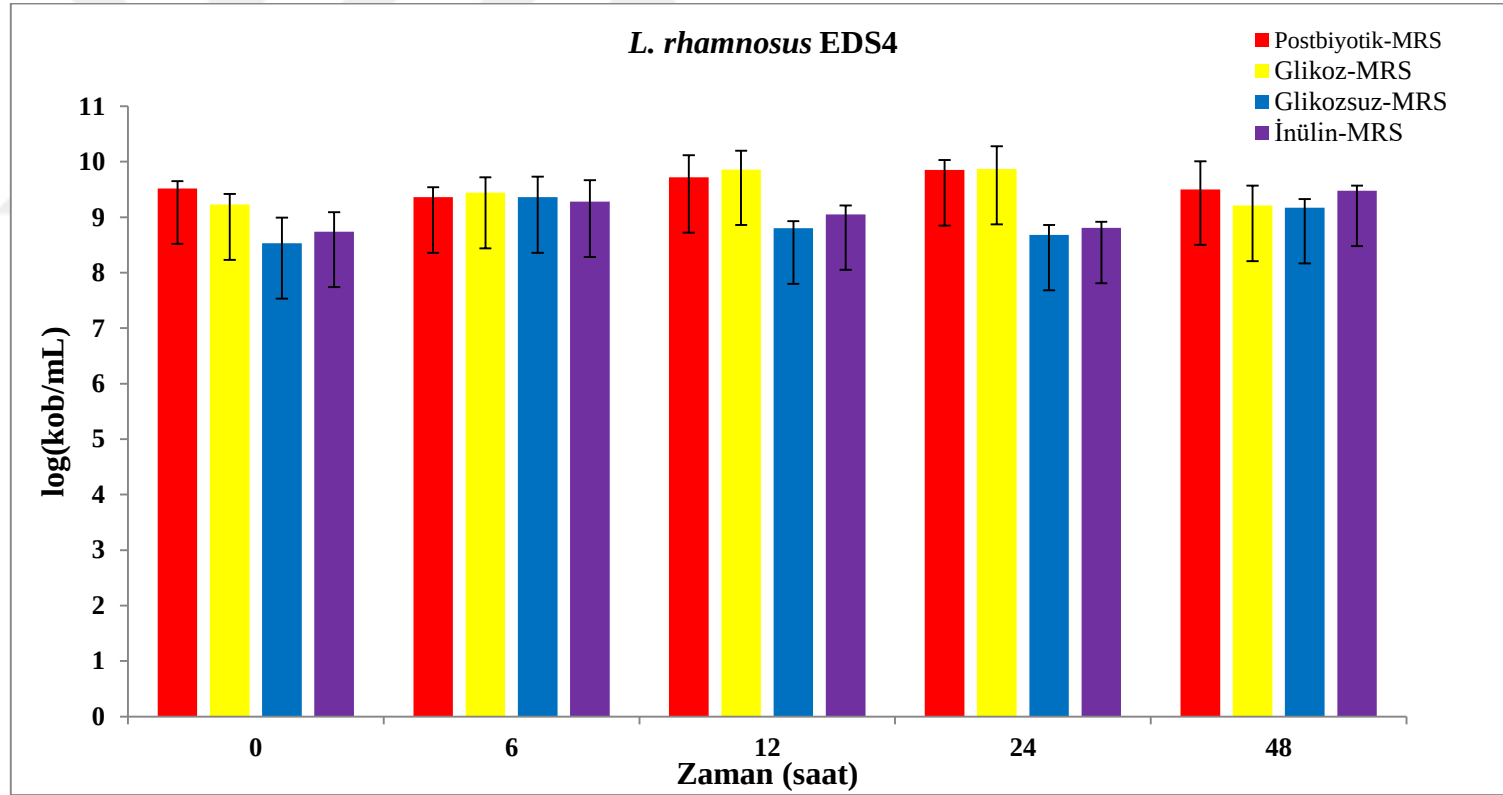
4.3. Postbiyotiklerin Fermantasyonu

L. rhamnosus AC5'ten elde edilen ACS5-postbiyotiğinin *L. rhamnosus* EDS4, *P. acidilactici* 5008 ve *S. cerevisiae* BD21 suşları tarafından fermantasyonu ve buna bağlı canlılığı Bölüm 3.3'te verilen yöntemle göre belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.6 ve Şekil 4.11'de verilmiştir. Yapılan bu çalışmayla postbiyotiklerin potansiyel probiyotik mikroorganizmalar tarafından fermente edilebilirliğinin belirlenmesi ve prebiyotik ACS5-L-EPS ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

L. rhamnosus EDS4'ün %2 oranında postbiyotik içeren MRS besi ortamında, pozitif kontrol olarak kullanılan glikozlu-MRS besi ortamında fermantasyon sonrası canlılık değerlerinin çok yakın olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.11). Negatif kontrol olarak kullanılan Glikozsuz-MRS besi ortamındaki canlılığın ACS5-postprobiyotiği ile inulin prebiyotiği içeren MRS besi ortamlarından daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. *L. rhamnosus* EDS4 suşu %2 oranında postbiyotik içeren MRS besi ortamında 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda test edilen besi ortamlarından daha fazla fermantasyon ve buna bağlı olarak yüksek gelişim (9,50 log kob/mL) göstermiştir. *L. rhamnosus* EDS4 suşunun ACS5-postbiyotiği içeren besi ortamında 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda en yüksek gelişimi (9,85 log kob/mL) gösterirken diğer test edilen besi ortamlarında canlılığın azaldığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.6. *L. rhamnosus* EDS4 suşunun %2 oranında postbiyotik, glikoz, inülin içeren MRS ile glikozsuz MRS besi ortamlarındaki fermentasyon sonrası canlılıklarının karşılaştırılması.

<i>L. rhamnosus</i> EDS4	Postbiyotik-MRS		Glikoz-MRS		Glikozsuz MRS		İnülin-MRS	
	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD
0. saat	9,52±0,13	0,60±0,05	9,23±0,19	0,59±0,08	8,53±0,46	0,60±0,03	8,74±0,35	0,60±0,07
6. saat	9,36±0,18	1,18±0,11	9,44±0,28	1,55±0,09	9,36±0,37	1,04±0,16	9,28±0,39	0,84±0,14
12. saat	9,72±0,40	1,14±0,18	9,86±0,34	1,77±0,21	8,80±0,13	1,02±0,12	9,05±0,16	0,83±0,16
24. saat	9,85±0,18	1,02±0,08	9,87±0,41	1,86±0,29	8,68±0,18	0,88±0,07	8,81±0,11	0,7±0,04
48. saat	9,50±0,51	0,42±0,03	9,21±0,36	1,94±0,15	9,17±0,16	0,20±0,03	9,48±0,09	0,27±0,02

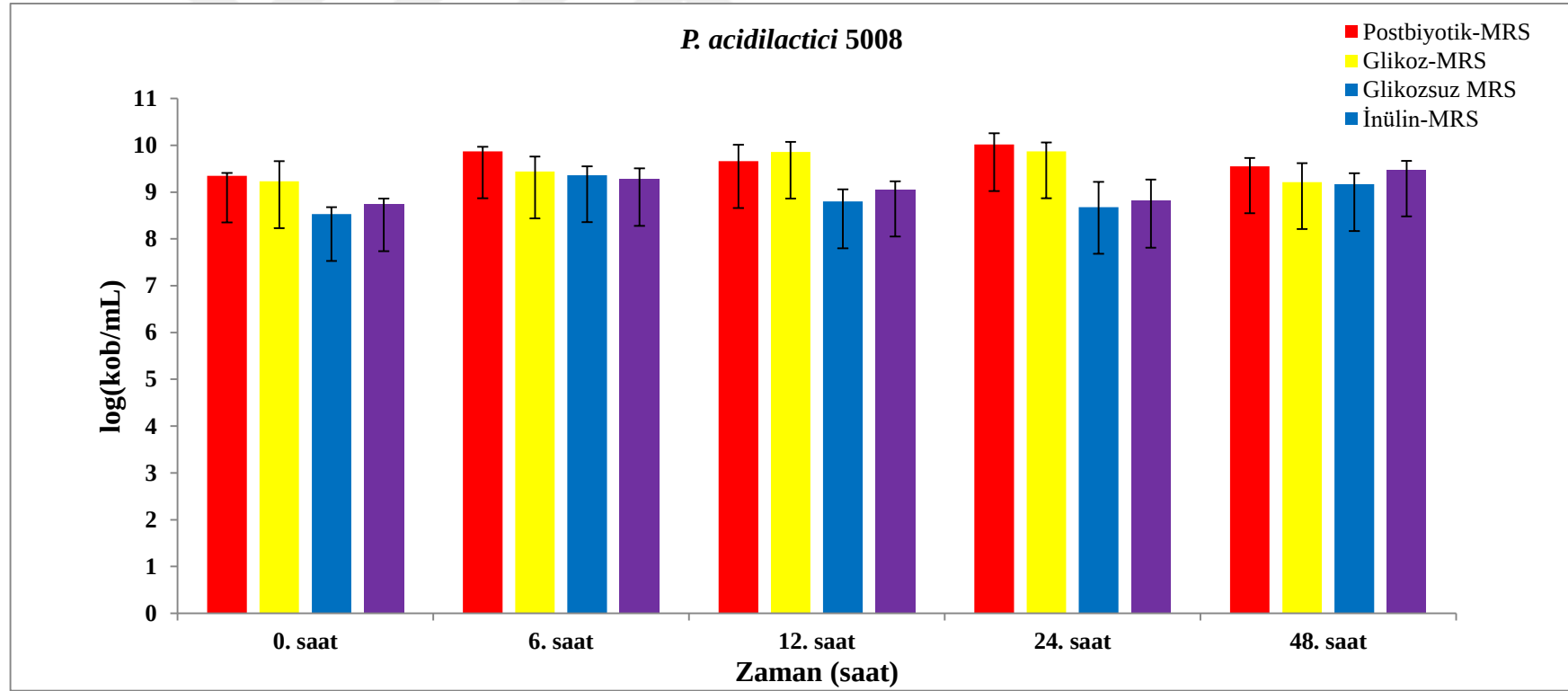


Şekil 4.11. *L. rhamnosus* EDS4 suşunun %2 oranında postbiyotik, glikoz, inülin içeren MRS ile glikozsuz MRS besi ortamlarındaki fermantasyon sonrası canlılıklarının karşılaştırılması.

P. acidilactici 5008 suşunun %2 oranında postbiyotik içeren MRS besi ortamında 0-48 saatlik inkübasyon süresi sonrası fermentasyona bağlı canlılık oranlarının, pozitif kontrol olarak kullanılan glikozlu-MRS besi ortamı (9,21-9,87 log kob/mL) ve ticari prebiyotik içeren MRS besi ortamlarındaki (8,74-9,48 log kob/mL) canlılıktan daha yüksek olduğu (9,35-10,02 log kob/mL) tespit edilmiştir (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.12). *P. acidilactici* 5008 suşunun ACS5-postbiyotigi içeren besi ortamında 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda en yüksek gelişimi (10,02 log kob/mL) gösterdiği gözlemlenmiş iken diğer test edilen besi ortamlarında canlılığın azaldığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7. *P. acidilactici* 5008 suşunun %2 oranında postbiyotik, glikoz, inülin içeren MRS ile glikozsuz MRS besi ortamlarındaki fermentasyon sonrası canlılıklarının karşılaştırılması.

<i>P. acidilactici</i> 5008	Postbiyotik- MRS		Glikoz-MRS		Glikozsuz MRS		İnülin-MRS	
	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD
0. saat	9,35±0,06	0,60±0,03	9,23±0,43	0,59±0,05	8,53±0,15	0,60±0,19	8,74±0,12	0,60±0,13
6. saat	9,87±0,10	1,13±0,12	9,44±0,32	1,61±0,18	9,36±0,19	1,16±0,25	9,28±0,23	1,17±0,26
12. saat	9,66±0,35	1,31±0,08	9,86±0,21	1,8±0,17	8,80±0,26	1,20±0,18	9,05±0,18	1,16±0,32
24. saat	10,02±0,24	1,2±0,15	9,87±0,19	1,80±0,19	8,68±0,54	1,15±0,16	8,81±0,46	1,11±0,14
48. saat	9,55±0,18	1,14±0,21	9,21±0,41	1,88±0,13	9,17±0,23	1,12±0,26	9,48±0,19	1,08±0,41



Şekil 4.12. *P. acidilactici* 5008 suşunun %2 oranında postbiyotik, glikoz, inülin içeren MRS ile glikozsuz MRS besi ortamlarındaki fermantasyon sonrası canlılıklarının karşılaştırılması.

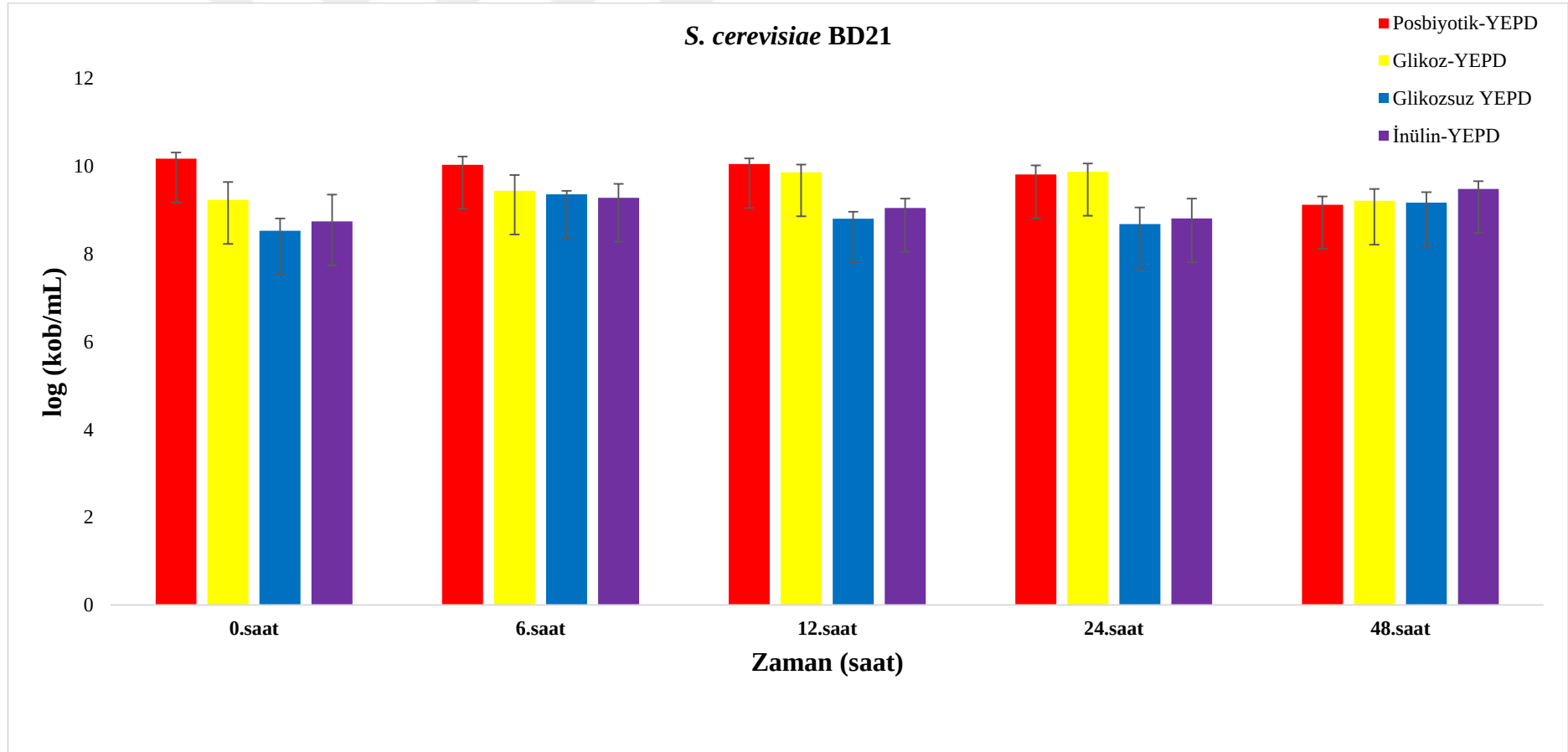
ACS5-postbiyotiğinin mayalar tarafından fermente edilebilme yeteneğinin belirlenmesi için *S. cerevisiae* BD21 mayası kullanılmış ve sonuçlar Çizelge 4.8 ile Şekil 4.13'te verilmiştir. *S. cerevisiae* BD21 maya suşu %2 oranında postbiyotik içeren YEPD besi ortamında en yüksek gelişimi (10,05 log kob/mL) 12 saatlik inkübasyon süresinde göstermiştir. *S. cerevisiae* BD21 suşunun ACS5-postbiyotiği içeren YEPD besi ortamındaki 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonrası gelişiminin pozitif kontrol olarak kullanılan MRS besi ortamındaki gelişim oranına çok yakın olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.13). *S. cerevisiae* BD21 suşunun ACS5-postbiyotiği içeren YEPD besi ortamındaki 0-48 saatlik inkübasyon süresi sonrası gelişiminin (9,12- 10,05 log kob/mL), negatif kontrol olarak kullanılan glikozsuz-YEPD (8,53-9,36 log kob/mL) ile prebiyotik inulin içeren YEPD (8,74- 9,48 log kob/mL) besi ortamlarındaki gelişimlerinden yüksek olduğu belirlenmiştir.

L. rhamnosus ACS5 suşundan elde edilen ACS5-L-EPS ve ACS5-postbiyotiğinin *L. rhamnosus* EDS4, *P. acidilactici* 5008 ve *S. cerevisiae* BD21 suşları tarafından fermentasyonu ve buna bağlı canlılık oranları araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda ACS5-L-EPS'lerin *L. rhamnosus* EDS4 ve *P. acidilactici* 5008 suşları tarafından daha fazla fermente edildiği ve buna bağlı olarak gelişimlerinin pozitif yönde etkilendiği, ACS5-postbiyotiğinin ise *S. cerevisiae* BD21 suşu tarafından daha fazla fermente edildiği tespit edilmiştir.

.

Çizelge 4.8. *S. cerevisiae* BD21 suşunun %2 oranında postbiyotik, glikoz, inülin içeren YEPD ile glikozsuz YEPD besi ortamlarındaki fermantasyon sonrası canlılıklarının karşılaştırılması.

S. <i>cerevisiae</i> BD21	Postbiyotik- YEPD		Glikoz-YEPD		Glikozsuz YEPD		İnülin-YEPD	
	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD	log kob/mL	OD
0. saat	10,17±0,14	0,60±0,03	9,23±0,41	0,60±0,05	8,53±0,28	0,61±0,08	8,74±0,61	0,59±0,02
6. saat	10,03±0,19	0,94±0,12	9,44±0,36	1,19±0,19	9,36±0,08	0,89±0,0,13	9,28±0,32	0,64±0,07
12. saat	10,05±0,13	0,91±0,15	9,86±0,18	1,36±0,30	8,80±0,16	0,87±0,34	9,05±0,21	0,69±0,12
24. saat	9,81±0,21	0,83±0,18	9,87±0,19	1,62±0,16	8,68±0,38	0,79±0,21	8,81±0,45	0,70±0,09
48. saat	9,12±0,19	0,72±0,07	9,21±0,27	1,87±0,11	9,17±0,24	0,64±0,18	9,48±0,18	0,68±0,18



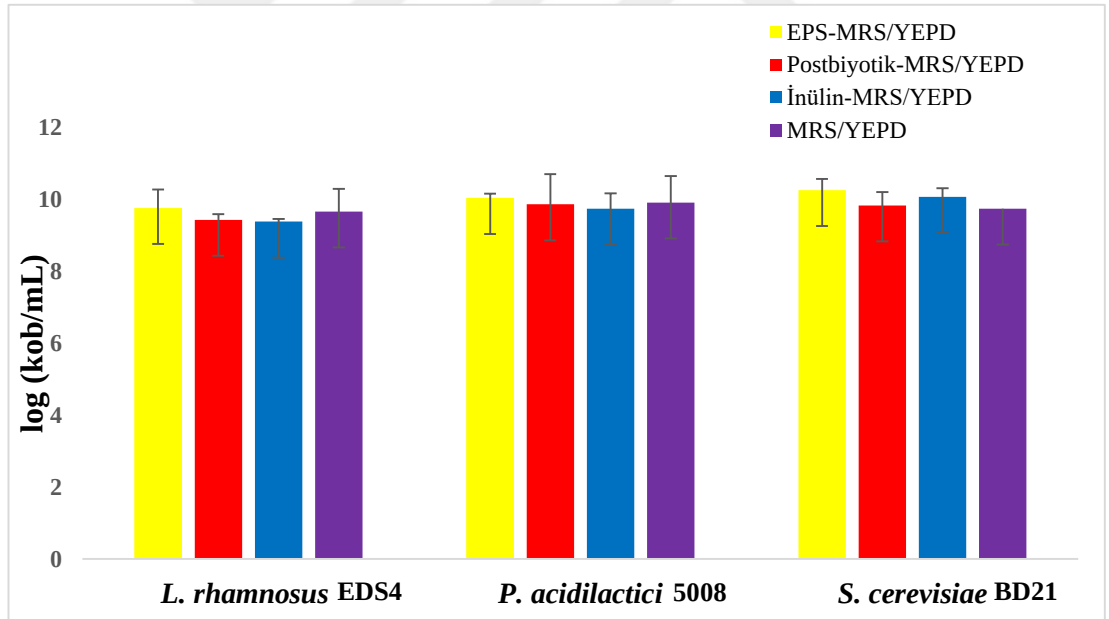
Şekil 4.13. *S. cerevisiae* BD21 suşunun %2 oranında postbiyotik, glikoz, inülin içeren YEPD ile glikozsuz YEPD besi ortamlarındaki fermantasyon sonrası canlılıklarının karşılaştırılması.

4.4. Liyofilize Ekzopolisakkaritin ve Postbiyotiklerin Gelişimi Düzenleyici Etkilerinin Belirlenmesi

L. rhamnosus ACS5 suşundan elde edilen ACS5-L-EPS'nin *L. rhamnosus* EDS4, *P. acidilactici* 5008 ve *S. cerevisiae* BD21 suşları tarafından fermente edilebildikleri tespit edildikten sonra L-EPS'nin bakteri ve maya suşları üzerinde gelişimi düzenleyici aktivitesi Bölüm 3.2.3.4'de anlatılan metoda göre belirlenmiş, sonuçlar Çizelge 4.9'da verilmiştir. Bu çalışmada *L. rhamnosus* EDS4 ve *P. acidilactici* 5008 suşları MRS, %2 L-EPS+MRS ve %2 inülin+MRS besi ortamlarında geliştirilerek canlılık oranları log kob/mL olarak belirlenmiştir. *S. cerevisiae* BD21 maya suşu ise YEPE %2 L-EPS+YEPE ve %2 inülin+YEPE besiortamlarında geliştirilerek canlı maya hücreleri sayısı log kob/mL olarak tespit edilmiştir. Test edilen *L. rhamnosus* EDS4, *P. acidilactici* 5008 ve *S. cerevisiae* BD21 suşlarında gelişim düzenleyici aktivitelerinin L-EPS içeren MRS besi ortamında, kontrol olarak kullanılan MRS ve ticari prebiyotik inulin içeren besi ortaamlarından yüksek olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.9). *S. cerevisiae* BD21 maya suşunda %2 L-EPS içeren YEPE besiortamında canlılığın daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Yapılan bu çalışma ile ACS5-L-EPS'nin *L. rhamnosus* EDS4, *P. acidilactici* 5008 ve *S. cerevisiae* BD21 suşlarının gelişimini pozitif yönde etkilediği belirlenmiştir. Çalışılan mikroorganizmalar kendi aralarında kıyaslandığında ise ACS5-L-EPS'nin en yüksek gelişimi düzenleyici etkisinin *S. cerevisiae* BD21 (10,26 log kob/mL) suşunda olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.14). Postbiyotikler inülin ile kıyaslandığında çalışılan mikroorganizmaların tamamında daha yüksek gelişim etkisi göstermiştir. Postbiyotikli besi ortamında en yüksek gelişim etkisi *P. acidilactici* 5008 suşunda ($9,83 \pm 0,37$ log kob/mL) gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.9. L-EPS'nin ve postbiyotiklerin potansiyel probiyotik mikroorganizmaların gelişimini düzenleyici etkisi.

Suş	L-EPS - MRS log kob/mL	Postbiyotik- MRS log kob/mL	İnülün-MRS log kob/mL	MRS log kob/mL
<i>L. rhamnosus</i> EDS4	9,76±0,51	9,43±0,16	9,38±0,07	9,66±0,63
<i>P. acidilactici</i> 5008	10,04±0,12	9,86±0,84	9,74±0,43	9,91±0,74
Suş	L-EPS- YEPD log kob/mL	Postbiyotik- YEPD log kob/mL	İnülün-YEPD log kob/mL	YEPD log kob/mL
<i>S. cerevisiae</i> BD21	10,26±0,31	9,83±0,37	10,07±0,24	9,74±0,42



Şekil 4.14. ACS5-L-EPS'nin potansiyel probiyotik mikroorganizmaların gelişimini düzenleyici etkisi.

4.5. Liyofilize Ekzopolisakkaritin Prebiyotik Skorunun Belirlenmesi

L. rhamnosus ACS5 suşundan elde edilen L-EPS'nin potansiyel probiyotik mikroorganizmalar (*L. rhamnosus* EDS4, *P. acidilactici* 5008 ve *S. cerevisiae* BD21) tarafından fermente edilebildiği ve gelişimi düzenleyici etkisinin olduğu tespit edilmiş

ve ayrıca bağırsak patojeni mikroorganizmalar (*E. coli* ATCC 11229, *E. coli* ATCC 35218 ve *E. faecalis* ATCC 29212) tarafından fermente edilemediği tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre ACS5-L-EPS'nin ve karşılaştırma için ticari prebiyotik inulinin prebiyotik skor aktivitesi Bölüm 3.2.3.5'de verilen metoda göre belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.10, Çizelge 4.11 ve Şekil 4.15'de verilmiştir. ACS5-L-EPS *L. rhamnosus* EDS4 ve *P. acidilactici* 5008 karşı 24 saatte denenen bütün bağırsak patojen gruplarında ve karışık kültürde prebiyotik skor aktivitesi gösterirken, *L. rhamnosus* EDS4 suşu 48 saat de ACS5-L-EPS ve inulinde sadece *E. faecalis* ATCC 29212 patojeni üzerinde prebiyotik skor aktivitesi göstermiştir. *L. rhamnosus* EDS4 suşunun ACS5-L-EPS'deki prebiyotik skor aktivitesinin (0,5-1,17), inulinden düşük olduğu (2,95-3,74) tespit edilmiştir. *P. acidilactici* 5008 suşu 24 ve 48 saatte prebiyotik skor aktivitesi göstermiştir ve en yüksek prebiyotik skor aktivitesinin *E. faecalis* ATCC 29212 patojeni ile olduğu belirlenmiştir (24 ve 48 saat için sırasıyla 2,30 ve 2,92). *P. acidilactici* 5008 suşunun karışık kültür ile 24 saatte 1,63 olan prebiyotik skor aktivitesinin 48 saatte 2,25'e yükseldiği gözlenmiştir. *P. acidilactici* 5008 suşunun inulin prebiyotiği ile olan prebiyotik skor aktivitesinin 48 saatte L-EPS'den yüksek olduğu tespit edilmiştir. *S. cerevisiae* BD21 suşunda prebiyotik skor aktivitesi 48. saatte gözlemlenirken, inulin içeren besi ortamında herhangi bir skor aktivitesi göstermemiştir. *S. cerevisiae* BD21 suşunda en yüksek prebiyotik skor aktivitesi 2.1 olarak *E. faecalis* ATCC 29212 test bakterisinde belirlenirken, karışık kültür ile 1.43 değerinde prebiyotik skor aktivitesi olduğu gözlemlenmiştir. ACS5-L-EPS'nin en yüksek prebiyotik skor aktivitesi 24 ve 48 saatte *E. faecalis* ATCC 29212 patojeni ile belirlenmiştir. ACS5-L-EPS'nin karışık kültürde en yüksek prebiyotik skor aktivitesi *P. acidilactici* 5008 suşu ile 48. saatte 2,25 olarak tespit edilmiştir. *P. acidilactici* 5008 suşu en yüksek skor aktivitesinin inulin içeren besi ortamında 48. saatte olduğu gözlemlenmiştir. Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde ise, L-EPS'nin *L. rhamnosus* EDS4 ve *P. acidilactici* 5008 suşları ile 24 saatlik inkübasyonda *E. coli* ATCC 11229, *E. coli* ATCC 35218, *E. faecalis* ATCC 29212 patojenleri ve bu patojenlerin karışık kültürleri üzerinde prebiyotik skor aktivitesinin olduğu, *P. acidilactici* 5008 ve *S. cerevisiae* BD21 suşlarının ise prebiyotik skor aktivitesinin 48 saatlik inkübasyonda arttığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.10. L-EPS'nin prebiyotik skor aktivitesi (log kob/mL).

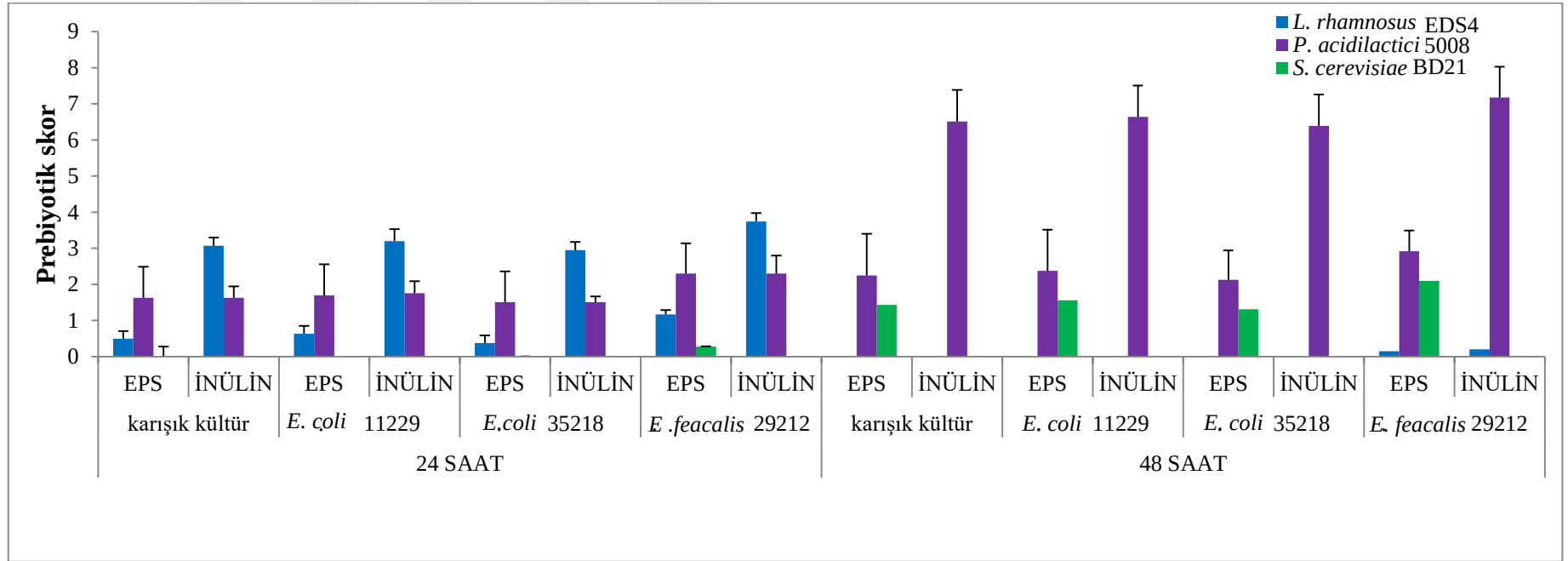
Suşlar	Prebiyotik Skor 24 saat				Prebiyotik Skor 48 saat			
	Karışık kültür ^a	<i>E. coli</i> ^b	<i>E. coli</i> ^c	<i>E. feacalis</i> ^d	Karışık kültür ^a	<i>E. coli</i> ^b	<i>E. coli</i> ^c	<i>E. feacalis</i> ^d
<i>L. rhamnosus</i> EDS4	0,5±0,21	0,63±0,22	0,38±0,21	1,17±0,12	-	-	-	0,15±0,06
<i>P. acidilactici</i> 5008	1,63±0,86	1,76±0,86	1,51±0,85	2,30±0,84	2,25±1,15	2,38±1,14	2,13±0,81	2,92±0,57
<i>S. cerevisiae</i> BD21	-	-	-	0,28±0,25	1,43±0,00	1,56±0,01	1,31±0,01	2,1±0,00

a: *E. coli* ATCC 11229, *E. coli* ATCC 35218, *E. feacalis* ATCC 29212 bağırsak patojenlerinin (1:1:1) oranında karışık kültürü; b: *E. coli* ATCC 11229; c: *E. coli* ATCC 35218; d: *E. feacalis* ATCC 29212

Çizelge 4.11. Ticari prebiyotik inulinin prebiyotik skor aktivitesi (log kob/mL).

Suşlar	Prebiyotik Skor 24 saat				Prebiyotik Skor 48 saat			
	Karışık kültür ^a	<i>E. coli</i> ^b	<i>E. coli</i> ^c	<i>E. feacalis</i> ^d	Karışık kültür ^a	<i>E. coli</i> ^b	<i>E. coli</i> ^c	<i>E. feacalis</i> ^d
<i>L. rhamnosus</i> EDS4	3,07±0,23	3,20±0,33	2,95±0,23	3,74±0,24	-	-	-	0,2±0,08
<i>P. acidilactici</i> 5008	1,63±0,32	1,76±0,33	1,51±0,16	2,30±0,50	6,51±0,88	6,64±0,87	6,39±0,87	7,18±0,85
<i>S. cerevisiae</i> BD21	-	-	-	-	-	-	-	-

a: *E. coli* ATCC 11229, *E. coli* ATCC 35218, *E. feacalis* ATCC 29212 bağırsak patojenlerinin (1:1:1) oranında karışık kültürü; b: *E. coli* ATCC 11229; c: *E. coli* ATCC 35218; d: *E. feacalis* ATCC 29212



Şekil 4.15. L-EPS'nin ve ticari prebiyotik inulinin prebiyotik skor aktiviteleri (log kob/mL).

4.6. Liyofilize Ekzopolisakkaritin Mide Asidine Direnci

L. rhamnosus ACS5 suşundan elde edilen ACS5-L-EPS'nin potansiyel probiyotik mikroorganizmalar (*L. rhamnosus* EDS4, *P. acidilactici* 5008 ve *S. cerevisiae* BD21) tarafından fermente edilebildiği, gelişimi düzenleyici etkisinin olduğu tespit edilmiş ve prebiyotik skor aktivitesi belirlenmiştir. Prebiyotiklerin etki gösterebilmesi için mide asidinde hidrolizinin düşük olması gerektiği bildirilmiştir. Bu çalışmada *L. rhamnosus* ACS5 suşundan elde edilen ACS5-L-EPS'nin pH 1, pH 2, pH 3, pH 4 ve pH 5 olan mide sıvısına direnci 0,5, 1, 2, 3, 4 ve 5 saatlik inkübasyon sürelerinden sonra araştırılmış ve sonuçlar Çizelge 4.12, Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de verilmiştir. Farklı inkübasyon sürelerinde pH arttıkça L-EPS'nin yüzde hidrolizi azalmıştır. ACS5-L-EPS'nin en düşük hidrolizi test edilen inkübasyon sürelerinde en fazla pH'ı 4 olan mide sıvısında (%0,21-7,18) gözlemlenmiştir. ACS5-L-EPS'nin en yüksek hidrolizi 5 saatlik inkübasyondan sonra pH'sı 3 olan mide sıvısında (%11,02) tespit edilmiştir. Bu ortamdaki inulinin hidroliz oranının ACS5-L-EPS'den yüksek olduğu (%12,82) belirlenmiştir. Farklı pH'daki mide sıvısı ve inkübasyon sürelerinde ACS5-L-EPS ve inulinin (kontrol grubu) hidrolizlerinde anlamlı farklılıklar olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$). pH'ı 1 olan mide sıvısında 3, 4 ve 5 saatlik inkübasyon sürelerinde L-EPS'nin (%4,73, 7,88 ve 10,45, sırasıyla) hidrolizinin inulinden (%4,47, 4,65 ve 6,41) yüksek olduğu, pH'sı 2 olan mide sıvısında ise aynı inkübasyon sürelerinde inulinin hidrolizinin daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. pH 4 ve pH 5 mide sıvılarında ACS5-L-EPS'nin hidrolizinin kontrol olarak kullanılan inulinin hidrolizinden düşük olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.12). Çalışılan farklı pH'daki mide sıvılarının tamamında 5. saat sonunda inülin ve ACS5-L-EPS için en yüksek yüzde hidroliz değerleri elde edilmiştir. Ticari bir prebiyotik olan inülin ile kıyaslandığında ACS5-L-EPS'nin mide asidinde hidrolizinin daha düşük olduğu gözlemlenmiştir.

ACS5-L-EPS ve inulinin pH1, pH2, pH3, pH4 ve pH5'daki mide asidinde her pH'daki farklı inkübasyon sürelerindeki hidrolizin ortalamaları arasındaki farkın önemi istatistik analizleri ile araştırılmıştır. İnulinin pH1, pH3, pH4 ve pH5 olan mide sıvılarında 5 saatlik inkübasyon süresinde ortalama en yüksek hidroliz görülürken, bu pH değerlerindeki mide asidinde 5 saatlik inkübasyon süresi ile 0.5, 1.0, 2.0 ve 3.0 deki hidrolizlerin ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur

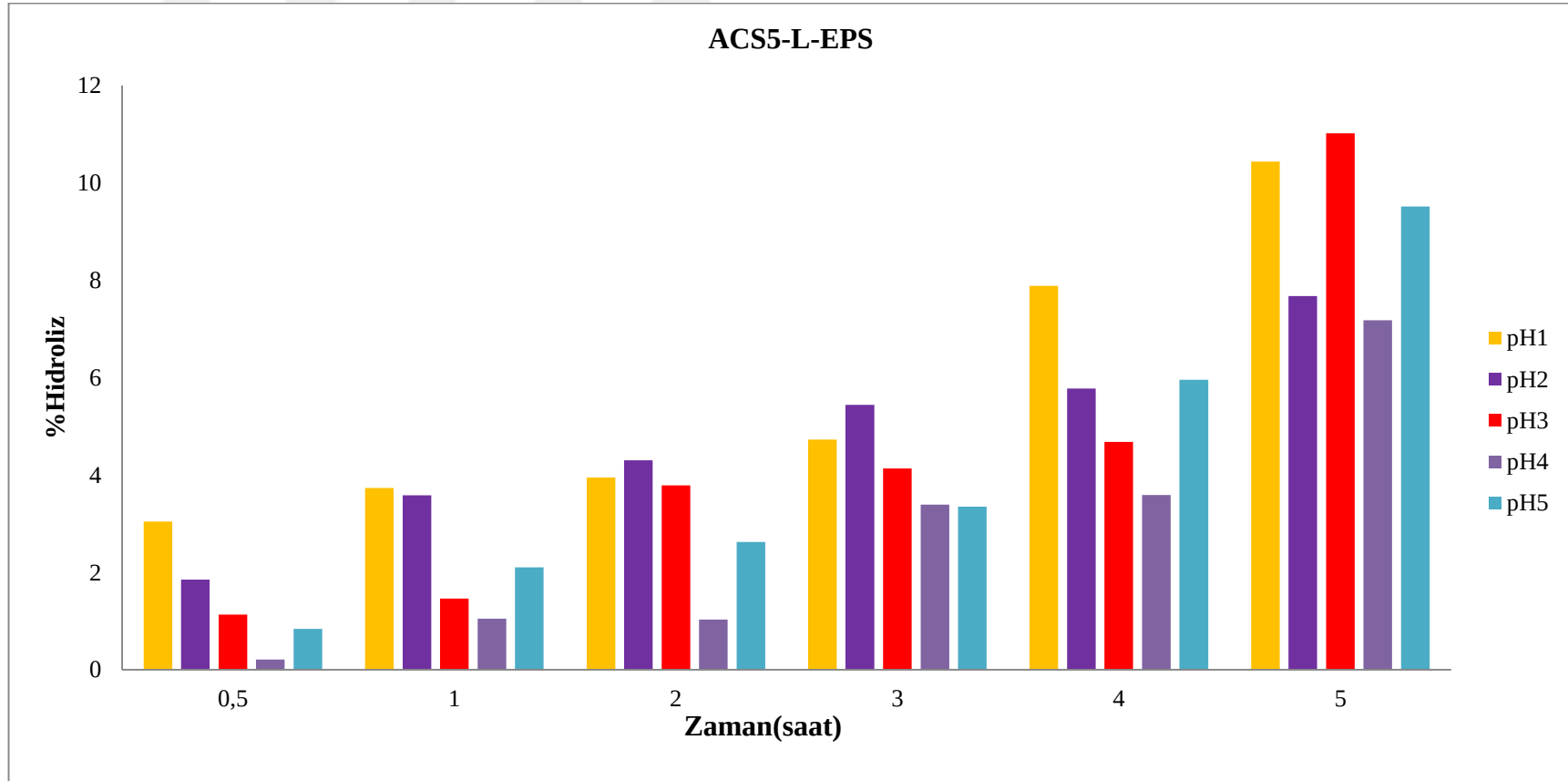
($P<0,05$). İnulinin pH2 olan mide asidinde ortalama en yüksek hidrolizi 4 saatlik inkübasyon süresinde görülmüş ve 4 saatlik inkübasyon süresi ile 0.5, 1 ve 2'deki hidrolizlerin ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0,05$). ACS5-L-EPS'nin ortalama en yüksek hidrolizi pH5 mide sıvısında görülmüş ve 5 saatlik inkübasyon süresi ile 0.5' deki hidrolizlerin ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$). L-EPS'nin pH3 olan mide sıvısında farklı inkübasyon sürelerindeki hidrolizin ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P<0,05$). İstatistiksel değerlendirmede yüzde hidroliz ortalamaları arasındaki farkın önemli olduğu gruplar Çizelge 4.12'de küçük üst simge harflerle gösterilmiştir.



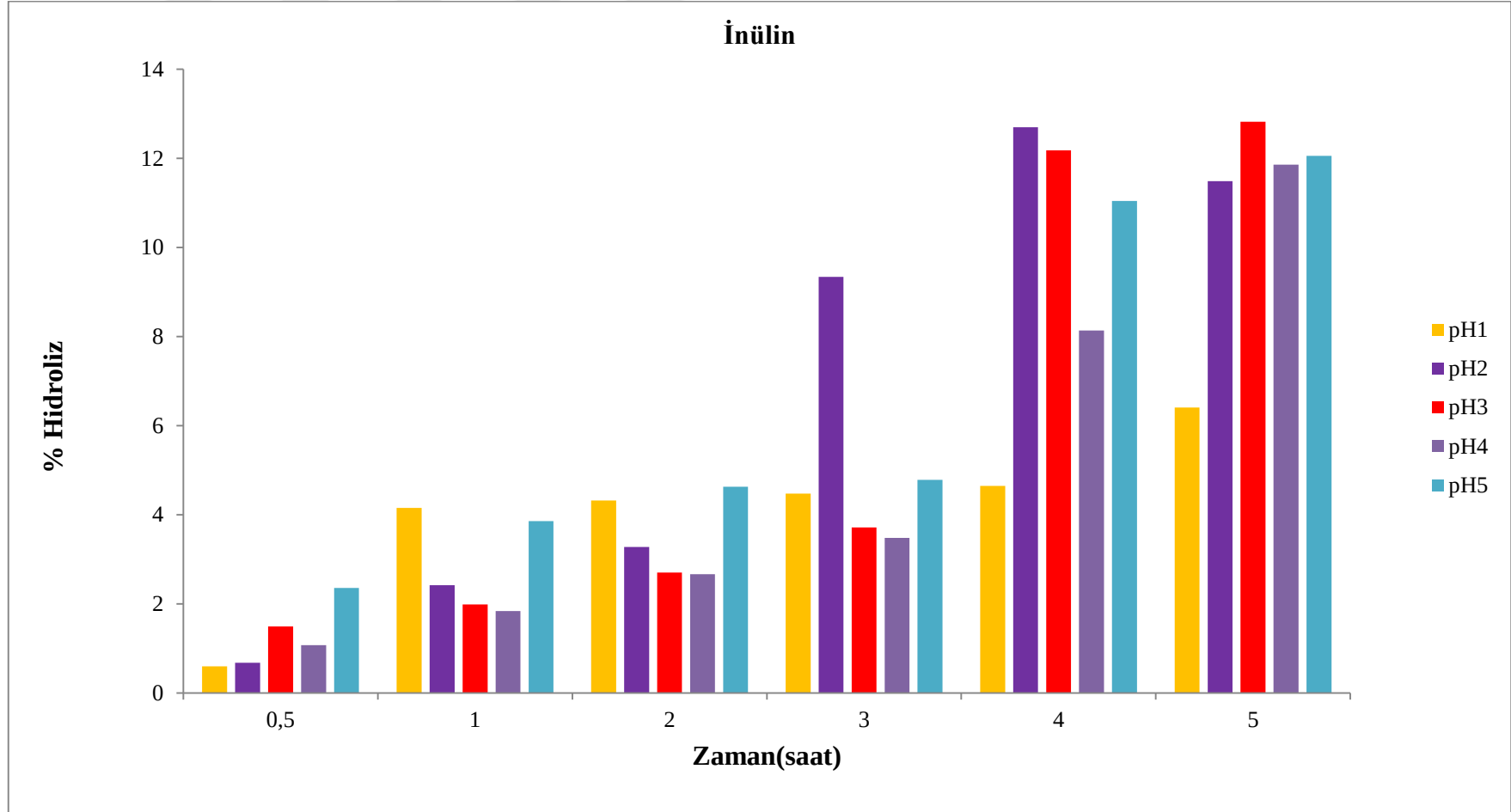
Çizelge 4.12. L-EPS ve inülinin farklı pH’ daki mide sıvısında farklı inkübasyon sürelerindeki % hidrolizi.

	pH 1 mide sıvısı % hidroliz		pH 2 mide sıvısı % hidroliz		pH 3 mide sıvısı % hidroliz		pH 4 mide sıvısı % hidroliz		pH 5 mide sıvısı % hidroliz	
	İnulin	L-EPS	İnulin	L-EPS	İnulin	L-EPS	İnulin	L-EPS	İnulin	L-EPS
0,5 saat	0,60±0,11 ^{a-b,c,d,e}	3,05±1,37 ^{a-e,f}	0,68±0,08 ^{a-d,e,f}	1,85±0,20 ^{a-f}	1,49±0,06 ^{a-e,f}	1,14±0,60	1,07±0,93 ^{a-f}	0,21±0,06 ^{a-e,f}	2,36±0,00 ^{a-e,f}	0,84±0,07 ^{a-f}
1 saat	4,16±0,7 ^{b-a,b-f}	3,73±1,35 ^{b-e,f}	2,42±0,56 ^{b-d,e,f}	3,58±0,81	1,99±0,50 ^{b-e,f}	1,46±0,96	1,84±0,39 ^{b-f}	1,05±0,29 ^{b-f}	3,86±0,00 ^{b-e,f}	2,10±0,67 ^{b-f}
2 saat	4,32±0,54 ^{c-a,c-f}	3,95±1,14 ^{c-e,f}	3,28±0,91 ^{c-d,e,f}	4,30±0,76	2,70±0,50 ^{c-e,f}	3,79±0,23	2,67±0,65 ^{c-f}	1,03±0,58 ^{c-f}	4,63±0,00 ^{c-e,f}	2,62±0,12
3 saat	4,47±0,95 ^{d-a,d-f}	4,73±0,00 ^{d-f}	9,34±0,67 ^{d-a,b,c}	5,44±0,92	3,72±0,59 ^{d-e,f}	4,14±0,95	3,48±0,13	3,39±0,47	4,79±0,00 ^{d-e,f}	3,35±0,29
4 saat	4,65±1,80 ^{e-a,e-f}	7,88±0,00 ^{e-a,b,c,f}	12,70±0,13 ^{e-a,b,c}	5,78±0,45	12,18±1,70 ^{e-} a,b,c,d	4,68±1,48	8,14±1,67	3,59±0,52 ^{e-a}	11,05±0,00 ^{e-} a,b,c,d	5,95±1,27
5 saat	6,41±1,98 ^{f-a,b,c,d,e}	10,45±0,00 ^{f-a,b,c,e}	11,49±1,06 ^{f-a,b,c}	7,67±1,08 ^{f-a}	12,82±2,04 ^{f-} a,b,c,d	11,02±1,14	11,86±0,00 ^{f-a,b,c}	7,18±2,61 ^{f-a,b,c}	12,06±0,00 ^{f-} a,b,c,d	9,51±2,26 ^{a-f}

*a:0,5; b:1; c:2; d:3; e:4; f:5 harfler hidrolizde inkübasyon süresini göstermektedir. **: Aynı sütundaki farklı küçük üst simge harflerle % hidroliz ortalamaları arasındaki farkın önemli olduğu gruplar gösterilmiştir (P<0,05)



Şekil 4.16. ACS5-L-EPS'nin farklı pH' lardaki mide sıvısında farklı inkübasyon sürelerindeki % hidrolizi.



Şekil 4.17. İnülinin farklı pH' lardaki mide sıvısında farklı inkübasyon sürelerindeki % hidrolizi.

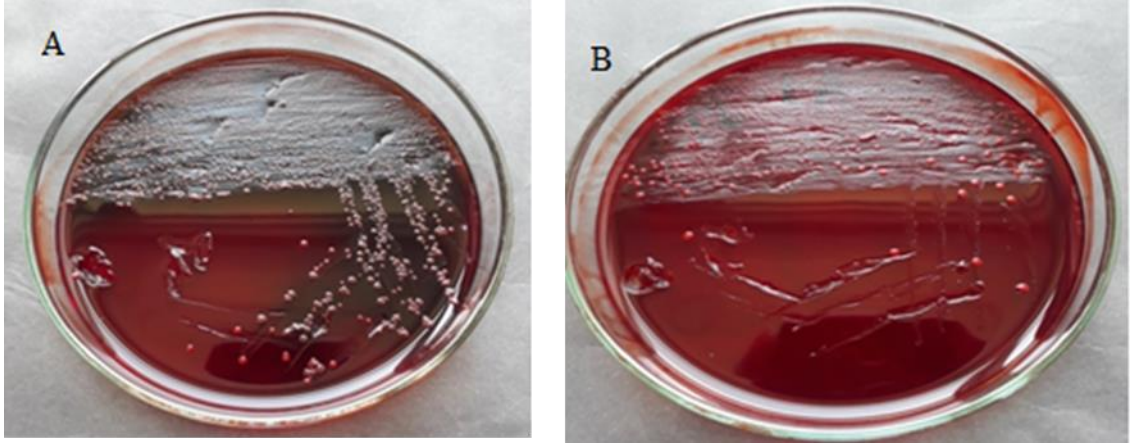
4.7. Bağırsak Patojen Mikroorganizmalarının Biyofilm Aktivitelerinin Belirlenmesi

4.7.1. Biyofilm aktivitesinin kongo red yöntemi ile fenotipik olarak belirlenmesi

Biyofilm oluşturabilen patojen suşların belirlenerek, antibiyofilm çalışmasında kullanabilmek amacıyla, Bölüm 3.2.3.2’de anlatıldığı gibi araştırılmış patojen bakteri suşlarının biyofilm yapma oranları önce Kongo Red-BHI yöntemi ile fenotipik olarak tespit edilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.13 ve Şekil 4.18’de verilmiştir. Kongo Red-BHI agarda hem siyah hem de kırmızı koloni oluşumu görünen *E. coli* ATCC 11229 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşlarında orta derecede biyofilm aktivitesi gözlenirken *E. faecium* RI51, *S. epidermidis* ATCC 12228, *E. faecalis* ATCC 29212 ve *S. mutans* NCTC 8177 suşlarında ise zayıf biyofilm aktivitesi belirlenmiştir. Orta derecede ve zayıf derecede biyofilm oluşumu gösteren *S. epidermidis* ATCC 12228 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşlarının Kongo Red-BHI agarda koloni morfolojileri Şekil 4.18’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.13. Bazı patojen bakterilerin Kongo Red yöntemi ile belirlenen biyofilm oluşumları.

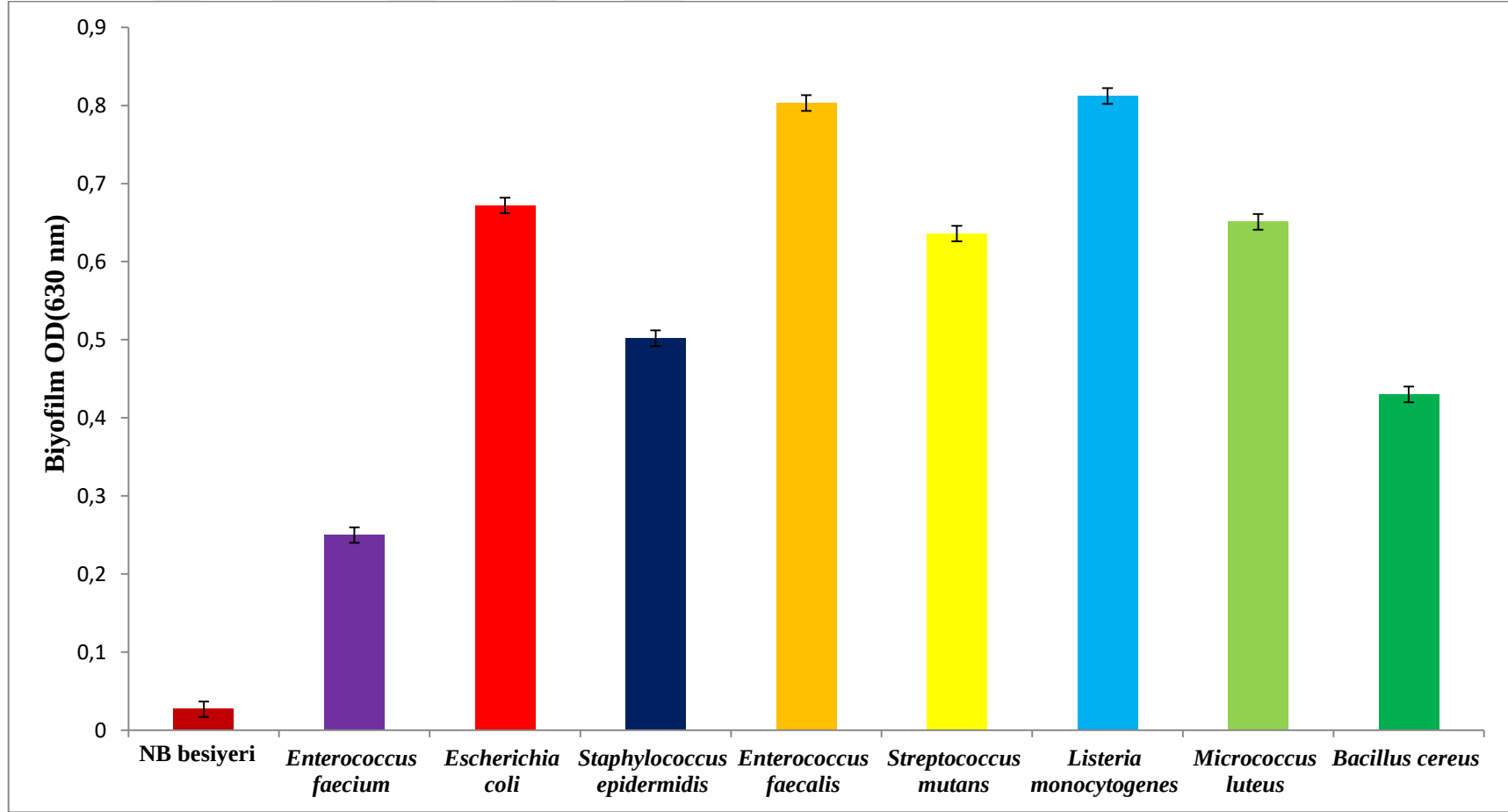
Patojen suşlar	Biyofilm
<i>Enterococcus faecium</i> RI51	(+)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	(++)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	(+)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	(+)
<i>Streptococcus mutans</i> NCTC 8177	(+)
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	(++)



Şekil 4.18. Kongo Red-BHI agarda (A) *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunun orta derece biyofilm aktivitesini gösteren siyah ve kırmızı koloniler; (B) *S. epidermidis* ATCC 12228 suşunun zayıf biyofilm aktivitesini gösteren kırmızı koloniler.

4.7.2. Biyofilm aktivitelerinin mikropate yöntemi ile belirlenmesi

Kongo red yöntemi ile biyofilm yapma yetenekleri fenotipik olarak değerlendirilen ve en iyi biyofilm aktivitesi gösteren *E. coli* ATCC 11229, *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşları ile zayıf biyofilm aktivitesi gösteren *E. faecium* RI51, *S. epidermidis* ATCC 12228, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. mutans* NCTC 8177, *M. luteus* NRRL-B 4375 ve *B. cereus* RSKK 863 mikroorganizmalarının biyofilm yapma oranları mikropate yöntemi ile spektrofotometrik olarak da belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.14 ve Şekil 4.19’de verilmiştir. Mikropate yöntemi ile test edilen 8 patojen suşda biyofilm oluşumu gözlenmiştir. En yüksek biyofilm yapma oranı *L. monocytogenes* ATCC 7644 ($OD\ 0,812\pm0,08$), *E. faecalis* ATCC 29212 ($OD\ 0,803\pm0,03$) ve *E. coli* ATCC 11229’de ($0,672\pm0,02$) gözlenirken, en düşük biyofilm yapma oranı *B. cereus* RSKK 863 ($OD\ 0.43\pm0,05$) ve *S. epidermidis* ATCC 12228’de ($OD\ 0,502\pm0,06$) tespit edilmiştir.

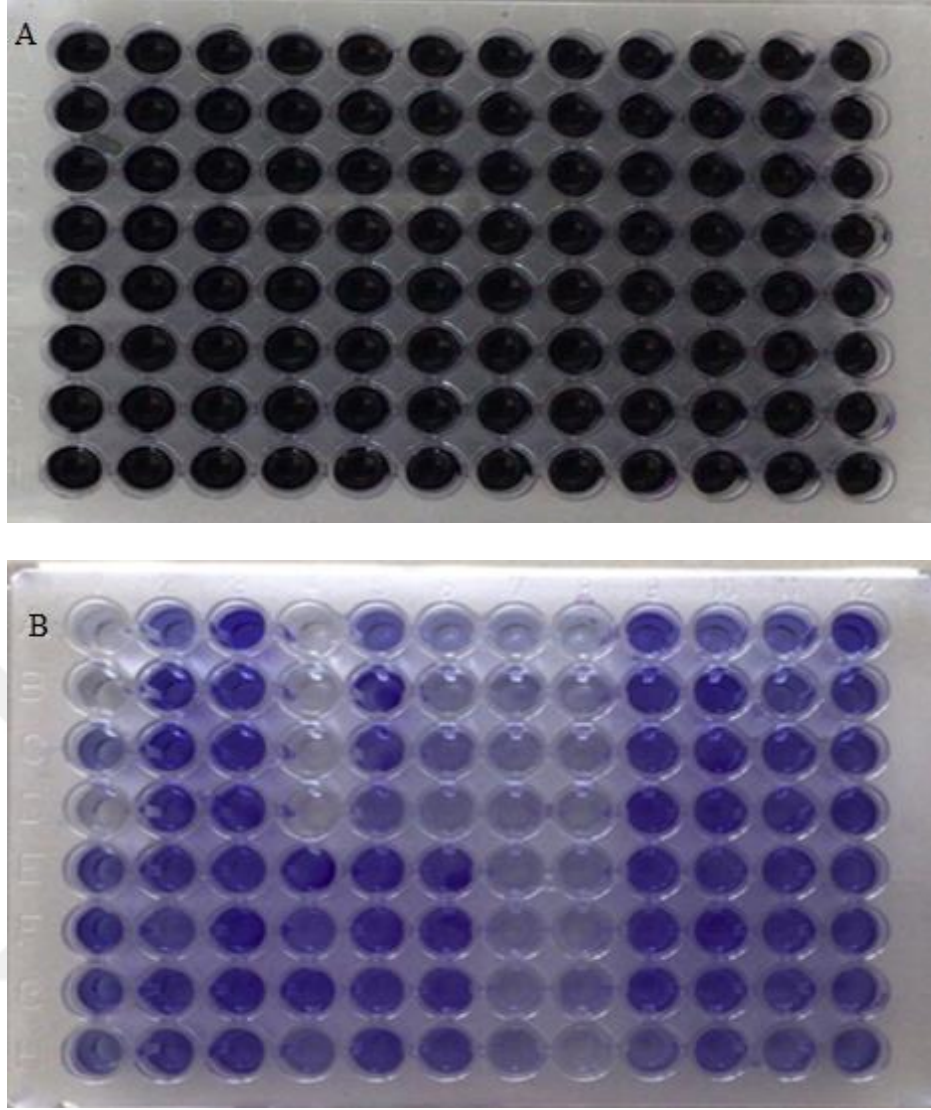


Şekil 4.19. Patojen mikroorganizmaların mikropate yöntemine göre biyofilm yapma yetenekleri.

Mikroplate yöntemi ile patojen suşların biyofilm oluşumları araştırıldığında negatif kontrol olarak boş besiyeri kullanıldığında patojen suşlar güçlü biyofilm tespit edilirken, *E. faecium* ATCC RI51 suşu negatif kontrol olarak kullanıldığında *B. cereus* RSKK- 863 suşu zayıf biyofilm aktivitesi gösterirken çalışılan diğer patojen suşlar orta derecede biyofilm aktivitesi göstermiştir. Boş besiyeri ve *E. faecium* ATCC RI51 suşunun negatif kontrol olarak kullanıldığı biyofilm sonuçları karşılaştırılmış ve antibiyofilm aktivitesinin belirlenmesinde *L. monocytogenes* ATCC 7644 ile *E. coli* ATCC 11229 suşları test bakterisi olarak seçilmiştir.

Çizelge 4.14. Patojen mikroorganizmaların mikroplate yöntemi ile belirlenen biyofilm aktiviteleri.

Suşlar	Kontrol grubu		Biyofilm OD
	NB besiyeri OD	<i>E. faecium</i> ATCC RI51 OD	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	0,027±0,00	0,25±00	0,672±0,02
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	0,027±0,00	0,25±00	0,737±0,01
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	0,027±0,00	0,25±00	0,502±0,06
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0,027±0,00	0,25±00	0,803±0,03
<i>Streptococcus mutans</i> NCTC 8177	0,027±0,00	0,25±00	0,636±0,04
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	0,027±0,00	0,25±00	0,812±0,08
<i>Micrococcus luteus</i> NRLL-B 4375	0,027±0,00	0,25±00	0,651±0,03
<i>Bacillus cereus</i> RSKK- 863	0,027±0,00	0,25±00	0,43±0,05



Şekil 4.20. (A)Kristal viyole boyanma sonrası ve (B) %33 glasiyel asetik asit ile çözdürülmüş biyofilmlerin mikropate görüntüsü.

4.8. Probiyotik, Prebiyotik, Sinbiyotik, Postbiyotik ve Parabiyotiklerin Antibiyofilm Aktivitesinin Belirlenmesi

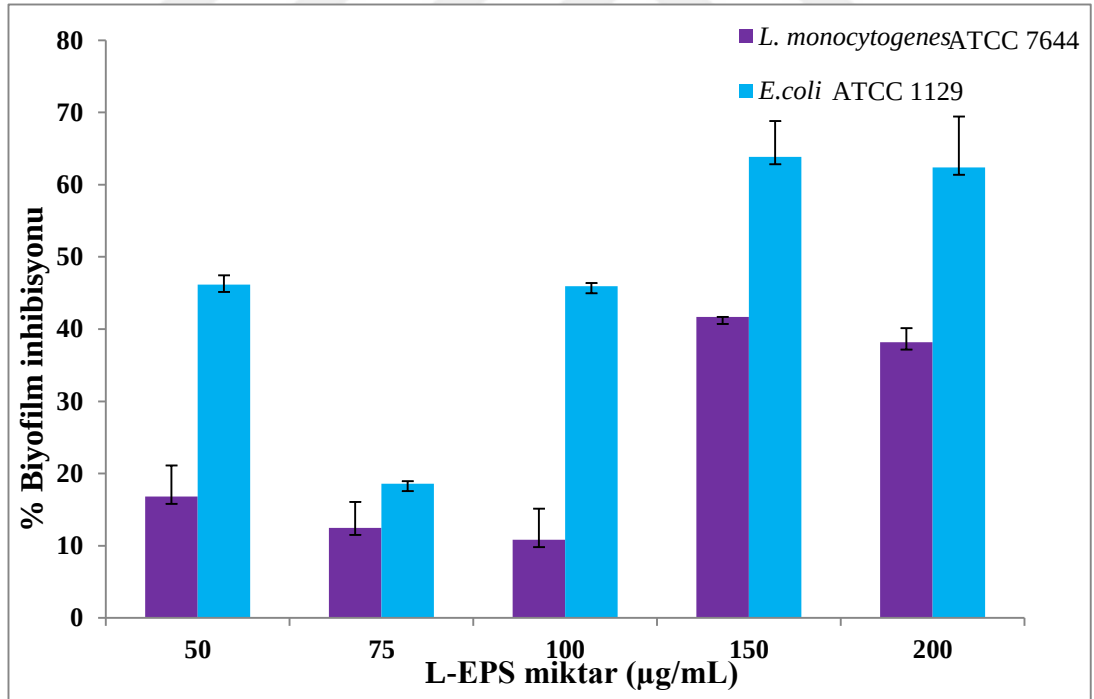
Probiyotik (*L. rhamnosus* ACS5), prebiyotik (ACS5-L-EPS), postbiyotik (*L. rhamnosus* ACS5'tan elde edilen metabolitler), parabiyotik (*L. rhamnosus* ACS5'un ısı ile inaktive edilmiş hücreleri), parabiyotik ile prebiyotik (sinbiyotik) ve postbiyotik ile prebiyotik (sinbiyotik) kombinasyonlarının antibiyofilm aktivitesi Bölüm 3.2.3.3' de anlatıldığı gibi yapılmış ve sonuçlar aşağıda verilmiştir.

Prebiyotiklerin antibiyofilm aktivitesi;

ACS5-L-EPS'nin farklı miktarlarının (50 µg, 75 µg, 100 µg, 150 µg, 200 µg ve 250 µg) *E. coli* ATCC 11229 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşlarının oluşturdukları biyofilmlere karşı inhibisyon aktiviteleri Çizelge 4.15 ve Şekil 4.21'de verilmiştir. ACS5-L- EPS miktarlarının *L. monocytogenes* 7644 ve *E. coli* 11229 suşlarının oluşturdukları biyofilmlere karşı inhibisyon aktivitesinin olduğu gözlemlenmiştir. ACS5-L-EPS'nin *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunun oluşturduğu biyofilme karşı en düşük inhibisyon oranı 100 µg/mL miktarında %10,82±4,32, en yüksek inhibisyon oranı 150 µg/mL miktarında %41,70±00 olarak belirlenmiştir. *L. monocytogenes* ATCC 7644'ün ürettiği biyofilme karşı düşük ACS5-L-EPS miktarda (50 µg, 75 µg, 100 µg) kendi aralarında kıyaslandığında önemli bir fark gözlemlenmezken (%16,81 ± 4,28; %12,48 ± 3,57; %10,82 ± 4,32) daha yüksek miktarlarda (150 µg ve 200 µg) yüksek seviyede biyofilm inhibisyonu (%41,70±00, %38,18±1,97) gözlemlenmiştir. ACS5-L-EPS'nin *E. coli* ATCC 11229 karşı en yüksek biyofilm inhibisyon oranı 150 µg/mL miktarında %63,84±4,99 olarak belirlenirken en düşük inhibisyon oranı 75 µg/mL miktarında %18,56±0,37 olarak tespit edilmiştir. L-EPS'nin test edilen miktarlarının *E. coli* ATCC 11229' ye karşı gösterdikleri biyofilm inhibisyon oranlarının *L. monocytogenes* ATCC 7644'den yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.21).

Çizelge 4.15. Prebiyotik ACS5-L-EPS'nin % biyofilm inhibisyonu.

Prebiyotik Miktarı ($\mu\text{g/mL}$)	% Biyofilm İnhibisyonu <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	% Biyofilm İnhibisyonu <i>E.coli</i> ATCC 11229
50	16,81 $\pm$ 4,28	46,15 $\pm$ 11,29
75	12,48 $\pm$ 3,57	18,56 $\pm$ 0,37
100	10,82 $\pm$ 4,32	45,96 $\pm$ 0,42
150	41,70 $\pm$ 0,00	63,84 $\pm$ 4,99
200	38,18 $\pm$ 1,97	62,38 $\pm$ 7,07



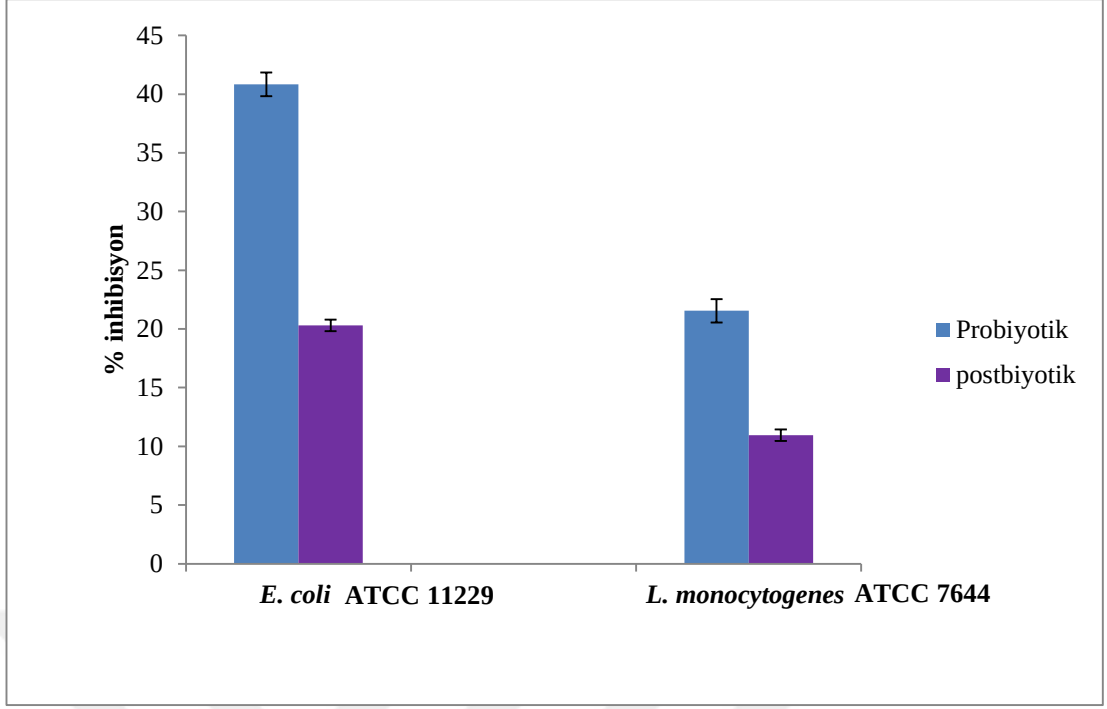
Şekil 4.21. Prebiyotik ACS5-L-EPS'nin *E. coli* ATCC 11229 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 11229 patojenleri ile antibiyofilm aktivitesi.

Probiyotik ve postbiyotiklerin antibiyofilm aktivitesi;

Probiyotik olarak test edilen *L. rhamnonsus* ACS5 suşu ile bu suştan elde edilen ACS5-postbiyotiklerin, *E. coli* ATCC 11229 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşlarının oluşturdukları biyofilmlere karşı inhibisyon aktiviteleri Çizelge 4.16 ile Şekil 4.22’de verilmiştir. *L. rhamnonsus* ACS5’ten elde edilen ACS5-postbiyotiğinin antibiyofilm aktivitesinin *E. coli* ATCC 11229 suşuna karşı $20,30 \pm 11,17$ iken *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşuna karşı $10,95 \pm 4,03$ oranında olduğu gözlemlenmiştir. Probiyotik olarak test edilen *L. rhamnonsus* ACS5’in aktif kültürlerinin biyofilm inhibisyon oranları ise *E. coli* ATCC 11229 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşlarına karşı sırasıyla $40,83 \pm 1,45$ ve $21,55 \pm 2,86$ olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.16. Probiyotik ve postbiyotiklerinin *E. coli* ATCC 11229 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşlarının biyofilmlerini inhibisyon yüzdeleri.

Suş	% Biyofilm İnhibisyonu Probiyotik	% Biyofilm İnhibisyonu Postbiyotik
<i>E. coli</i> ATCC 11229	$40,83 \pm 1,45$	$20,3 \pm 11,17$
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	$21,55 \pm 2,86$	$10,95 \pm 4,03$



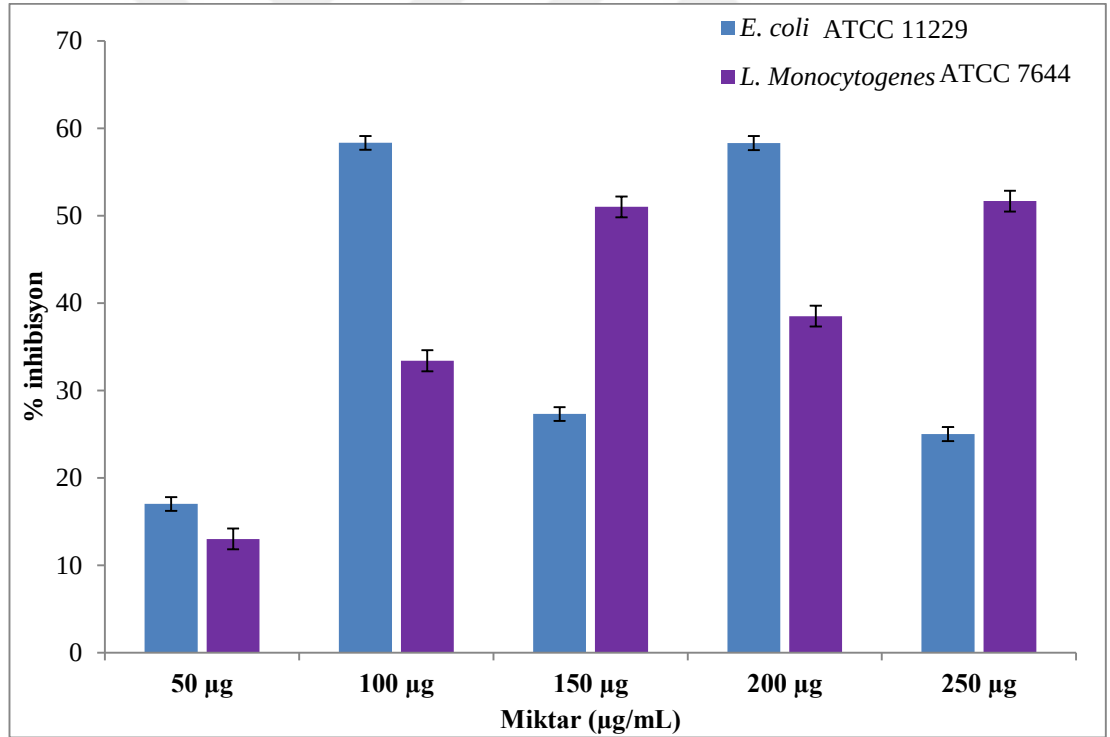
Şekil 4.22. Postbiyotik ve probiyotiklerin *E. coli* ATCC 11229 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 patojenleri ile antibiyofilm aktivitesi.

Postbiyotik ve prebiyotik kombinasyonlarının antibiyofilm aktivitesi;

ACS5-postbiyotikleri ve prebiyotiklerin (ACS5-L-EPS) farklı miktarlarının kombinasyonlarının biyofilm inhibisyon oranları Çizelge 4.17 ve Şekil 4.23’de verilmiştir. *E. coli* ATCC 11229 suşunun biyofilmlerine karşı en yüksek inhibisyon oranı ACS5-postbiyotiği ile 100 µg prebiyotik miktarında $58,30 \pm 0,57$ olarak tespit edilirken, *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunun üretmiş olduğu biyofilmlere karşı ise ACS5-postbiyotiği ile 250 µg prebiyotik miktarında en yüksek inhibisyon $51,66 \pm 7,63$ olarak belirlenmiştir. *E. coli* ATCC 11229 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 biyofilmlerine karşı en düşük inhibisyon ACS5-postbiyotiği ile 50 µg prebiyotik miktarında sırasıyla $17 \pm 0,00$ ve $13 \pm 1,23$ olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.17. Postbiyotik ve prebiyotiklerin *E. coli* ATCC 11229 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşlarının biyofilmlerini inhibisyon yüzdeleri.

% Biyofilm inhibisyonları Postbiyotik + prebiyotik					
Suşlar	50 µg	100 µg	150 µg	200 µg	250 µg
<i>E. coli</i> ATCC 11229	17.00±0,00	58,33±1,15	27,30±3,78	58,30±0,57	25±11,30
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	13.00±1,23	33,40±1,53	51,00±22,62	38,5±0,70	51,66±7,63



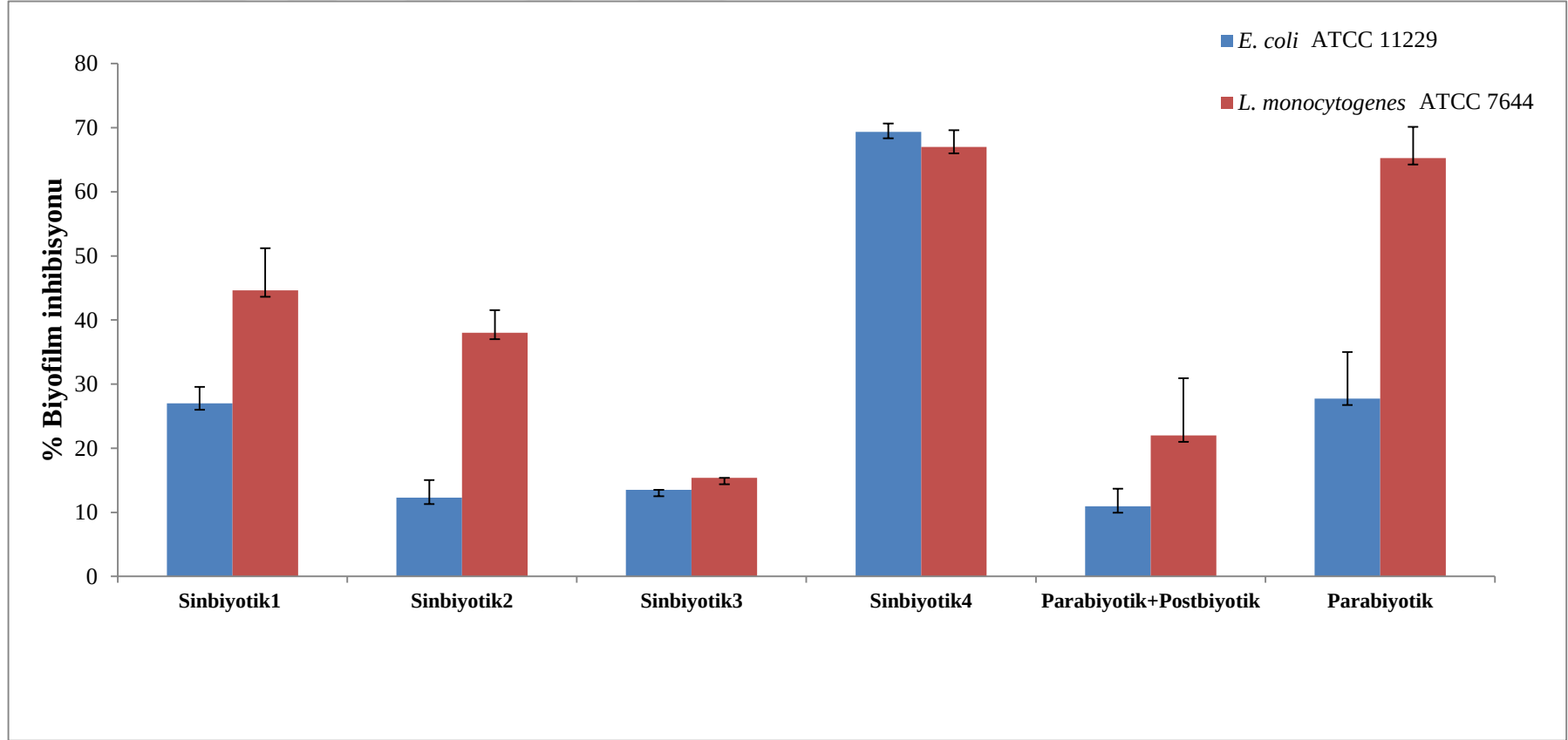
Şekil 4.23. Postbiyotik ve prebiyotiklerin birlikte *E. coli* ATCC 11229 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 patojenleri ile antibiyofilm aktivitesi.

Parabiyotikler ve parabiyotiklerle oluşturulan sinbiyotiklerin antibiyofilm aktivitesi;

Biyofilm yapma oranları Bölüm 3.2.3.2’da anlatıldığı gibi araştırılmış olan *E. coli* ATCC 11229 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 patojen bakteri suşlarının oluşturdukları biyofilmlerin parabiyotikler, parabiyotiklerin farklı miktarlardaki prebiyotik ve postbiyotikler ile kombinasyonlarının antibiyofilm aktivitesi çalışılmış ve sonuçlar izelge 4.18 ve şekil 4.24’de verilmiştir. Parabiyotiklerin, *E. coli* ATCC 11229 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 bağırsak patojenlerinin üretmiş oldukları biyofilmler üzerinde sırasıyla $27,75 \pm 7,25$ ve $65,25 \pm 4,90$ inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir. Parabiyotiklerin biyofilm inhibisyon oranlarının parabiyotik ile postbiyotik kombinasyonundan daha yüksek etkili olduğu tespit edilmiştir. Parabiyotiklerin *E. coli* ATCC 11229 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 ve patojen suşlarının üretmiş oldukları biyofilmlere karşı en yüksek inhibisyon oranları parabiyotik + 250 µg ACS5-L-EPS miktarında sırasıyla %69,37 ve %67,00 olarak belirlenmiştir. Parabiyotiklerle birlikte 75 µg ve 100 µg ACS5-L-EPS miktarlarında prebiyotikler kullanıldığında *E. coli* ATCC 11229 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 biyofilmlerine karşı inhibisyon gözlenmemiştir.

Çizelge 4.18. Parabiyotiklerin prebiyotik ve postbiyotiklerin birlikte *E. coli* ATCC 11229 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 patojenleri ile antibiyofilm aktivitesi.

Suşlar	%Biyofilm inhibisyonları <i>E. coli</i> ATCC 11229	%Biyofilm inhibisyonları <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644
Parabiyotik + 50 µg L-EPS	27 ± 2,58	44,65 ± 6,56
Parabiyotik + 75 µg L-EPS	-	-
Parabiyotik + 100 µg L-EPS	-	-
Parabiyotik + 150 µg L-EPS	12,3 ± 2,72	38 ± 3,54
Parabiyotik + 200 µg L-EPS	13,5 ± 0,00	15,4 ± 0,00
Parabiyotik + 250 µg L-EPS	69,37 ± 1,29	67 ± 2,60
Parabiyotik + Postbiyotik	10,95 ± 2,47	22,00 ± 11,91
Parabiyotik	27,75 ± 7,25	65,25 ± 4,90



Şekil 4.24. Parabiyotiklerin prebiyotik ve postbiyotiklerin birlikte (sinbiyotik) *E. coli* ATCC 11229 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 patojenleri ile biyofilm inhibisyonu.

*Sinbiyotik1: Parabiyotik + 50 µg L-EPS, Sinbiyotik2: Parabiyotik + 150 µg L-EPS, Sinbiyotik3: Parabiyotik + 200 µg L-EPS, Sinbiyotik4: Parabiyotik + 250 µg L-EPS

4.9 Probiyotik, Prebiyotik, Sinbiyotiklerin, Postbiyotik ve Parabiyotik Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

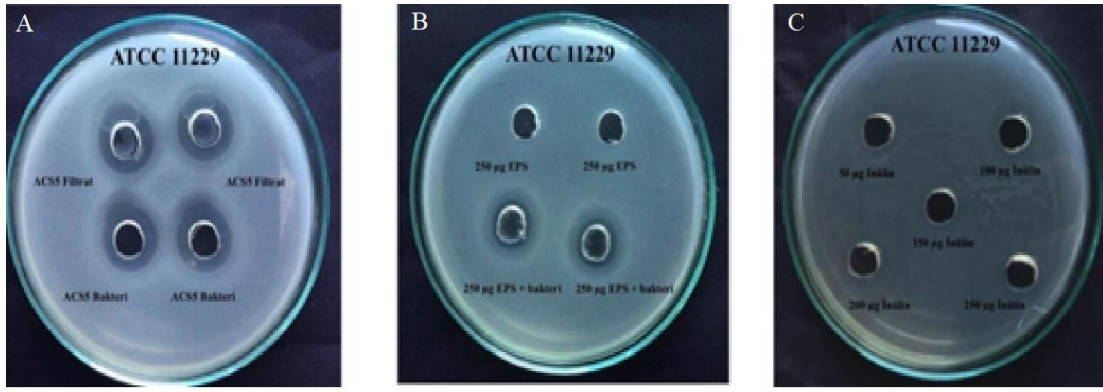
Probiyotik, prebiyotik, sinbiyotik, postbiyotik ve parabiyotiklerin antimikrobiyal etkileri Bölüm 3.2.8’ de anlatıldığı gibi belirlenmiş ve sonuçlar aşağıda verilmiştir.

Prebiyotik ve Postbiyotiklerin antimikrobiyal aktivitesi;

Postbiyotik ve prebiyotiklerin *E. coli* ATCC 11229 test bakterilerine karşı tespit edilen antimikrobiyal etkisi Çizelge 4.19’de ve Şekil 4.25’te verilmiştir. *E. coli* ATCC 11229 test bakterisine karşı en yüksek antimikrobiyal etki 150 µg prebiyotik + postbiyotik kombinasyonunda $5,61 \pm 0,021$ mm zon çapı olarak görülürken, en düşük etkinin ise 100 µg prebiyotik + postbiyotik kombinasyonunda $4,64 \pm 0,282$ mm olduğu belirlenmiştir. Postbiyotiklerle kombine edilen prebiyotiklerin farklı konsantrasyonlarının antimikrobiyal etkileri arasında farklılık tespit edilememiştir. *L. monocytogenes* ATCC 7644 test bakterisine karşı prebiyotik ve prebiyotik+postbiyotik kombinasyonlarının antimikrobiyal etkisinin olmadığı belirlenmiştir. *L. rhamnosus* ACS5’ten izole edilen L-EPS’nin *E. coli* ATCC11229 suşuna karşı antimikrobiyal etki göstermediği belirlenmiştir.

Çizelge 4.19. Postbiyotik ve Prebiyotiklerin *E. coli* ATCC 11229 suşu üzerindeki antimikrobiyal etkisi.

Postbiyotik ve Prebiyotik Kombinasyonu	Zon Çapı (mm) <i>E. coli</i> ATCC 11229
50 µg Prebiyotik + Postbiyotik	5,17±0,09
75 µg Prebiyotik + Postbiyotik	4,9±0,03
100 µg Prebiyotik + Postbiyotik	4,64±0,28
150 µg Prebiyotik + Postbiyotik	5,61±0,02
200 µg Prebiyotik + Postbiyotik	5,19±0,50
250 µg Prebiyotik + Postbiyotik	5,15±0,20



Şekil 4.25. Postbiyotik(A), prebiyotik (B) ve inülin (C) antimikrobiyal petri görüntüleri.

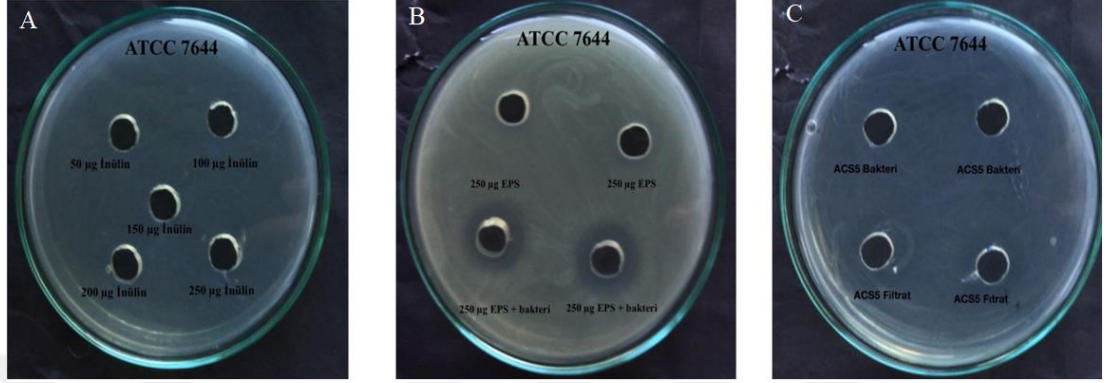
Sinbiyotiklerin Antimikrobiyal etkisi;

Probiyotik ve prebiyotiklerin farklı konsantrasyonlarının *E. coli* ATCC 11229 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 test bakterilerine karşı tespit edilen antimikrobiyal etkileri Çizelge 4.20’de ve Şekil 4.27’da verilmiştir. *E. coli* ATCC 11229 test bakterisine karşı en yüksek antimikrobiyal etki $5,85 \pm 0,021$ mm zon çapı ile 200 µg prebiyotik + probiyotik kombinasyonunda tespit edilirken en düşük aktivite 50 µg prebiyotik + probiyotik kombinasyonunda $3,76 \pm 0,183$ mm zon çapı ile gözlemlenmiştir.

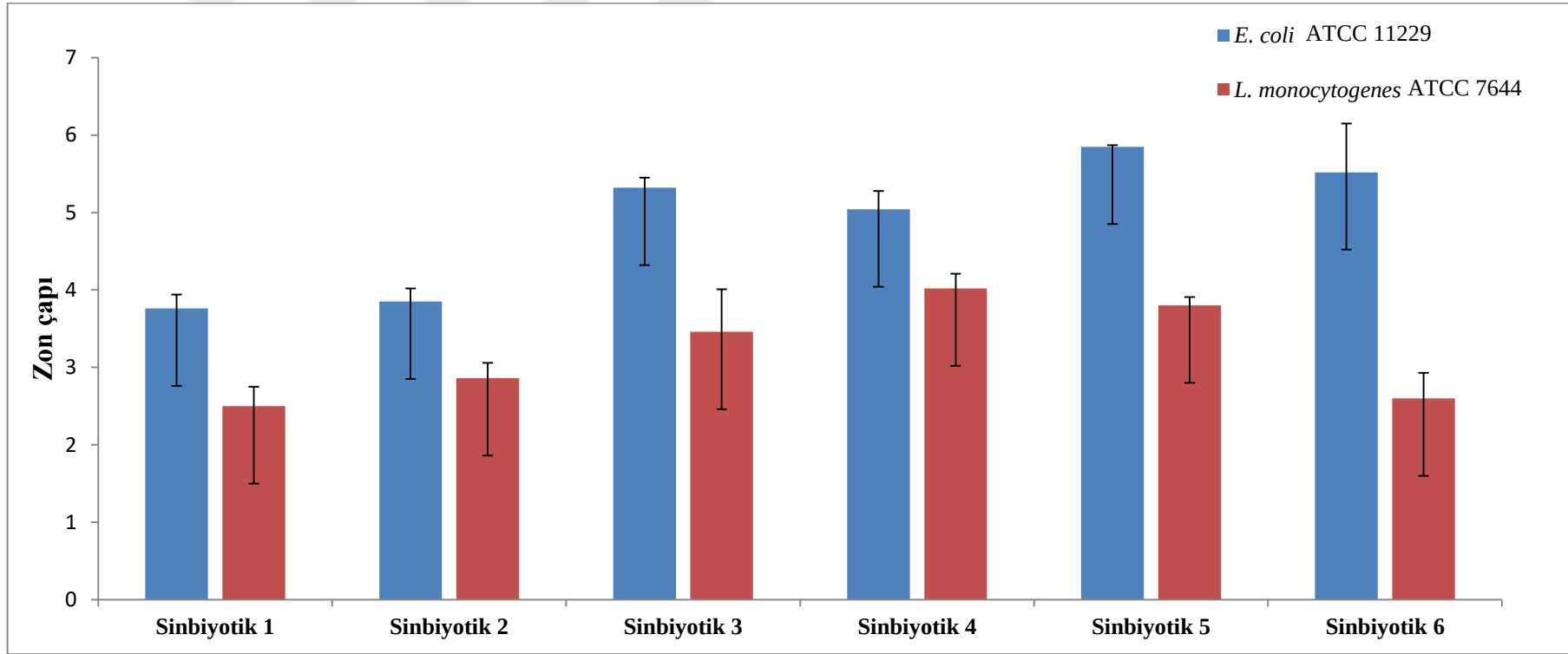
Çizelge 4.20. *E. coli* ATCC 11229 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşuna karşı probiyotik ve prebiyotik kombinasyonlarının antimikrobiyal etkisi.

Probiyotik ve Prebiyotik kombinasyonu	Zon Çapı (mm) <i>E. coli</i> ATCC 11229	Zon Çapı (mm) <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644
50 µg Prebiyotik + Probiyotik	$3,76 \pm 0,18$	$2,50 \pm 0,21$
75 µg Prebiyotik + Probiyotik	$3,85 \pm 0,18$	$2,59 \pm 0,40$
100 µg Prebiyotik + Probiyotik	$5,23 \pm 0,13$	$3,46 \pm 0,56$
150 µg Prebiyotik + Probiyotik	$5,04 \pm 0,24$	$3,71 \pm 0,22$
200 µg Prebiyotik + Probiyotik	$5,85 \pm 0,02$	$4,02 \pm 0,20$
250 µg Prebiyotik + Probiyotik	$5,52 \pm 0,64$	$2,60 \pm 0,33$

L. monocytogenes ATCC 7644 test bakterisine karşı en yüksek antimikrobiyal etki $4,02 \pm 0,197$ mm zon çapı ile 200 µg prebiyotik + probiyotik kombinasyonunda tespit edilirken, en düşük aktivite 50 µg prebiyotik + probiyotik kombinasyonunda $2,50 \pm 0,205$ mm zon çapı ile gözlemlenmiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. İnülinin (A), Prebiyotik (B) ve Postbiyotiklerin (C) *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşuna karşı antimikrobiyal etkileri.



Şekil 4.27. Sinbiyotiklerin *L. monocytogenes* ATCC 7644 ve *E. coli* ATCC 11229 patojenleri ile antimikrobiyal aktivitesi.

*Sinbiyotik1: Probiyotik + 50 µg L-EPS, Sinbiyotik2: Probiyotik + 75 µg L-EPS, Sinbiyotik3: Probiyotik + 100 µg L-EPS, Sinbiyotik4: Probiyotik + 150 µg L-EPS, Sinbiyotik5: Probiyotik + 200 µg L-EPS, Sinbiyotik6: Probiyotik + 250 µg L-EPS

Parabiyotiklerin ve parabiyotik+prebiyotik kombinasyonlarının *L. monocytogenes* ATCC 7644 ile *E. coli* ATCC 11229 test bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitesinin olmadığı belirlenmiştir.



5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Bir prebiyotiğin sağlık veya patolojik koşulları etkileyen konakçı mikrobiyotasını nasıl modüle ettiğini anlamak için, mikrobiyota ve mikrobiyom kavramlarının yanı sıra dinamikleri ve homeostazı sürdürmedeki işlevi ile ilgili bazı yönlerinin belirlenmesi de önemlidir (Numa vd., 2020).

İnsan vücudu (örneğin cilt, akciğerler, vajina, ağız boşluğu ve gastrointestinal sistem) bakteri, arke, mantar, protozoa, virüs ve diğer mikroplar dahil trilyonlarca mikroorganizma tarafından kolonize edilir (Mohajeri vd., 2018; Schwiertz ve Rusch, 2016). Yüksek verimli meta-omik teknolojileri sayesinde, insan mikrobiyotası, zamanımızın en dinamik araştırma alanlarından birinin odak noktası olmuştur ve çalışmalar genellikle mikrobiyal topluluklar ile özellikle bakterileri barındıran gastrointestinal sisteme yöneliktir (Baliou vd., 2019; Lee vd., 2018; Schmidt vd., 2018). Her bireyin 1000 ila 1150 yaygın bakteri türünden oluşan bir konsorsiyumdan en az 160 mikrobiyal tür barındırdığı tahmin edilmektedir (Ley vd., 2006; Marchesi, 2011; Qin vd., 2010). Bu mikrobiyal türlerin metabolik süreçlerimiz tarafından gerçekleştirilemeyecek önemli metabolik işlevleri sağladığı kabul edilmektedir (Jia vd., 2008). Bu nedenle, genel mikrobiyota çeşitliliği de prebiyotiklerin etkilerinin değerlendirilmesinde önemli bir faktör olabilmektedir. Diyet prebiyotiklerinin bağırsaktaki faydalı bakteriler tarafından parçalanması ve metabolizması, "ana bileşikler" metabolize edemeyen diğer bakteri grupları için substrat sağlayan birincil bozunduruculara büyük fayda sağlar. Konak sağlığını korumak, eski haline getirmek veya iyileştirmek için yararlı olabilecek metabolitler üretmeyi veya bakteri popülasyon boyutunu (besin rekabeti ve/veya pH'daki değişiklikler) düzenlemeyi amaçlayan spesifik bağırsak bakterilerini (yeterli substrat kullanarak) modüle etmenin mükemmel bir şekilde mümkün olduğu anlamına gelmektedir (Mohajeri vd., 2018). Ayrıca, prebiyotiklerle sistemik inflamasyonu azaltmanın, karaciğer dokusundaki oksidatif ve inflamatuvar streslerdeki belirgin düşüşlerle önemli ölçüde ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Chung vd., 2017).

Mikroorganizmalardan türetilen birkaç potansiyel prebiyotik polisakkarit bildirilmiştir (Kook vd., 2019; Salazar vd., 2016). Mikrobiyal polisakkaritler arasında, LAB tarafından üretilen salınan ekzopolisakkarit (r-EPS), bu mikroorganizmaların gıda uygulamalarında uzun geçmişleri ile birlikte GRAS olarak kabul edilmeleri nedeniyle

artan ilgi görmüştür (Li vd., 2014; Zhou vd., 2019). r-EPS, bileşimleri ve biyolojik işlevleri bakımından farklılık gösteren uzun zincirli, yüksek moleküler ağırlıklı (Mw) polisakkaritlerin çeşitli bir grubudur (Ryan vd., 2015). EPS üreten suşların sağlık yararları, kısmen bu biyopolimerlerin biyolojik aktiviteleriyle ilgilidir. r-EPS'nin insan sağlığına katkıda bulunabilmesinin bir yolu da prebiyotikler gibi davranmasıdır (Yıldız vd., 2018). Yapılan bazı çalışmalarda, LAB'den türetilen r-EPS'nin potansiyel prebiyotikler olarak kullanımı gösterilmiştir. Bu çalışmalarda, prebiyotik olarak r-EPS'nin bakterilerle fermantasyonu sonucunda gaz üretilmemesi ve r-EPS, yapışkan özellikleri nedeniyle diğer prebiyotik türlerinden daha uzun süre kalın bağırsakta kalabilmesi gibi r-EPS kullanımının birçok avantajı olabileceği bildirilmiştir (Leivers vd., 2011; Van Hung vd., 2019; Wang vd., 2010). r-EPS'nin karmaşık molekül yapısı nedeniyle, yapılan *in vitro* fermantasyon çalışmalarında substrat olarak r-EPS karışımlarının prebiyotik aktivitesi ölçülmüştür (Salazar vd., 2016; van Bueren vd., 2015). r-EPS çeşitli fraksiyonlar içerdiğinden, hangi fraksiyonun bağırsak bakterileri tarafından seçici olarak fermente edildiğini değerlendirmek için EPS'nin fraksiyonlarının ayrıştırılması gerekmektedir. Ayrıca her bir r-EPS fraksiyonunun fermente edilme hızı da belirsizdir. Bu nedenle, biyolojik etkilerin belirli r-EPS fraksiyonlarına tespit etmek için EPS'nin izolasyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonun yapılması gerekmektedir. EPS'lerin karakterize edilmesi ile belirli bakterilerin bu karbon kaynaklarını metabolize etme kapasitesi hakkındaki bilgilerde artacaktır.

Bu tez kapsamında *L. rhamnosus* ACS5 suşundan elde edilen L-EPS'nin prebiyotik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla potansiyel probiyotik suşlar tarafından fermente edilebilirliği araştırılmıştır. Das vd. (2014) *Lactobacillus plantarum* DM5'ten izole edilen Glukan-DM5'in, *L. plantarum* DM5, *L. acidophilus* NRRL B-4496 ve *Bifidobacterium infantis* NRRL B-41661 suşları tarafından fermente edilerek canlılıklarının *L. plantarum* DM5'de $6,09 \pm 0,05$ 'ten $9,00 \pm 0,03$ logkob/mL'ye, *L. acidophilus* NRRL B-4496 'de log $6,25 \pm 0,11$ 'ten $7,83 \pm 0,04$ kob/mL'ye ve *L. acidophilus* NRRL B-4496 suşunda ise log $6,27 \pm 0,05$ 'ten $7,96 \pm 0,02$ kob/mL'ye çıkararak gelişimlerini uyardığını bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar ayrıca Glukan-DM5'in ticari prebiyotik inülin gibi *E. coli* ve *Enterobacter aerogenes*'in gelişmesini desteklemediğini tespit etmişlerdir. İnsan anne sütünden izole edilen *E. faecalis* EJRM152 suşundan elde edilen EPS'nin bifidobakterilerin büyümesini teşvik

edebildiğini ve gıda bileşeni olarak kullanılabilirliğini göstererek potansiyel bir prebiyotik adayı olabileceklerini önermişlerdir (Kansandee vd., 2019). Pan vd. (2020), *Leuconostoc pseudomesenteroides* XG5'ten elde edilen EPS XG5-EPS'nin dışkı mikrobiyotası tarafından kullanılabilirliğini, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium*'un çoğalmasını uyarabildiğini göstermişlerdir. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* SRFM-1'den elde edilen r-EPS fraksiyonlarının prebiyotik potansiyellerinin değerlendirilmesi amacıyla tek karbon kaynağı olarak saflaştırılmış r-EPS'ler kullanılarak 12 kültüre (9 laktobasil, 1 *Streptococcus* ve 2 gıda kaynaklı patojenik *E. coli* suşu) karşı fermentasyon deneyleri yapılmış, tüm r-EPS fraksiyonlarının yararlı bakterilerin büyümesini ve aktivitesini uyarabilirken gıda kaynaklı patojenik bakterilerin büyümesini engelleyebildiğini belirlemişlerdir (Tang vd., 2020). *L. rhamnosus* ZFM231' den saflaştırılmış olan dört farklı EPS fraksiyonunun insan bağırsak florası üzerindeki düzenleyici etkileri, glikoz ile karşılaştırmalı bir *in vitro* simüle edilmiş bağırsak modeli kullanılarak değerlendirilmiş ve yapılan çalışmada saflaştırılan EPS bileşenlerinin bağırsak mikroorganizmaları tarafından etkin bir şekilde bozunduğu ve kullanıldığını bildirilmiştir (Zhu vd., 2021). Yapılan bu çalışmada, karbon kaynağı çıkartılan besiyerlerine aynı oranda L-EPS eklenerek potansiyel probiyotik mikroorganizmaların L-EPS'nin fermentasyonu araştırılmıştır. Das vd. (2014)'inyapmış oldukları çalışmaya benzer şekilde çalışmamızda *L. rhamnosus* ACS5 suşundan elde edilen L-EPS'nin potansiyel probiyotik mikroorganizmalar, *L. rhamnosus* EDS4 ($9,40 \pm 0,51 - 9,96 \pm 0,21$ log kob/mL), *P. acidilactici* 5008 ($9,54 \pm 0,21 - 10,43 \pm 0,27$) ve *S. cerevisia* BD21 ($9,97 \pm 0,09 - 10,09 \pm 0,25$ log kob/mL) suşları tarafından fermentasyona bağlı olarak canlılık oranlarının arttığı belirlenmiştir. Literatürde incelenen probiyotik mikroorganizmaların EPS fermentasyon sonuçları ile karşılaştırıldığında benzer etki *L. rhamnosus* ACS'5 suşundan elde etmiş olduğumuz L-EPS'de de görülmüştür. Ayrıca ticari bir prebiyotik olan inülinle karşılaştırıldığında L-EPS'nin test edilen potansiyel probiyotik suşlar tarafından daha iyi fermente edilerek gelişimlerini uyardığı belirlenmiştir. *L. rhamnosus* EDS4, *P. acidilactici* 5008 ve *S. cerevisia* BD21 suşlarının geliştirilmesinde glikoz ve inülin yerine L-EPS'nin kullanılabilirliği belirlenmiştir.

Prebiyotik aktivitenin belirlenmesi için test edilen belirli bir substratın probiyotik olmayan mikroorganizmalar tarafından kullanılmaması ve prebiyotik olmayan glikoz

substratı kadar probiyotik suşların gelişmesini desteklediğinin gösterilmesi gerekmektedir. Karbonhidratlar, probiyotik tarafından metabolize edilip diğer enterik bakteriler tarafından metabolize edilmedikleri takdirde, pozitif bir prebiyotik aktivite skoru gösterebilmektedir. Bu nedenle ACS5-L-EPS'nin potansiyel probiyotik mikroorganizmalar ve bağırsak patojenleri tarafından fermentasyonları araştırılarak prebiyotik aktivite skorları belirlenmiştir. Das vd. (2014) yaptıkları çalışmada *L. plantarum* DM5'ten izole edilen Glukan-DM5'in, 0,45 ila 0,6 arasında bir prebiyotik skor tespit etmişlerdir. Bu araştırmacılar Glukan-DM5 ile en yüksek prebiyotik skoru *L. plantarum* DM5 suşunda (0,66) tespit ederken, *B. infantis*' de prebiyotik skoru 0,55, *L. acidophilus*' de ise 0,45 olarak belirlemişlerdir. Bu prebiyotik skor aktivitelerinin kontrol olarak inulin kullanıldığında *L. plantarum* DM5, *B. infantis* ve *L. acidophilus* da sırasıyla 0,65, 0,68 ve 0,60 olarak belirlenmiştir. Baruah vd. (2017) yapmış oldukları çalışmada *Weissella cibaria* RBA12'den izole edilen Dextran-RBA12'nin 0,3 (*L. acidophilus* NRRL B-4495), 0,42 (*B. bifidum* NRRL 41410), 0,38 (*B. infantis* NRRL B-41661), 0,26 (*L. plantarum* DM5) ve 0,42 (*B. animalis* NRRL 41405) prebiyotik skor gösterdiğini bildirilmiştir. Bu araştırmacılar kontrol olarak inulin kullandıklarında inulinin genel olarak prebiyotik skorunun test edilen bakterilerde yüksek olduğunu ancak test bakteri olarak *B. bifidum* NRRL 41410 kullandıklarında inulinin prebiyotik skor aktivitesinin (0,33) Dextran-RBA12'den düşük olduğunu gözlemlemişlerdir. Yapmış olduğumuz çalışmada *L. rhamnosus* ACS5 suşundan elde edilen L-EPS'nin *L. rhamnosus* EDS4 ve *P. acidilactici* 5008 karşı denenen bütün patojen gruplarında ve karışık kültürdeki prebiyotik aktivite skorunun literatürde yer alan çalışmalarla karşılaştırıldığında genel olarak yüksek olduğu belirlenmiştir. Literatürde yer alan çalışmalardan farklı olarak çalışmamızda prebiyotik skor aktivitesi 48. saatlik inkübasyon sonrası elde edilen canlılık koloni sayısına göre değerlendirilmiştir. *P. acidilactici* 5008'de 48. saatteki prebiyotik skor aktivitesi denenen bütün patojenler ve karışık kültürde 24. saate göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. *S. cerevisiae* BD21 suşunda 24. saatte sadece *E. faecalis* patojeni ile belirlenirken 48. saatte denenen bütün patojen gruplarında prebiyotik skor aktivitesi gözlemlenmiştir. Ayrıca *S. cerevisiae* BD21 suşunda prebiyotik skor aktivitesi 48. saatte gözlemlenirken, inulin içeren besi ortamında bu maya suşunun herhangi bir skor aktivitesi göstermediği tespit edilmiştir. *P. acidilactici* 5008 bakterisi ve *S. cerevisiae* BD21 maya suşlarının 24 ve 48. saatteki prebiyotik skor aktiviteleri ilk defa bu

çalışmada belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlarla literatüre katkı sağlayacağımızı düşünmekteyiz.

Bir substratın prebiyotik olarak nitelendirilmesi için, bağırsak mikroflorasından yararlı mikropların büyümesini seçici olarak uyarmanın yanı sıra mide enzim hidrolizine, mide sindirimine direnç ve mide-bağırsak absorpsiyonuna toleranslı olması gerekmektedir (Peredo vd., 2020). Bu amaç doğrultusunda midedeki sindirimin günün değişik zamanlarında pH ve sindirim sürecinin değişmesi göz önüne alınarak L-EPS'nin farklı zaman (0,5, 1, 2, 3, 4 ve 5. saat) aralıkları ve pH'larda (1, 2, 3, 4 ve 5) mide asidinde yüzde hidrolizi belirlenmiştir. Devi vd. (2021) yaptıkları çalışmada EPS'nin mide suyu ile hidrolizinin inkübasyon süresinin artmasıyla kademeli olarak önemli ölçüde arttığını, 6 saatlik inkübasyondan sonra pH 1, 2, 3 ve 4'te sırasıyla %1,63, %0,88, %0,75, %0,26 oranında hidroliz olduğunu ve EPS'nin neredeyse %98,4'ünün hidrolize olmadığını göstermişler. Bu araştırmacılar test ettikleri EPS'nin hidrolizini, kontrol olarak FOS ve galaktan prebiyotiklerinin hidrolizi ile karşılaştırdıklarında (pH 1, 2, 3 ve 4' te 6 saat sonra %5,02, %3,94, %1,56, %0,66) bu prebiyotiklerin hidrolizinin test edilen EPS'den daha yüksek olduğunu bildirilmiştir (Devi vd., 2021). *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1426'dan üretilen dekstranın, ticari prebiyotik inülin ile karşılaştırıldığında simüle edilmiş insan mide suyu ile önemli ölçüde daha düşük sindirilebilirlik sergilediği bildirilmiştir. Dekstran ve inülinin hidroliz yüzdesi, inkübasyon süresinin artmasıyla ve simüle edilmiş insan mide suyunun pH'ının düşmesiyle arttığı ve 6. saatten sonra dekstranın maksimum hidrolizi pH 1, 2, 3 ve 4'te sırasıyla %0,92, %0,60, %0,44 ve %0,23 iken, inülinin aynı pH'larda %27,7, %21,6, %3,7 ve %1,5 oranlarında hidroliz gösterdiğini bildirilmiştir (Kothari vd., 2015). Mevut çalışmalarla benzer şekilde yapmış olduğumuz çalışmada *L. rhamnosus* ACS5 suşundan elde edilen ACS5-L-EPS'nin inkübasyon süresinin artmasıyla hidroliz oranında kademeli olarak önemli ölçüde arttığı ve çalışılan farklı pH'daki mide sıvılarının tamamında 5. saat sonunda inülin ve ACS5-L-EPS için en yüksek hidroliz değerleri elde edilmiştir. Farklı pH'daki mide sıvısı ve inkübasyon sürelerinde ACS5-L-EPS ve inulinin (kontrol grubu) hidrolizlerinde anlamlı farklılıklar olduğu tespit edilmiştir ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$). Ticari bir prebiyotik olan inülin ile kıyaslandığında ACS5-L-EPS'nin mide asidinde hidrolizinin daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda

ACS5-L-EPS'nin tüketimi sonucunda mide asidinden geçerek bağırsakta bulunan yararlı mikroorganizmalar tarafından fermente edilebileceği önerilebilir.

Biyofilmler, hücrelerin sıklıkla birbirine ve/veya bir yüzeye yapışan, kendi ürettiği hücre dışı polimerik maddelerden (EPS) oluşan bir matris içine gömüldüğü mikroorganizma kümeleri olarak tanımlanmıştır. Mikroorganizmalar biyofilm içinde işbirlikçi bir şekilde yaşarlar (Costerton vd., 1995). Planktonik yaşam tarzından farklı olarak, biyofilmler; çevresel, kimyasal ve mekanik streslere karşı koruma sağlamaktadır. Matris, bakteriler arasındaki boşluğu doldurarak mekanik bir kohezyon stabilitesi üretir. Bu stabilite sayesinde biyofilmlere gömülü mikroorganizmalar yüksek bir hayatta kalma potansiyeline sahip olmaktadır (Azeredo vd., 2017). Patojenik mikroorganizmalar tarafından biyofilm oluşumunun, antibiyotik tedavisine dirençleri ve kronik enfeksiyon gelişimine neden olduğu için önemli olduğu bildirilmiştir (Kavitate vd., 2016). Bu nedenle çalışmamızda bağırsak patojenleri tarafından oluşturulan biyofilmlere karşı L-EPS (prebiyotik), postbiyotik, parabiyotik ve sinbiyotiklerin etkileri araştırılmıştır. Kavita vd. (2014) yapmış oldukları çalışmada değişen EPS konsantrasyonlarının *S. aureus* suşuna karşı antibiyofilm potansiyelini araştırdıklarında artan EPS konsantrasyonlarında *S. aureus* 'un biyofilm oluşumlarının önemli ölçüde inhibe olduğunu belirlemişlerdir. Bu araştırmacılar maksimum inhibisyonu (%62,3) 175 µg/mL EPS konsantrasyonunda tespit ederken, daha yüksek EPS konsantrasyonunda (200 µg/mL) inhibisyonunda daha fazla artış olmadığını bildirilmiştir. *E. faecium* MC13'ten elde edilen EPS'nin farklı konsantrasyonlarının (0,2, 0,6 ve 1 mg/mL) *L. monocytogenes*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* ve *S. aureus* test bakterilerinin biyofilm oluşumlarının inhibisyonu araştırıldığında, optimum inhibisyon 1 mg/mL EPS konsantrasyonunda tespit edilmiştir (Kanmani vd., 2013). Rajoka vd. (2018) yapmış oldukları çalışmada, *L. rhamnosus*'tan izole edilen EPS117'nin 5 mg/mL konsantrasyonda *E. coli* suşuna karşı %28,4 biyofilm inhibisyonuna sahip olduğunu bildirmiştir. Mahdhi vd. (2017), *L. plantarum*'dan izole edilen EPS EPLB'nin, Gram negatif bakteriler: *P. aeruginosa* ve *S. typhimurium* ile Gram pozitif bakteriler: *S. aureus* ve *L. monocytogenes* üzerinde test ettiklerinde antibiyofilm etkisinin konsantrasyona bağlı olduğunu göstermişlerdir. Peng vd. (2020) çalışmasında EPS'nin *S. aureus*, *S. typhimurium* ve *E. coli* O157:H7'nin üretmiş oldukları biyofilmleri sırasıyla $30,2 \pm 3,3$ %, $14,3 \pm 0,6$ % ve $16,9 \pm 5,4$ % oranlarında inhibe edebildiğini tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmada L-EPS'nin Gram

negatif (*E. coli* ATCC 11229) ve Gram pozitif (*L. monocytogenes* ATCC 7644) bakterilerinin biyofilmlerine etkisi değerlendirilmiş ve L-EPS'nin antibiyofilm etkisinin Gram negatif bakteride daha etkili olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında ACS5-L-EPS'nin daha düşük miktarlarının, *L. monocytogenes* ATCC 7644 (150 µg/mL- %41,70±0,00) ve *E. coli* ATCC 11229 (150 µg/mL- 63,84±4,99) test bakterilerinin biyofilmlere karşı daha yüksek biyofilm inhibisyon etkisi göstermiştir. Yapılan çalışmalardan farklı olarak *L. rhamnosus* ACS5 suşundan elde edilen parabiyotik, postbiyotik ve bunların kombinasyonlarının antibiyofilm aktiviteleri denenmiştir. *L. rhamnosus* ACS5'ten elde edilen postbiyotiklerin antibiyofilm aktivitesinin *E. coli* ATCC 11229 suşuna karşı %20,3±11,17 iken *L. monocytogenes* 7644 suşuna karşı %10,95±4,03 oranında olduğu gözlemlenmiştir. Postbiyotik ve prebiyotik kombinasyonlarının antibiyofilm aktivitesi *E. coli* ATCC 11229 suşunun biyofilmlerine karşı 200 µg konsantrasyonda %58,30±0,57 ve *L. monocytogenes* 7644 suşunun üretmiş olduğu biyofilmlere karşı 250 µg konsantrasyonda %51,66±7,63 olarak belirlenmiştir. Parabiyotiklerin, *E. coli* ATCC 11229 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 bağırsak patojenlerinin üretmiş oldukları biyofilmler üzerinde sırasıyla %27,75 ± 7,25 ve %65,25 ± 4,90 inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir. Yaptığımız çalışmada L-EPS'nin gram negatif (*E. coli* ATCC 11229) ve gram pozitif (*L. monocytogenes* ATCC 7644) bakterilerinin biyofilmlerine etkisi değerlendirilmiş ve L-EPS'nin antibiyofilm etkisinin gram negatif bakterilere daha etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca ACS5-L-EPS'nin farklı miktarlarının antibiyofilm etkisi 150 µg/mL miktara kadar artış göstermiş ancak yüksek miktarlarda belirgin bir artış gözlemlenememiştir. Yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında (Rajoka vd., 2018; Kanmani vd., 2013) ACS5-L-EPS'nin daha düşük miktarlarının, *L. monocytogenes* ATCC 7644 (150 µg/mL - % 41,70±00) ve *E. coli* ATCC 11229 (150 µg/mL- 63,84±4,99) test bakterilerinin biyofilmlere karşı biyofilm inhibisyonunun bu çalışmalardan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Probiyotik ve prebiyotiklerin antibiyofilm aktivitesi daha önce yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (Stefania vd., 2017). Bu araştırmalardan farklı olarak çalışmamızda ayrıca *L. rhamnosus* ACS5 suşundan elde edilen parabiyotik, postbiyotik ve bunların kombinasyonlarının antibiyofilm aktivitelerini belirledik. *L. rhamnosus* ACS5'ten elde edilen postbiyotiklerin antibiyofilm aktivitesinin *E. coli* ATCC 11229 suşuna karşı %20,3±11,17 iken *L. monocytogenes* 7644 suşuna karşı %10,95±4,03 oranında olduğu gözlemlenmiştir.

Postbiyotik ve prebiyotik kombinasyonlarının antibiyofilm aktivitesi *E. coli* ATCC 11229 suşunun biyofilmlerine karşı 200 µg miktarda %58,30±0,57 ve *L. monocytogenes* 7644 suşunun üretmiş olduğu biyofilmlere karşı 250 µg miktarda %51,66±7,63 olarak belirlenmiştir. Parabiyotiklerin, *E. coli* ATCC 11229 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 bağırsak patojenlerinin üretmiş oldukları biyofilmler üzerinde sırasıyla %27,75 ± 7,25 ve %65,25 ± 4,90 inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir. Antibiyofilm aktivite sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde *L. rhamnosus* ACS5 suşundan elde edilen prebiyotik, parabiyotik, postbiyotik ve bunların kombinasyonlarının *E. coli* 11229 ve *L. monocytogenes* 7644 suşlarının oluşturdukları biyofilmlere karşı antibiyofilm aktivitelerinin olduğu ve bu etkilerin konsantrasyona bağlı olduğu belirlenmiştir.

EPS'nin antimikrobiyal etkisi üzerine yapılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Nehal vd. (2019) yapmış oldukları çalışmada *Lactococcus lactis*'ten izole edilen EPS'nin test edilen dokuz patojen suşa (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae* ve *Candida albicans* karşı güçlü bir inhibitör aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Abadi vd. (2018) laktik asit bakterilerinden elde edilen EPS'nin, *E. coli*, *E. faecalis* ve *L. monocytogenes*'e karşı antibakteriyel aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. *Aspergillus* sp. DHE6 suşundan kısmen saflaştırılmış EPS'lerin, *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, ve *P. aeruginosa* test bakterilerine antimikrobiyal etkisini araştırıldığında, artan EPS konsantrasyonlarında test edilen patojenlere karşı antibakteriyel aktivite belirlenirken, maya ve mantar suşlarına karşı inhibisyon etkisi gözlenmemiştir (Ghonemy, 2021). Rojaka vd. (2018)'de yapmış oldukları çalışmada agar kuyu difüzyon yöntemi ile test edilen iki farklı EPS'nin (EPS-lr ve EPS-lvg) indikatör mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisi araştırdıklarında, EPS-lr ve EPS-lvg'nin sırasıyla *S. typhimurium* CMCC 50115 (14,0 ± 1,5 mm ve 15,0 ± 0,6 mm), *S. petrasii* subsp. *pragensis* KY196531 (12,2 ± 0,9 mm ve 9,5 ± 1,4 mm) ve *E. coli* ATCC 25922 (13,5 ± 0,8 mm ve 10,6 ± 0,5 mm) bakterilerine karşı inhibisyon etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında *L. rhamnosus* ACS5'ten izole edilen L-EPS'nin *E. coli* ATCC11229 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşuna karşı antimikrobiyal etki göstermediği belirlenmiştir. Çalışmamızda ACS5-L-EPS'lerin yapısının karbonhidrat olmasından dolayı antimikrobiyal etki göstermememiştir.

Yapılan çalışmalarda (Rojaka vd., 2018) görülen antimikrobiyal etkinin ise EPS'nin yapısında bulunan yan gruplardan kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Postbiyotikler, probiyotiklerden bir fermantasyon süreciyle üretilen ve/veya laboratuvar ölçeğinde saf formda üretilen çok çeşitli biyoaktif bileşiklerdir. Probiyotikler tarafından üretilen çözünür bileşiklerin belirlenmesi, canlı bakterilerin verilmesi ile ilişkili riskleri önleyeceğini ve etkili yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için bir fırsat temsil edebileceği düşünülmektedir. Bu kapsamda *L. rhamnosus* ACS'ten elde edilen postbiyotiklerin bağırsak patojen mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. *L. casei*'nin süpernatantının, agar-kuyu testi ile *Shigella sonnei* ve *Shigella flexneri* test bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivite gösterirken, süpernatantın pH'sı 7'ye ayarlandığında antimikrobiyal aktivitenin ortadan kalktığı bildirilmiştir (Mirnejad vd., 2013). *L. plantarum*'dan elde edilen postbiyotiklerinin *L. monocytogenes* LS55, *P. acidilactici* 446, *E. coli* E-30 ve *Salmonella enterica* CS3 karşı antimikrobiyal etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir (Chang vd., 2021). Moradi vd. (2019)'nin yapmış oldukları çalışmada *L. acidophilus* LA5, *Lactobacillus casei* 431, ve *Lactobacillus salivarius*'tan elde edilen postbiyotiklerin *L. monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal etkisinin olduğunu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalardan farklı olarak çalışmamızda farklı konsantrasyonlarda postbiyotik ve prebiyotiklerin kombinasyonları ile sinbiyotiklerin (probiyotik ve prebiyotik), *E.coli* ATCC 11229 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 patojenlerine karşı antimikrobiyal etkisi değerlendirilmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada *E. coli* ATCC 11229 suşuna karşı en yüksek antimikrobiyal etki 150 µg prebiyotik + postbiyotik kombinasyonunda 5,61±0,021 mm zon çapı ile görülürken bu oran sinbiyotiklerde 5,85± 0,021 mm zon çapı ile 200 µg prebiyotik + probiyotik kombinasyonunda tespit edilmiştir. Sinbiyotiklerle *L. monocytogenes* ATCC7644 test bakterisine karşı en yüksek antimikrobiyal etki 4,02±0,197 mm zon çapı ile 200 µg prebiyotik + probiyotik kombinasyonunda tespit edilmiştir. Prebiyotik+postbiyotik kombinasyonlarının antimikrobiyal etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca Parabiyyotiklerin ve parabiyyotik+prebiyyotik kombinasyonlarının da *E. coli* ATCC 11229 ile *L. monocytogenes* ATCC 7644 test bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitesinin olmadığı belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda;

- *L. rhamnosus* ACS5 suşundan izole edilip liyofilize hale getirilen ACS5-L-EPS'nin potansiyel probiyotik mikroorganizmalar tarafından fermente edilebildiği,
- *L. rhamnosus* ACS5 suşundan elde edilen ACS5-postbiyotiğinin potansiyel probiyotik mikroorganizmalar tarafından fermente edilebildiği,
- ACS5-L-EPS'nin bağırsak patojen mikroorganizmaları tarafından fermente edilemediği,
- ACS5-L-EPS ve ACS5-postbiyotiklerin potansiyel probiyotik mikroorganizmaların gelişimi düzenleyici etkilerinin olduğu,
- ACS5-L-EPS'nin *L. rhamnosus* EDS4 ve *P. acidilactici* 5008 suşunun prebiyotik skor akvitesinin ticari bir prebiyotik olan inülinle benzer etki gösterirken, *S. cerevisiae* BD21 suşu üzerinde daha yüksek etki gösterdiği,
- ACS5-L-EPS'nin mide asidinde inülinde daha az hidroliz olduğu belirlenmiştir.

Bu sonuçlar doğrultusunda bir gıda bileşeninin prebiyotik olarak sınıflandırılması için gereken özelliklerin ACS5-L-EPS'de belirlendiğinden, *L. rhamnosus* ACS5'ten elde edilen ACS5-L-EPS'nin prebiyotik olarak ticari prebiyotiklere alternatif olarak kullanılabileceği öngörülmüştür.

Probiyotik, prebiyotik, postbiyotik ve parabiyoitiklerin *E. coli* ATCC 11229 Gram negatif bakterilerin biyofilm oluşumlarına antibiyofilm etkisinin yüksek olmasından dolayı, *L. rhamnosus* ACS5'ten elde edilen ACS5-L-EPS'nin sağlık ve gıda alanlarında antibiyofilm ajanı olarak kullanılabilmek potansiyeli bulunmaktadır. ACS5-L-EPS'nin test bakterilerine karşı antimikrobiyal etkisinin olmadığı ancak probiyotik suşla birlikte *E. coli* ATCC 11229' antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir. *L. rhamnosus* ACS5'ten elde edilen ACS5-L-EPS'nin probiyotiklerle birlikte sinbiyotik kombinasyonun *in vivo* olarak test edildikten sonra intestinal sistem düzensizliklerinin tedavisinde kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Bu çalışmada prebiyotik özellik gösteren ACS5-L-EPS'nin bu çalışmanın devamında yapılması planlanan hayvan deneyleri ile ACS5-L-EPS'nin gıdalara eklenerek fonksiyonel gıdaların geliştirilmesi mümkün olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abdolalipour, E., Mahooti, M., Salehzadeh, A., Torabi, A., Mohebbi, S. R., Gorji, A. ve Ghaemi, A., 2020. Evaluation of the antitumor immune responses of probiotic *Bifidobacterium bifidum* in human papillomavirus-induced tumor model, *Microbial pathogenesis*, 145, 104207.
- Adams, C. A. 2010. The probiotic paradox: Live and dead cells are biological response modifiers, *Nutrition Research Reviews*, 23(1), 37–46.
- Alander, M., Mättö, J., Kneifel, W., Johansson, M., Kögler, B., Crittenden, R. ve Saarela, M., 2001. Effect of galacto-oligosaccharide supplementation on human faecal microflora and on survival and persistence of *Bifidobacterium lactis* Bb-12 in the gastrointestinal tract, *International Dairy Journal*, 11(10), 817–825.
- Albermann, C., Piepersberg, W. ve Wehmeier, U. F., 2001. Synthesis of the milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose using recombinant bacterial enzymes, *Carbohydrate Research*, 334(2), 97–103.
- Al-Sheraji, S. H., Ismail, A., Manap, M. Y., Mustafa, S., Yusof, R. M. ve Hassan, F. A., 2013. Prebiotics as functional foods: A review. *Journal of functional foods*, 5(4), 1542–1553.
- Arciola, C. R., Campoccia, D. ve Montanaro, L., 2002. Detection of biofilm-forming strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus*, *Expert review of molecular diagnostics*, 2(5), 478–484.
- Badel, S., Bernardi, T. ve Michaud, P., 2011. New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides, *Biotechnology Advances*, 29(1), 54–66.
- Baines, F. L., Billingham, N. C. ve Armes, S. P., 1996. Synthesis and solution properties of water-soluble hydrophilic–hydrophobic block copolymers, *Macromolecules*, 29(10), 3416–3420.
- Balan, B., Dhaulaniya, A. S., Varma, D. A., Sodhi, K. K., Kumar, M., Tiwari, M. ve Singh, D. K., 2021. Microbial biofilm ecology, in silico study of quorum sensing receptor-ligand interactions and biofilm mediated bioremediation, *Archives of Microbiology*, 203(1), 13–30.
- Baliou, S., Adamaki, M., Spandidos, D. A., Kyriakopoulos, A. M., Christodoulou, I. ve Zoumpourlis, V., 2019. The microbiome, its molecular mechanisms and its potential as a therapeutic strategy against colorectal carcinogenesis, *World Academy of Sciences Journal*, 1(1), 3–19.
- Bernat, N., Cháfer, M., González-Martínez, C., Rodríguez-García, J. ve Chiralt, A., 2015. Optimisation of oat milk formulation to obtain fermented derivatives by using probiotic *Lactobacillus reuteri* microorganisms, *Food Science and Technology International*, 21(2), 145–157.

- Betoret, E., Betoret, N., Vidal, D. ve Fito, P., 2011. Functional foods development: Trends and Technologies, *Trends in Food Science and Technology*, 22(9), 498–508.
- Bezkorovainy, A., 2001. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut, *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 399-405.
- Blatchford, P., Ansell, J., De Godoy, M. R. C., Fahey, G., Garcia-Mazcorro, J. F., Gibson, G. R., Goh, Y. J., Hotchkiss, A. T., Hutkins, R. ve LaCroix, C., 2013. Prebiotic Mechanisms, Functions And Applications-A Review, *International Journal of Probiotics ve Prebiotics*, 8(4).
- Bouhnik, Y., Raskine, L., Simoneau, G., Vicaut, E., Neut, C., Flourié, B., Brouns, F. ve Bornet, F. R., 2004. The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacteria in healthy humans: A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, dose-response relation study, *American Journal of Clinical Nutrition*, 80(6), 1658–1664.
- Caggianiello, G., Kleerebezem, M. ve Spano, G., 2016. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(9), 3877–3886.
- Cao, X., Zhong, P., Li, G., Nehal, J. ve Zheng, Y., 2020. Application of probiotics in adjuvant treatment of infant allergic rhinitis: A randomized controlled study, *Medicine*, 99(18).
- Cao, X., Zhong, P., Li, G., Zhu, J. ve Zheng, Y., 2020. Application of probiotics in adjuvant treatment of infant allergic rhinitis: A randomized controlled study. *Medicine*, 99(18).
- Cardoso Umbelino Cavallini, D., Jovenasso Manzoni, M. S., Bedani, R., Roselino, M. N., Celiberto, L. S., Vendramini, R. C., De Valdez, G. F., Saes Parra Abdalla, D., Aparecida Pinto, R., ve Rosetto, D., 2016. Probiotic soy product supplemented with isoflavones improves the lipid profile of moderately hypercholesterolemic men: a randomized controlled trial, *Nutrients*, 8(1), 52.
- Cencic, A., ve Chingwaru, W., 2010. The role of functional foods, nutraceuticals, and food supplements in intestinal health, *Nutrients*, 2(6), 611–625.
- Chang, H. M., Foo, H. L., Loh, T. C., Lim, E. T. C. ve Abdul Mutalib, N. E., 2021. Comparative Studies of Inhibitory and Antioxidant Activities, and Organic Acids Compositions of Postbiotics Produced by Probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* Strains Isolated From Malaysian Foods, *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 1–14.
- Christensen, B.E. ve Characklis, W.G., 1990. Physical and chemical properties of biofilms, In Biujlms ed. Characklis, W.G. and Marshall, K.C. pp. 83-138. New York: Wiley- Intersciences.

- Chuah, L.-O., Foo, H. L., Loh, T. C., Alitheen, N. B. M., Yeap, S. K., Mutalib, N. E. A. ve Yusoff, K., 2019. Postbiotic metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* strains exert selective cytotoxicity effects on cancer cells, *Beneficial Microorganisms for Corals*, 19(1), 1–12.
- Chung, W. S. F., Meijerink, M., Zeuner, B., Holck, J., Louis, P., Meyer, A. S., Wells, J. M., Flint, H. J. ve Duncan, S. H., 2017. Prebiotic potential of pectin and pectic oligosaccharides to promote anti-inflammatory commensal bacteria in the human colon, *Federation of European Microbiological Societies*, 93(11), 127.
- Claes, I. J. J., Schoofs, G., Regulski, K., Courtin, P., Chapot-Chartier, M. P., Rolain, T., Hols, P., von Ossowski, I., Reunanen, J., de Vos, W. M., Palva, A., Vanderleyden, J., de Keersmaecker, S. C. J., ve Lebeer, S., 2012. Genetic and biochemical characterization of the cell wall hydrolase activity of the major secreted protein of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *PLoS ONE*, 7(2), 1–8.
- Costerton, J. W., 1995. Overview of microbial biofilms, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 15(3), 137–140.
- Costerton, J. W., 1999. Introduction to biofilm, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11(3–4), 217–221.
- Cuevas-González, P. F., Liceaga, A. M. ve Aguilar-Toalá, J. E., 2020. Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications *Food Research International*, 136(June).
- Dal Bello, F., Walter, J., Hertel, C. ve Hammes, W. P., 2001. *In vitro* study of prebiotic properties of levan-type exopolysaccharides from *Lactobacilli* and non-digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis. *Systematic and Applied Microbiology*, 24(2), 232–237.
- Das, D., Baruah, R. ve Goyal, A., 2014. A food additive with prebiotic properties of an α -d-glucan from *Lactobacillus plantarum* DM5 *International Journal of Biological Macromolecules*, 69, 20–26.
- De Almada, C. N., Almada, C. N., Martinez, R. C. R. ve Sant’Ana, A. S., 2016. Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods, *Trends in Food Science and Technology*, 58, 96–114.
- De Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Júnior, A. I. M., Thomaz-Soccol, V. ve Soccol, C. R., 2018. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria, *Biotechnology Advances*, 36(8), 2060–2076.
- De Vuyst, L. ve Degeest, B., 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, 23(2), 153–177.
- Decho, A. W. ve Gutierrez, T., 2017. Microbial extracellular polymeric substances (EPSs) in ocean systems, *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–28.

- Dertli, E., Mercan, E., Arici, M., Yilmaz, M. T. ve Sağdıç, O., 2016. Characterisation of lactic acid bacteria from Turkish sourdough and determination of their exopolysaccharide (EPS) production characteristics, *LWT Food Science and Technology*, 71, 116–124.
- Devi, P. B., Kavitate, D., Jayamanohar, J. ve Shetty, P. H., 2021. Preferential growth stimulation of probiotic bacteria by galactan exopolysaccharide from *Weissella confusa* KR780676, *Food Research International*, 143, 110333.
- Dodoo, C. C., Wang, J., Basit, A. W., Stapleton, P. ve Gaisford, S., 2017. Targeted delivery of probiotics to enhance gastrointestinal stability and intestinal colonisation, *International Journal of Pharmaceutics*, 530(1–2), 224–229.
- Donlan, R. M., ve Costerton, J. W., 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167–193.
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., ve Schorr-Galindo, S., 2012. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction, *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 951–962.
- Doron, S., ve Snyderman, D. R., 2015. Risk and safety of probiotics, *Clinical Infectious Diseases*, 60(Suppl 2), S129–S134.
- Douglas, L. C. ve Sanders M. E., 2008. Probiotics and prebiotics in dietetics practice, *Journal of the American Dietetic Association*, 108(3), 510–521.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. ve Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356.
- Dudek-Wicher, R., Junka, A., Paleczny, J. ve Bartoszewicz, M., 2020. Clinical trials of probiotic strains in selected disease entities, *International Journal Of Microbiology*.
- Eeckhaut, V., Van Immerseel, F., Dewulf, J., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. ve Broekaert, W. F., 2008. Arabinoxyloligosaccharides from wheat bran inhibit *Salmonella* colonization in broiler chickens, *Poultry science*, 87(11), 2329–2334.
- Eeckhaut, V., Van Immerseel, F., Dewulf, J., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. ve Broekaert, W. F., 2008. Arabinoxyloligosaccharides from wheat bran inhibit *Salmonella* colonization in broiler chickens, *Poultry Science*, 87(11), 2329–2334.
- El-Ghonemy, D. H. 2021. Antioxidant and antimicrobial activities of exopolysaccharides produced by a novel *Aspergillus* sp. DHE6 under optimized submerged fermentation conditions, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 36, 102150.

- Escamilla, J., Lane, M. A. ve Maitin, V., 2012. Cell-free supernatants from probiotic *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease colon cancer cell invasion in vitro, *Nutrition and Cancer*, 64(6), 871–878.
- Ferreira, V., Soares, V., Santos, C., Silva, J., Gibbs, P. A. ve Teixeira, P., 2005. Survival of *Lactobacillus sakei* during heating, drying and storage in the dried state when growth has occurred in the presence of sucrose or monosodium glutamate, *Biotechnology Letters*, 27(4), 249–252.
- Fijan, S., 2014. Microorganisms with claimed probiotic properties: An overview of recent literature *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(5), 4745–4767.
- Fiore, W., Arioli, S. ve Guglielmetti, S., 2020. The neglected microbial components of commercial probiotic formulations, *Microorganisms*, 8(8), 1–8.
- Flemming, H. C. ve Wingender, J., 2010. The biofilm matrix, *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A. ve Kjelleberg, S., 2016. Biofilms: An emergent form of bacterial life, *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563–575.
- Frei, B. A. R., Jonker, D. ve Kozianowski, G., 2002. Isomaltulose (Palatinose): a review of biological and toxicological studies, *Food and Chemical Toxicology*, 40(10), 1375–1381.
- Frei, E. ve Preston, R. D., 1964. Non-cellulosic structural polysaccharides in algal cell walls-II. Association of xylan and mannan in *Porphyra Umbilicalis*, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 160(980), 314–327.
- Freitas, F., Alves, V. D., Pais, J., Costa, N., Oliveira, C., Mafra, L., Hilliou, L., Oliveira, R. ve Reis, M. A. M., 2009. Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol, *Bioresource Technology*, 100(2), 859–865.
- Fritzen-Freire, C. B., Prudêncio, E. S., Amboni, R. D. M. C., Pinto, S. S., Negrão-Murakami, A. N. ve Murakami, F. S., 2012. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics, *Food Research International*, 45(1), 306–312.
- Garai-Ibabe, G., Dueñas, M. T., Irastorza, A., Sierra-Filardi, E., Werning, M. L., López, P., Corbí, A. L. ve Fernández de Palencia, P., 2010. Naturally occurring 2-substituted (1,3)- β -d-glucan producing *Lactobacillus suebicus* and *Pediococcus parvulus* strains with potential utility in the production of functional foods, *Bioresource Technology*, 101(23), 9254–9263.
- Gauri, S. S., Mandal, S. M., Mondal, K. C., Dey, S. ve Pati, B. R., 2009. Enhanced production and partial characterization of an extracellular polysaccharide from

newly isolated *Azotobacter* sp. SSB81 *Bioresource Technology*, 100(18), 4240–4243.

Generoso, S. V., Viana, M. L., Santos, R. G., Arantes, R. M. E., Martins, F. S., Nicoli, J. R., MacHado, J. A. N., Correia, M. I. T. D. ve Cardoso, V. N., 2011. Protection against increased intestinal permeability and bacterial translocation induced by intestinal obstruction in mice treated with viable and heat-killed *Saccharomyces boulardii*, *European Journal of Nutrition*, 50(4), 261–269.

Gérard, P. 2013. Metabolism of cholesterol and bile acids by the gut microbiota, *Pathogens*, 3(1), 14–24.

Gibson, G R., 2004. From probiotics to prebiotics and a healthy digestive system, *Journal of Food Science*, 69(5), 141–143.

Gibson, Glenn R ve Collins, M. D., 1999. Concept of balanced colonic microbiota, prebiotics and synbiotics, *Nestlé Nutrition Workshop Series*, 42, 139–156.

Gibson, Glenn R ve Roberfroid, M. B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics, *The Journal of Nutrition*, 125(6), 1401–1412.

Guimarães, J. T., Balthazar, C. F., Silva, R., Rocha, R. S., Graça, J. S., Esmerino, E. A., Silva, M. C., Sant’Ana, A. S., Duarte, M. C. K. H., Freitas, M. Q. ve Cruz, A. G., 2020. Impact of probiotics and prebiotics on food texture, *Current Opinion in Food Science*, 33, 38–44

Gürgün, V. ve Halkman, A. K., 1990. Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri, Gıda Teknolojisi Derneği Basım ve grafik. Numara. 7.

Hall-Stoodley, L. ve Stoodley, P., 2002. Developmental regulation of microbial biofilms. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 228–233.

Hasan, K. N. ve Banerjee, G., 2020. Recent studies on probiotics as beneficial mediator in aquaculture: a review, *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 81(1), 1–16.

Hashemi, S. M. B., Shahidi, F., Mortazavi, S. A., Milani, E. ve Eshaghi, Z., 2015. Synbiotic potential of Doogh supplemented with free and encapsulated *Lactobacillus plantarum* LS5 and *Helianthus tuberosus* inulin, *Journal of Food Science and Technology*, 52(7), 4579–4585.

Havenaar, R., Bonnin-Marol, S., Van Dokkum, W., Petitet, S., ve Schaafsma, G., 1999. Inulin: Fermentation and microbial ecology in the intestinal tract, *Food Reviews International*, 15(1), 109–120.

Hirshfield, I. N., Terzulli, S. ve O’Byrne, C., 2003. Weak organic acids: a panoply of effects on bacteria, *Science Progress*, 86(4), 245–269.

- Hongpattarakere, T., Cherntong, N., Wichienchot, S., Kolida, S. ve Rastall, R. A. 2012. *In vitro* prebiotic evaluation of exopolysaccharides produced by marine isolated lactic acid bacteria, *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 846–852.
- Horn, N., Wegmann, U., Dertli, E., Mulholland, F., Collins, S. R. A., Waldron, K. W., Bongaerts, R. J., Mayer, M. J. ve Narbad, A., 2013. Spontaneous Mutation Reveals Influence of Exopolysaccharide on *Lactobacillus johnsonii* Surface Characteristics, *PLoS ONE*, 8(3).
- Huebner, J., Wehling, R. L. ve Hutkins, R. W., 2007. Functional activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*, 17(7), 770–775.
- Ismail, B. ve Nampoothiri, K. M., 2010. Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510, *Archives of Microbiology*, 192(12), 1049–1057.
- Jia, W., Li, H., Zhao, L. ve Nicholson, J. K., 2008. Gut microbiota: a potential new territory for drug targeting *Nature reviews Drug discovery*, 7(2), 123–129.
- Johansen, H. N., Glitsø, V. ve Bach Knudsen, K. E., 1996. Influence of extraction solvent and temperature on the quantitative determination of oligosaccharides from plant materials by high-performance liquid chromatography, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(6), 1470–1474.
- Jovanovic-Malinovska, R., Kuzmanova, S. ve Winkelhausen, E., 2015. Application of ultrasound for enhanced extraction of prebiotic oligosaccharides from selected fruits and vegetables, *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 446–453.
- Kanamarlapudi, S. L. R. K. ve Muddada, S., 2017. Characterization of Exopolysaccharide Produced by *Streptococcus thermophilus* CC30, *BioMed Research International*, 2017.
- Kaneko, T., Kohmoto, T., Kikuchi, H., Shiota, M. Iino, H. ve Mitsuoka, T., 1994. Effects of isomaltooligosaccharides with different degrees of polymerization on human fecal bifidobacteria, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58(12), 2288–2290.
- Kanmani, P., Kumar, R. S., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukumar, V. ve Arul, V., 2011. Effect of cryopreservation and microencapsulation of lactic acid bacterium *Enterococcus faecium* MC13 for long-term storage, *Biochemical Engineering Journal*, 58, 140–147.
- Kansandee, W., Moonmangmee, D., Moonmangmee, S. ve Itsaranuwat, P., 2019. Characterization and Bifidobacterium sp. growth stimulation of exopolysaccharide produced by *Enterococcus faecalis* EJRM152 isolated from human breast milk, *Carbohydrate Polymers*, 206, 102–109.
- Kavita, K., Singh, V. K., Mishra, A. ve Jha, B., 2014. Characterisation and anti-biofilm activity of extracellular polymeric substances from *Oceanobacillus iheyensis*, *Carbohydrate Polymers*, 101, 29–35.

- Kavitake, D., Devi, P. B., Singh, S. P. ve Shetty, P. H., 2016. Characterization of a novel galactan produced by *Weissella confusa* KR780676 from an acidic fermented food, *International Journal Of Biological Macromolecules*, 86, 681–689.
- Kawase, M., Pilgrim, A., Araki, T. ve Hashimoto, K., 2001. Lactosucrose production using a simulated moving bed reactor, *Chemical Engineering Science*, 56(2), 453–458.
- Khan, J. A., Kainthan, R. K., Ganguli, M., Kizhakkedathu, J. N., Singh, Y., ve Maiti, S., 2006. Water soluble nanoparticles from PEG-based cationic hyperbranched polymer and RNA that protect RNA from enzymatic degradation, *Biomacromolecules*, 7(5), 1386–1388.
- Kim, N., Yun, M., Oh, Y. J. ve Choi, H.-J., 2018. Mind-altering with the gut: Modulation of the gut-brain axis with probiotics *Journal of Microbiology*, 56(3), 172–182.
- Kim, Y. A., Keogh, J. B., Clifton. ve P. M., 2018. Probiotics, prebiotics, synbiotics and insulin sensitivity, *Nutrition Research Reviews*, 31(1), 35–51.
- Klemashevich, C., Wu, C., Howsmon, D., Alaniz, R. C., Lee, K. ve Jayaraman, A., 2014. Rational identification of diet-derived postbiotics for improving intestinal microbiota function. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 85–90.
- Klosterhoff, R. R., Bark, J. M., Glänzel, N. M., Iacomini, M., Martinez, G. R., Winnischofer, S. M. B. ve Cordeiro, L. M. C., 2018. Structure and intracellular antioxidant activity of pectic polysaccharide from acerola (*Malpighia emarginata*), *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 473–480.
- Knight, D. C. ve Eden, J. A., 1996. A review of the clinical effects of phytoestrogens, *Obstetrics ve Gynecology*, 87(5), 897–904.
- Konstantinov, S. R., Kuipers, E. J. ve Peppelenbosch, M. P., 2013. Functional genomic analyses of the gut microbiota for crc screening, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 10(12), 741–745.
- Kook, S.-Y., Lee, Y., Jeong, E.-C. ve Kim, S., 2019. Immunomodulatory effects of exopolysaccharides produced by *Bacillus licheniformis* and *Leuconostoc mesenteroides* isolated from Korean kimchi, *Journal of Functional Foods*, 54, 211–219.
- Korcz, E., Kerényi, Z. ve Varga, L., 2018. Dietary fibers, prebiotics, and exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: Potential health benefits with special regard to cholesterol-lowering effects, *Food and Function*, 9(6), 3057–3068.
- Kothari, D., Tingirikari, J. M. R. ve Goyal, A., 2015. *In vitro* analysis of dextran from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1426 for functional food application *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 6(2), 55–61.

- König, H. ve Fröhlich, J., 2017. Lactic acid bacteria. Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine, Springer 3–41.
- Laurencin, C. T. ve Nair, L. S., 2008. Nanotechnology and tissue engineering: the scaffold. CRC Press.
- Lee, D., Hwang, W., Artan, M., Jeong, D. E. ve Lee, S. J., 2015. Effects of nutritional components on aging, *Aging Cell*, 14(1), 8–16.
- Lee, Y. K., Nomoto, K., Salminen, S. ve Gorbach, S. L., 1999. Handbook of probiotics. John Wiley and Sons.
- Leivers, S., Hidalgo-Cantabrana, C., Robinson, G., Margolles, A., Ruas-Madiedo, P. ve Laws, A. P., 2011. Structure of the high molecular weight exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IPLA-R1 and sequence analysis of its putative eps cluster, *Carbohydrate Research*, 346(17), 2710–2717.
- Ley, R. E., Peterson, D. A. ve Gordon, J. I., 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine, *Cell*, 124(4), 837–848.
- Li, R., Zhang, Y., Polk, D. B., Tomasula, P. M., Yan, F. ve Liu, L., 2016. Preserving viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG *in vitro* and *in vivo* by a new encapsulation system, *Journal of Controlled Release*, 230, 79–87.
- Li, W., Ji, J., Rui, X., Yu, J., Tang, W., Chen, X. ve Dong, M., 2014. Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus helveticus* MB2-1 and its functional characteristics *in vitro* LWT-Food Science and Technology, 59(2), 732–739.
- Lina, B. A. R., Jonker, D. ve Kozianowski, G., 2002. Isomaltulose (Palatinose): A review of biological and toxicological studies, *Food and Chemical Toxicology*, 40(10), 1375–1381.
- Liu, C., Lu, J., Lu, L., Liu, Y., Wang, F. ve Xiao, M., 2010. Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1, *Bioresource Technology*, 101(14), 5528–5533.
- Liu, Y., Li, Y., Shi, T., Zhao, J., Wang, H., Liu, T. Ve Zhou, Y., 2016. The optimization of spray drying process of *Lactobacillus reuteri*, *LWT-Food Science and Technology*, 68, 615–618.
- Macfarlane, G. T., Steed, H. ve Macfarlane, S., 2008. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics, *Journal of Applied Microbiology*, 104(2), 305–344.
- Macfarlane, G. T., Steed, H. ve Macfarlane, S., 2008. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics, *Journal of Applied Microbiology*, 104(2), 305–344.

- Macfarlane, S. ve Macfarlane, G. T., 2003. Regulation of short-chain fatty acid production, *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(1), 67–72.
- Mahdhi, A., Leban, N., Chakroun, I., Chaouch, M. A., Hafsa, J., Fdhila, K. ve Majdoub, H., 2017. Extracellular polysaccharide derived from potential probiotic strain with antioxidant and antibacterial activities as a prebiotic agent to control pathogenic bacterial biofilm formation, *Microbial Pathogenesis*, 109, 214–220.
- Malam, Y., Loizidou, M. ve Seifalian, A. M., 2009. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer, *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(11), 592–599.
- Mao, J., Zhang, S.-Z., Du, P., Cheng, Z.-B., Hu, H. ve Wang, S.-Y., 2020. Probiotics Can Boost the Antitumor Immunity of CD8⁺ T Cells in BALB/c Mice and Patients with Colorectal Carcinoma, *Journal of Immunology Research*.
- Marchesi, J. R., 2011. Human distal gut microbiome, *Environmental Microbiology*, 13(12), 3088–3102.
- Mendis, M., Leclerc, E. ve Simsek, S., 2016. Arabinoxylans, gut microbiota and immunity, *Carbohydrate Polymers*, 139, 159–166.
- Meurman, J. H. ve Stamatova, I. V., 2018. Probiotics: Evidence of Oral Health Implications. *Folia Medica*, 60(1), 21–29.
- Mirnejad, R., Vahdati, A. R., Rashidiani, J., Erfani, M. ve Piranfar, V., 2013. The antimicrobial effect of *Lactobacillus casei* culture supernatant against multiple drug resistant clinical isolates of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri in vitro*, *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 15(2), 122–126.
- Mohajeri, M. H., Brummer, R. J. M., Rastall, R. A., Weersma, R. K., Harmsen, H. J. M., Faas, M. ve Eggersdorfer, M., 2018. The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications, *European Journal of Nutrition*, 57(1), 1–14.
- Mollakhalili, M. N., Mortazavian, A. M., Sohrabvandi, S., Cruz, A. G. D. A. ve Mohammadi, R., 2017. Probiotic supplements and food products: Comparison for Different Targets.
- Moradi, M., Mardani, K. ve Tajik, H., 2019. Characterization and application of postbiotics of *Lactobacillus* spp. on *Listeria monocytogenes in vitro* and in food models, *LWT Food Science and Technology*, 111, 457–464.
- More, T. T., Yadav, J. S. S., Yan, S., Tyagi, R. D. ve Surampalli, R. Y., 2014. Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications, *Journal of Environmental Management*, 144, 1–25.
- Muhammad, Z., Ramzan, R., Huo, G.-C., Tian, H. ve Bian, X., 2017. Integration of polysaccharide-thermoprotectant formulations for microencapsulation of

- Lactobacillus plantarum*, appraisal of survivability and physico-biochemical properties during storage of spray dried powders, *Food hydrocolloids*, 66, 286–295.
- Nair, L. S. ve Laurencin, C. T., 2007. Biodegradable polymers as biomaterials, *Progress in polymer science*, 32(8–9), 762–798.
- Nakajima, H., Suzuki, Y. ve Hirota, T., 1992. Cholesterol lowering activity of ropy fermented milk, *Journal of Food Science*, 57, 6, 1327-1329.
- Nakamura, F., Ishida, Y., Sawada, D., Ashida, N., Sugawara, T., Sakai, M., Goto, T., Kawada, T. ve Fujiwara, S., 2016. Fragmented Lactic Acid Bacterial Cells Activate Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Ameliorate Dyslipidemia in Obese Mice, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(12), 2549–2559.
- Nataraj, B. H., Ali, S. A., Behare, P. V. ve Yadav, H., 2020. Postbiotics-parabiotics: The new horizons in microbial biotherapy and functional foods, *Microbial Cell Factories*, 19(1), 1–22.
- Nehal, F., Sahnoun, M., Smaoui, S., Jaouadi, B., Bejar, S. ve Mohammed, S., 2019. Characterization, high production and antimicrobial activity of exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* F-mou, *Microbial Pathogenesis*, 132, 10–19.
- Neri-Numa, I. A. ve Pastore, G. M., 2020. Novel insights into prebiotic properties on human health: A review *Food Research International*, 131, 108973.
- Neu, T. R. ve Lawrence, J. R., 2015. Innovative techniques, sensors, and approaches for imaging biofilms at different scales, *Trends in Microbiology*, 23(4), 233–242.
- Nord, C. E. ve Lidbeck, A., 1993. *Lactobacilli* and the normal human anaerobic microflora, *Clinical Infectious Diseases*, 16(Suppl 4), S181–S187.
- Nuraida, L., 2015. A review: Health promoting lactic acid bacteria in traditional Indonesian fermented foods, *Food Science and Human Wellness*, 4(2), 47–55.
- Nwodo, U. U., Green, E. ve Okoh, A. I., 2012. Bacterial exopolysaccharides: Functionality and prospects, *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 14002–14015.
- Oskuee, R. K., Dehshahri, A., Shier, W. T. ve Ramezani, M., 2009. Alkylcarboxylate grafting to polyethylenimine: a simple approach to producing a DNA nanocarrier with low toxicity, *The Journal of Gene Medicine: A cross-disciplinary journal for research on the science of gene transfer and its clinical applications*, 11(10), 921–932.
- Ou, J., Carbonero, F., Zoetendal, E. G., DeLany, J. P., Wang, M., Newton, K., Gaskins, H. R. ve O’Keefe, S. J. D., 2013. Diet, microbiota, and microbial metabolites in

- colon cancer risk in rural Africans and African Americans, *American Journal of Clinical Nutrition*, 98(1), 111–120.
- Ozturk, S., Aslim, B. ve Suludere, Z., 2009. Evaluation of chromium (VI) removal behaviour by two isolates of *Synechocystis* sp. in terms of exopolysaccharide (EPS) production and monomer composition, *Bioresource Technology*, 100(23), 5588–5593.
- Palcic, M. M., 1999. Biocatalytic synthesis of oligosaccharides, *Current Opinion in Biotechnology*, 10(6), 616–624.
- Pan, L., Han, Y. ve Zhou, Z., 2020. *In vitro* prebiotic activities of exopolysaccharide from *Leuconostoc pseudomesenteroides* XG5 and its effect on the gut microbiota of mice, *Journal of Functional Foods*, 67, 103853.
- Pandiyan, P., Balaraman, D., Thirunavukkarasu, R., George, E. G. J., Subaramaniyan, K., Manikkam, S. ve Sadayappan, B., 2013. Probiotics in aquaculture, *Drug invention today*, 5(1), 55–59.
- Panesar, P. S., Kumari, S. ve Panesar, R., 2013. Biotechnological approaches for the production of prebiotics and their potential applications, *Critical reviews in biotechnology*, 33(4), 345–364.
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E. ve Piemonte, F., 2003. Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification, *Clinica Chimica Acta*, 333(1–2), 19–39.
- Patel, A. K., Michaud, P., Singhanian, R. R., Soccol, C. R. ve Pandey, A., 2010. Polysaccharides from Probiotics: New developments as food additives, *Food Technology and Biotechnology*, 48(4), 451–463.
- Pelton, R., 2020. Postbiotic metabolites: How probiotics regulate health, *Integrative Medicine (Boulder)*, 19(1), 25–30.
- Peña, A. S., 2007. Intestinal flora, probiotics, prebiotics, synbiotics and novel foods. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 99(11), 653–658.
- Peralta, G. H., Bergamini, C. V, Audero, G., Páez, R., Wolf, I. V., Perotti, M. C. ve Hynes, E. R., 2017. Spray-dried adjunct cultures of autochthonous non-starter lactic acid bacteria, *International journal of food microbiology*, 255, 17–24.
- Peredo-Lovillo, A., Romero-Luna, H. E. ve Jiménez-Fernández, M., 2020. Health promoting microbial metabolites produced by gut microbiota after prebiotics metabolism, *Food Research International*, 136, 109473.
- Pereira, C. S., Thompson, J. A. ve Xavier, K. B., 2013. AI-2-mediated signalling in bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, 37(2), 156–181.
- Persat, A., Nadell, C. D., Kim, M. K., Ingremeau, F., Siryaporn, A., Drescher, K., Wingreen, N. S., Bassler, B. L., Gitai, Z. ve Stone, H. A., 2015. The mechanical world of bacteria, *Cell*, 161(5), 988–997.

- Pineiro, M. ve Stanton, C., 2007. Probiotic bacteria: legislative framework—requirements to evidence basis, *The Journal of nutrition*, 137(3), 850S-853S.
- Playne, M. J. ve Crittenden, R., 1996. Commercially available oligosaccharides, International Dairy Federation.
- Prete, R., Alam, M. K., Perpetuini, G., Perla, C., Pittia, P. ve Corsetti, A., 2021. Lactic acid bacteria exopolysaccharides producers: A sustainable tool for functional foods, *Foods*, 10(7), 1–27.
- Priem, B., Gilbert, M., Wakarchuk, W. W., Heyraud, A. ve Samain, E., 2002. A new fermentation process allows large-scale production of human milk oligosaccharides by metabolically engineered bacteria, *Glycobiology*, 12(4), 235–240.
- Priyodip, P., Prakash, P. Y. ve Balaji, S., 2017. Phytases of probiotic bacteria: characteristics and beneficial aspects, *Indian journal of microbiology*, 57(2), 148–154.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C. ve Yamada, T., 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing nature, 464(7285), 59–65.
- Rajoka, M. S. R., Jin, M., Haobin, Z., Li, Q., Shao, D., Jiang, C. ve Hussain, N., 2018. Functional characterization and biotechnological potential of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from human breast milk, *LWT Food Science and Technology*, 89, 638–647.
- Reid, G., Sanders, M. E., Gaskins, H. R., Gibson, G. R., Mercenier, A., Rastall, R. ve Klaenhammer, T. R., 2003. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics, *Journal of clinical gastroenterology*, 37(2), 105–118.
- Reinheimer, J. A., Demkow, M. R. ve Candiotti, M. C. 1990. Inhibition of coliform bacteria by lactic cultures, *Australian Journal of Dairy Technology*, 45(1), 5–9.
- Ríos-Covián, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., De los Reyes-Gavilán, C. G. ve Salazar, N., 2016. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health, *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–9.
- Robertson, J. A., Ryden, P., Louise Botham, R., Reading, S., Gibson, G. ve Ring, S. G., 2001. Structural properties of diet-derived polysaccharides and their influence on butyrate production during fermentation, *LWT- Food Science and Technology*, 34(8), 567–573.
- Rodrigues, C. F., Gonçalves, B., Rodrigues, M. E., Silva, S., Azeredo, J. ve Henriques, M., 2017. The Effectiveness of Voriconazole in Therapy of *Candida glabrata*'s Biofilms Oral Infections and Its Influence on the Matrix Composition and Gene Expression, *Mycopathologia*, 182(7–8), 653–664.

- Rodrigues, C. F., Gonçalves, B., Rodrigues, M. E., Silva, S., Azeredo, J. ve Henriques, M., 2017. The Effectiveness of Voriconazole in Therapy of *Candida glabrata*'s Biofilms Oral Infections and Its Influence on the Matrix Composition and Gene Expression. *Mycopathologia*, 182(7–8), 653–664.
- Rojaka, D. ve Lesinskienė, S., 2018. A survey of some aspects of birthday celebration, *Acta Medica Lituanica*, 25(2), 107.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J. ve Zoon, P., 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, *International Dairy Journal*, 12(2–3), 163–171.
- Ruijsenaars, H. J., Stingele, F. ve Hartmans, S., 2000. Biodegradability of food-associated extracellular polysaccharides, *Current Microbiology*, 40(3), 194–199.
- Ryan, P. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Caplice, N. M. ve Stanton, C., 2015. Sugar-coated: Exopolysaccharide producing lactic acid bacteria for food and human health applications, *Food and Function*, 6(3), 679–693.
- Sako, T., Matsumoto, K. ve Tanaka, R., 1999. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides, *International Dairy Journal*, 9(1), 69–80.
- Salazar, N., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. G. ve Ruas-Madiedo, P., 2016. Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria as Fermentable Substrates by the Intestinal Microbiota Critical Reviews in, *Food Science and Nutrition*, 56(9), 1440–1453.
- Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N. ve Prapulla, S. G., 2005. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides, *Trends in Food Science and Technology*, (10), 442–457.
- Sanz, Y. ve De Palma, G., 2009. Gut microbiota and probiotics in modulation of epithelium and gut-associated lymphoid tissue function, *International Reviews of Immunology*, 28(6), 397–413.
- Sawada, H., Furushiro, M., Hirai, K., Motoike, M., Watanabe, T. ve Yokokura, T., 1990. Purification and Characterization of an Antihypertensive Compound from *Lactobacillus casei*, *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(12), 3211–3219.
- Sayem, S. M. A., Manzo, E., Ciavatta, L., Tramice, A., Cordone, A., Zanfardino, A., De Felice, M. ve Varcamonti, M., 2011. Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*, *Microbial Cell Factories*, 10(1), 1–12.
- Schmaljohann, D., 2006. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(15), 1655–1670.
- Schmid, J., Sieber, V. ve Rehm, B., 2015. Bacterial exopolysaccharides: Biosynthesis pathways and engineering strategies, *Frontiers in Microbiology*, 1–24.

- Schwartz, A., 2016. Microbiota of the human body *Adv Exp Med Biol*, 902.
- Seo, J. K., Kim, S. W., Kim, M. H., Upadhaya, S. D., Kam, D. K. ve Ha, J. K., 2010. Direct-fed microbials for ruminant animals, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(12), 1657–1667.
- Seong, H., Bae, J. H., Seo, J. S., Kim, S. A., Kim, T. J. ve Han, N. S., 2019. Comparative analysis of prebiotic effects of seaweed polysaccharides laminaran, porphyran, and ulvan using *in vitro* human fecal fermentation, *Journal of Functional Foods*, 57(2), 408–416.
- Seviour, T., Derlon, N., Dueholm, M. S., Flemming, H. C., Girbal-Neuhausser, E., Horn, H., Kjelleberg, S., van Loosdrecht, M. C. M., Lotti, T., Malpei, M. F., Nerenberg, R., Neu, T. R., Paul, E., Yu, H. ve Lin, Y., 2019. Extracellular polymeric substances of biofilms: Suffering from an identity crisis, *Water Research*, 151, 1–7.
- Shang, Q., Song, G., Zhang, M., Shi, J., Xu, C., Hao, J., Li, G. ve Yu, G., 2017. Dietary fucoidan improves metabolic syndrome in association with increased *Akkermansia* population in the gut microbiota of high-fat diet-fed mice, *Journal of Functional Foods*, 28, 138–146.
- Shi, Y., Cui, X., Gu, S., Yan, X., Li, R., Xia, S. ve Ge, J., 2019. Antioxidative and probiotic activities of lactic acid bacteria isolated from traditional artisanal milk cheese from Northeast China, *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(4), 1086–1099.
- Shin, H. S., Park, S. Y., Lee, D. K., Kim, S. A., An, H. M., Kim, J. R., Kim, M. J., Cha, M. G., Lee, S. W., Kim, K. J., Lee, K. O. ve Ha, N. J., 2010. Hypocholesterolemic effect of sonication-killed *Bifidobacterium longum* isolated from healthy adult Koreans in high cholesterol fed rats, *Archives of Pharmacal Research*, 33(9), 1425–1431.
- Siciliano, R. A., Reale, A., Mazzeo, M. F., Morandi, S., Silveti, T. ve Brasca, M., 2021. Paraprobiotics: A new perspective for functional foods and nutraceuticals, *Nutrients*, 13(4), 1–19.
- Singh, B., Halestrap, A. P. ve Paraskeva, C., 1997. Butyrate can act as a stimulator of growth or inducer of apoptosis in human colonic epithelial cell lines depending on the presence of alternative energy sources, *Carcinogenesis*, 18(6), 1265–1270.
- Singh, M., Sharma, R. ve Banerjee, U. C., 2002. Biotechnological applications of cyclodextrins, *Biotechnology Advances*, 20(5–6), 341–359.
- Singh, P. ve Saini, P., 2017. Food and Health Potentials of Exopolysaccharides Derived from *Lactobacilli*, *Microbiology Research Journal International*, 22(2), 1–14.

- Śliżewska, K., Kapuśniak, J., Barczyńska, R. ve Jochym, K., 2012. Resistant dextrins as prebiotic, Carbohydrates—comprehensive studies on glycobiology and glycotechnology, 261.
- Song, J.-M. ve Wei, D.-Z., 2010. Production and characterization of cellulases and xylanases of *Cellulosimicrobium cellulans* grown in pretreated and extracted bagasse and minimal nutrient medium M9, Biomass and Bioenergy, 34(12), 1930–1934.
- Song, X., Shen, Q., Liu, M., Zhang, C., Zhang, L., Ren, Z., Wang, W., Dong, Y., Wang, X., Zhang, J ve Jia, L., 2018. Antioxidant and hepatoprotective effects of intracellular mycelium polysaccharides from *Pleurotus geesteranus* against alcoholic liver diseases, International Journal of Biological Macromolecules, 114, 979–988.
- Stanton, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. ve Van Sinderen, D., 2005. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites, Current Opinion in Biotechnology, 16(2), 198–203.
- Stefanello, R. F., Nabeshima, E. H., Iamanaka, B. T., Ludwig, A., Fries, L. L. M., Bernardi, A. O. ve Copetti, M. V., 2019. Survival and stability of *Lactobacillus fermentum* and *Wickerhamomyces anomalus* strains upon lyophilisation with different cryoprotectant agents, Food Research International, 115, 90–94.
- Steinert, R. E., Sadabad, M. S., Harmsen, H. J. M. ve Weber, P. 2016. The prebiotic concept and human health: a changing landscape with riboflavin as a novel prebiotic candidate? European journal of clinical nutrition, 70(12), 1348–1353.
- Stevenson, A., Adler, P. A. ve Adler, P., 1996. Constructions of Deviance: Social Power, Context, and Interaction, Teaching Sociology, 24(1), 129.
- Stowell, J., 2006. Calorie control and weight management, Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology, 54–61.
- Strathmann, M. ve Griebe, T., 2000. Artificial biofilm model ± a useful tool for biofilm research, Applied Microbiology and Biotechnology, 231–237.
- Takadanohara, H., Catanzaro, R., Chui, D. H., He, F., Yadav, H., Ganguli, A., Sakata, Y., Solimene, U., Minelli, E., Kobayashi, R., Nagamachi, Y. ve Marotta, F., 2012. Beneficial effect of a symbiotic preparation with *S. boulardii* lysate in mild stress-induced gut hyper-permeability, Acta bio-medica: Atenei Parmensis, 83(3), 208—216.
- Tang, W., Han, S., Zhou, J., Xu, Q., Dong, M., Fan, X. ve Jiang, M., 2020. Selective fermentation of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* SRFM-1 derived exopolysaccharide by *Lactobacillus* and *Streptococcus* strains revealed prebiotic properties, Journal of Functional Foods, 69, 103952.

- Tao, T. ve Zhai, C., 2006. Regularized estimation of mixture models for robust pseudo-relevance feedback, Proceedings of the 29th annual international ACM SIGIR conference on Research and Development in Information Retrieval, 162–169.
- Tedelind, S., Westberg, F., Kjerrulf, M. ve Vidal, A., 2007. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: A study with relevance to inflammatory bowel disease, *World Journal of Gastroenterology*, 13(20), 2826–2832.
- Thakkar, P. N., Patel, A., Modi, H. A. ve Prajapati, J. B., 2020. Hypocholesterolemic effect of potential probiotic *Lactobacillus fermentum* strains isolated from traditional fermented foods in Wistar rats, *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(3), 1002–1011.
- Tiptiri-Kourpeti, A., Spyridopoulou, K., Santarmaki, V., Aindelis, G., Tompoulidou, E., Lamprianidou, E. E., Saxami, G., Ypsilantis, P., Lampri, E. S., Simopoulos, C., Kotsianidis, I., Galanis, A., Kourkoutas, Y., Dimitrellou, D. ve Chlichlia, K., 2016. *Lactobacillus casei* exerts anti-proliferative effects accompanied by apoptotic cell death and up-regulation of TRAIL in colon carcinoma cells, *PLoS ONE*, 11(2), 1–20.
- Toole, G. O., Kaplan, H. B. ve Kolter, R., 2000. *Annu. Rev. Microbiol*, 2000.54:49-79. 49–79.
- Torchilin, V. P., 2012. Immobilized enzymes in medicine (C. 11), Springer Science and Business Media.
- Tripathi, M. K. ve Giri, S. K., 2014. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage, *Journal of Functional Foods*, 9, 225–241.
- Tsilingiri, K. ve Rescigno, M., 2013. Postbiotics: What else? *Beneficial Microbes*, 4(1), 101–107.
- 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), 393s-398s.
- Utami, K. S. ve Mahdi, C. 2017. Potential of *Lactobacillus casei* shirota strain probiotic toward total cholesterol levels and sod activity in rat with high cholesterol diet, *Molekul*, 12(2), 153–158.
- Vaidya, R. H. ve Sheth, M. K., 2011. Processing and storage of Indian cereal and cereal products alters its resistant starch content, *Journal of Food Science and Technology*, 48(5), 622–627.
- Vamanu, E. ve Vamanu, A., 2010. The influence of prebiotics on bacteriocin synthesis using the strain *Lactobacillus paracasei* CMGB16. *African Journal of Microbiology Research*, 4(7), 534–537.

- Van Hung, T., Wanatanbe, J., Yonejima, Y., Hisa, K., Yamamoto, Y. ve Suzuki, T., 2019. Exopolysaccharides from *Leuconostoc mesenteroides* attenuate chronic kidney disease in mice by protecting the intestinal barrier, *Journal of Functional Foods*, 52, 276–283.
- Varzakas, T., Kandyliis, P., Dimitrellou, D., Salamoura, C., Zakynthinos, G. ve Proestos, C., 2018. Innovative and fortified food: Probiotics, prebiotics, gmos, and superfood, *Preparation and processing of religious and cultural foods*, Elsevier, 67–129.
- Vazquez, M. J., Alonso, J. L., Dominguez, H. ve Parajo, J. C., 2000. Xylooligosaccharides: manufacture and applications, *Trends in Food Science and Technology*, 11(11), 387–393.
- Venegas, D. P., De La Fuente, M. K., Landskron, G., González, M. J., Quera, R., Dijkstra, G., Harmsen, H. J. M., Faber, K. N. ve Hermoso, M. A., 2019. Short chain fatty acids (SCFAs) mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases, *Frontiers in Immunology*, 10.
- Villamiel, M., Corzo, N., Foda, M. I., Montes, F. ve Olano, A., 2002. Lactulose formation catalysed by alkaline-substituted sepiolites in milk permeate, *Food Chemistry*, 76(1), 7–11.
- Vonk, R. J. ve Reckman, G., 2017. Progress in the biology and analysis of short chain fatty acids, *Journal of Physiology*, 595(2), 419–420.
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J. ve Ivanova, E. P., 2009. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation, *Molecules*, 14(7), 2535–2554.
- Wang, Y., 2009. Prebiotics: Present and future in food science and technology, *Food Research International*, 42(1), 8–12.
- Wang, Y., Ahmed, Z., Feng, W., Li, C. ve Song, S., 2008. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirianofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir, *International Journal of Biological Macromolecules*, 43(3), 283–288.
- Wang, Y., Gänzle, M. G. ve Schwab, C., 2010. Exopolysaccharide synthesized by *Lactobacillus reuteri* decreases the ability of enterotoxigenic *Escherichia coli* to bind to porcine erythrocytes, *Applied and Environmental Microbiology*, 76(14), 4863–4866.
- Weijers, C. A. G. M., Franssen, M. C. R. ve Visser, G. M., 2008. Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides, *Biotechnology Advances*, 26(5), 436–456.
- Xu, X., Peng, Q., Zhang, Y., Tian, D., Zhang, P., Huang, Y. ve Shi, B., 2020. Antibacterial potential of a novel *Lactobacillus casei* strain isolated from Chinese northeast sauerkraut and the antibiofilm activity of its exopolysaccharides, *Food ve Function*, 11(5), 4697–4706.

- Yan, F., Cao, H., Cover, T. L., Whitehead, R., Washington, M. K. ve Polk, D. B., 2007. Soluble Proteins Produced by Probiotic Bacteria Regulate Intestinal Epithelial Cell Survival and Growth, *Gastroenterology*, 132(2), 562–575.
- Yang, W. W., Wang, L. M., Gong, L. L., Lu, Y. M., Pan, W. J., Wang, Y., Zhang, W. N. ve Chen, Y., 2018. Structural characterization and antioxidant activities of a novel polysaccharide fraction from the fruiting bodies of *Craterellus cornucopioides*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, 473–482.
- Yeo, S. ve Liong, M. 2010. Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(2), 267–275.
- Yildiz, H. ve Karatas, N., 2018. Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive properties, *Process Biochemistry*, 72, 41–46.
- Yilmaz, M. T., Dertli, E., Toker, O. S., Tatlisu, N. B., Sagdic, O. ve Arici, M., 2015. Effect of in situ exopolysaccharide production on physicochemical, rheological, sensory, and microstructural properties of the yogurt drink ayran: An optimization study based on fermentation kinetics, *Journal of Dairy Science*, 98(3), 1604–1624.
- Yun, J. W. 1996. Fructooligosaccharides- Occurrence, preparation, and application. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(2), 107–117.
- Zayed, A., Mansour, M. K., Sedeek, M. S., Habib, M. H., Ulber, R. ve Farag, M. A., 2021. Rediscovering bacterial exopolysaccharides of terrestrial and marine origins: novel insights on their distribution, biosynthesis, biotechnological production, and future perspectives, *Critical Reviews in Biotechnology*, 1–21.
- Zhang, J., Wen, C., Duan, Y., Zhang, H. ve Ma, H., 2019. Advance in *Cordyceps militaris* (Linn) Link polysaccharides: Isolation, structure, and bioactivities: A review, *International Journal of Biological Macromolecules*, 132, 906–914.
- Zhang, M.M., Cheng, J.Q., Lu, Y.R., Yi, Z.H., Yang, P. ve Wu, X.T., 2010. Use of pre-, pro-and synbiotics in patients with acute pancreatitis: A meta-analysis, *World Journal Gastroenterology*, 3970–3978.
- Zhang, T., Zhang, C., Li, S., Zhang, Y. ve Yang, Z., 2011. Growth and exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* ST1 in skim milk, *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(4), 1470–1478.
- Zhao, H., Li, S., Zhang, J., Che, G., Zhou, M., Liu, M., Zhang, C., Xu, N., Lin, L., Liu, Y. ve Jia, L., 2016. The antihyperlipidemic activities of enzymatic and acidic intracellular polysaccharides by *Termitomyces albuminosus*, *Carbohydrate Polymers*, 151, 1227–1234.

- Zhou, Y., Cui, Y. ve Qu, X., 2019. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Structure, bioactivity and associations: A review *Carbohydrate Polymers*, 207, 317–332.
- Ziemer, C. J. ve Gibson, G. R., 1998. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: Perspectives and future strategies, *International Dairy Journal*, 8(5–6), 473–479.
- Zwicker, J. G., Suto, M., Harris, S. R., Vlasakova, N. ve Missiuna, C., 2018. Developmental coordination disorder is more than a motor problem: Children describe the impact of daily struggles on their quality of life, *British Journal of Occupational Therapy*, 81(2), 65–73.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Abdülkerim KOCAOĞLU

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Aksaray Üniversitesi, 2015-2019

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi, 2019-2022

YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

Önal Darılmaz, D., ve Kocaoğlu, A., 2018. Biyoizoprenin sağlığımız ve çevreye için önemi, Uluslararası Avrasya Kongresi, “Doğal Beslenme ve Sağlıklı Yaşam”, Ankara, Bildiriler Kitabı, 680-686.

Kocaoğlu, A., ve Önal Darılmaz, D., 2021. *Lactobacillus rhamnosus* ACS5 suşundan elde edilen liyofilize ekzopolisakkaritlerin (L-EPs) anti-biofilm aktivite etkisinin değerlendirilmesi, Ankara v. International scientific research congress, Bildiriler Kitabı, 74-75.