



TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

GIDA MÜHENDİSLİĞİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNDE QUORUM ALGILAMA
SİSTEMLERİNİN KONTROLÜ VE EKZOPOLİSAKKARİT
ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARIDDUDİN MOHAMMADIAN

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TOKATLI

TOKAT- 2023

ETİK SÖZLEŞME

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TOKATLI danışmanlığında hazırlamış olduğum “Laktik Asit Bakterilerinde Quorum Algılama Sistemlerinin Kontrolü ve Ekzopolisakkarit Üretimi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi” adlı Yüksek Lisans/ Doktora tezinin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

14/11/2023

FARIDDUDIN MOHAMMADIAN

JÜRİ KABUL VE ONAY

FARIDDUDIN MOHAMMADIAN tarafından hazırlanan “**Laktik Asit Bakterilerinde Quorum Algılama Sistemlerinin Kontrolü ve Ekzopolisakkarit Üretimi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı **02.11.2023** tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından **Oy Birliği** ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmzası

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TOKATLI

.....

Üye

Prof. Dr. Şeniz KARABIYIKLI ÇİÇEK

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Nilgün ÖNCÜL

.....



Bu tez çalışması;
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2022/66
nolu proje ile desteklenmiştir

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince tecrübelerini ve bilgi birikimini benden esirgemeyen, laboratuvar çalışmaları ve tez yazım sürecimde bana sabırla yardımcı olan kıymetli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TOKATLI'ya, laboratuvar çalışmalarımda benden yardımını esirgemeyen Arş. Gör. Özgül YAZAR'a, lisansüstü eğitimim süresince kendimi geliştirmemde katkısı olan, önemli bilgi birikimlerini benden esirgemeyen değerli hocalarıma, başta babam Arazmohammad ve annem HalimaBibih olmak üzere her zaman yanımda olan, bana daima sevgisini ve güvenini hissettiren sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

FARIDDUDIN MOHAMMADIAN

Kasım, 2023

ÖZET

LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNDE QUORUM ALGILAMA SİSTEMLERİNİN KONTROLÜ VE EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Mohammadian, Fariddudin

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TOKATLI

Kasım 2023, 101 sayfa

Tez çalışması ile farklı düzeylerde ekzopolisakkarit (EPS) üretme yeteneğine sahip LAB kültürlerinin EPS sentez mekanizmaları quorum algılama (QS) veya quorum algılama inhibisyonu (QQ) sistemleri aracılığı ile kontrol altına alınarak EPS sentezinin azaltılması ve arttırılması sağlanmıştır. Çalışma kapsamında kuşburnu, zerdeçal, tarçın, mahlep gibi bitkisel kaynaklardan QS-QQ aktif polifenollerin ekstraksiyonu su, etanol, metanol, etanol-su kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca peynir suyu (PS) iyi bir oligopeptit kaynağı olarak kullanılmıştır. Ekstraktların LAB EPS sentezi üzerine doğrudan QS veya QQ aktivitesi göstererek etkili olduğunun belirlenebilmesi amacı ile örneklerin minimum inhibisyon konsantrasyonları belirlenmiştir. Minimum inhibisyon konsantrasyonu belirlenen ekstraktlar 3 farklı oranda (%0,01, %0,4, %2) kültür ortamına ilave edilerek LAB EPS fermentasyonuna etkileri incelenmiştir. Kültür ortamının toplam canlı sayısı, toplam şeker ve EPS miktarı belirlenerek kinetik parametreleri ortaya konmuştur. Yapılan çalışma sonucunda, tarçın metanol, etanol ve etanol-su ekstraktlarının *Lb. namurensis* MF210 suşunun EPS üretim miktarlarını canlı hücre sayılarını değiştirmeden önemli düzeyde azalttığı belirlenmiştir. Özellikle %2 tarçın etanol-su ekstraktları *Lb. namurensis* MF210 suşunun EPS üretim miktarını 1,15 g/L değerinden 0,10 g/L değerine kadar düşürmüş ve özgül EPS üretim hızı da azalmıştır. Mahlep su ekstraktlarında (%0,4 ve %2) ise *Lb. brevis* MF87 suşunun EPS üretim miktarları kontrol grubuna (1,61 g/L) göre daha yüksek bulunmuş ve EPS üretim miktarları sırası ile 1,97 g/L ve 2,44 g/L seviyelerine yükselmiştir.

Bu şekildeki bir kontrol mekanizması sayesinde laktik starter kültürlerinin fermente ürünlerde EPS sentezinden dolayı oluşturduğu olumlu ve olumsuz etkiler QS sistemi üzerinden dolaylı olarak kontrol edilmiştir. EPS sentezinde QS sistemi kontrolü ile meydana getirilen bu değişiklikler hücre çoğalması üzerinde bir değişiklik oluşturmayacağı için fermentasyonun seyrinde herhangi bir olumsuzluk oluşturmayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Quorum Algılama, Quorum İnhibisyon, Laktik Asit Bakterisi, Ekzopolisakkarit, Bitkisel Ekstrakt, Oligopeptid

ABSTRACT

CONTROL OF QUORUM SENSING SYSTEMS IN LACTIC ACID BACTERIA AND DETERMINATION OF THEIR EFFECTS ON EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCTION

Mohammadian, Fariddudin

Master's Thesis, Department of Food Engineering

Advisor: Assist. Prof. Dr. Mehmet TOKATLI

November 2023, 101 pages

In this thesis study, the EPS synthesis mechanisms of LAB cultures, which have the ability to produce EPS at different levels, were controlled through QS or QQ systems, thus reducing and increasing EPS synthesis. Within the scope of the study, the extraction of QS-QQ active polyphenols from herbal sources such as rosehip, turmeric, cinnamon and mahaleb was carried out using water, ethanol, methanol, and ethanol-water. Additionally, whey (PS) has been used as a good source of oligopeptides. Minimum inhibition concentrations of the samples were determined in order to determine whether the extracts were effective by showing direct QS or QQ activity on LAB EPS synthesis. The extracts with determined minimum inhibition concentrations were added to the culture medium at 3 different rates (0.01%, 0.4%, 2%) and their effects on LAB EPS fermentation were examined. The kinetic parameters of the culture medium were determined by determining the total number of organisms, total sugar and EPS amount.

As a result of the study, it was determined that cinnamon methanol, ethanol, and ethanol-water extracts significantly reduced the EPS production amounts of the *Lb. namurensis* MF210 strain without changing the number of living cells. In particular, %2 cinnamon ethanol-water extracts reduced the EPS production amount of *Lb. namurensis* MF210 strain from 1.15 g/L to 0.10 g/L, and the specific EPS production rate also decreased. In mahlep water extracts (0.4% and 2%), the EPS production amounts of the *Lb. brevis* MF87 strain were found to be higher than the control group (1.61 g/L), and the EPS production amounts increased to 1.97 g/L and 2.44 g/L, respectively. The positive and negative effects of such lactic starter cultures due to EPS synthesis in fermented products were indirectly controlled through the QS system. These changes, which are brought about by the control of the QS system in EPS synthesis, will not cause any change in cell proliferation and will not cause any negativity during fermentation.

Keywords: Quorum Sensing, Quorum Quenching, Lactic Acid Bacteria, Exopolysaccharide, Plant Extract, Oligopeptide

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TABLolar LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	2
2.1. Quorum Algılama (Quorum Sensing-QS) ve Quorum İnhibisyon (Quorum Quenching-QQ).....	2
2.2. N-çil-homoserin-lakton (AHL) Tabanlı QS Tabanlı QS.....	5
2.3. Peptit Bazlı QS.....	6
2.4. Diğer QS Sistemleri.....	6
2.5. QS Sinyallerini Algılama	7
2.6. QSI Seçim Kriterleri.....	8
2.7. QS İnhibitörleri.....	10
2.7.1. Sentetik QS inhibitörleri.....	10
2.7.2. Doğal QS inhibitörleri.....	10
2.7.3. Prokaryotik QS inhibitörleri.....	10
2.8. Ekzopolisakkaritler ve Laktik Asit Bakterileri.....	11
2.9. QS ve QQ Konusunda Yapılmış Çalışmalar.....	14
3. MATERYAL ve YÖNTEM	20
3.1. Materyal.....	20
3.2. Yöntem.....	20
3.2.1. Bitkisel ekstraktların ve peynir altı suyunun elde edilmesi.....	20
3.2.2. Laktik asit bakteri kültürlerinin seçimi ve aktifleştirilmesi.....	22
3.2.3. Çözgenlerin, ekstraktların ve fenolik bileşiklerin minimum inhibisyon konsantrasyonlarının ve hücre gelişimine etkilerinin belirlenmesi.....	22
3.2.4. EPS fermentasyonu.....	23
3.2.5. Doğrulama testi	25

3.2.6. Analizler.....	26
3.2.7. İstatistiksel değerlendirme	28
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	29
4.1. Bitkisel Ekstraktların Elde Edilmesi.....	29
4.2. Çözgenlerin ve Ekstraktların Hücre Gelişimine Etkileri.....	31
4.2.1. Uygun Ekstraksiyon çözgeninin belirlenmesi.....	31
4.2.2. Çözgenlerin LAB suşları hücre gelişimine etkileri.....	42
4.2.3. Ekstraktların Bileşimi.....	38
4.2.4 Ekstraktların LAB suşlarının hücre gelişimine etkileri.....	42
4.3. EPS Fermantasyonuna Ekstraktların QS ve QQ Etkisi.....	56
4.3.1. Kuşburnu ekstraktlarının etkisi.....	56
4.3.2. Tarçın ekstraktlarının etkisi.....	63
4.3.3. Mahlep ekstraktlarının etkisi.....	71
4.3.4. Zerdeçal ekstraktlarının etkisi.....	78
4.3.5. Peynir suyunun etkisi.....	84
4.3.6. Gallik asidin etkisi.....	86
4.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> spp.Biyofilm Oluşumuna Ekstraktların QS ve QQ Etkisi.....	89
5. SONUÇ.....	90
6. KAYNAKLAR.....	93

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1 QS sinyallerini tespit etmek için kullanılan bakteriyel raportör suşları.....	8
Tablo 2.2 QS inhibitörleri olarak bakteriyel enzimler.....	11
Tablo 2.3. Test edilen bitki ekstraktlarının QS inhibitör potansiyeli.....	17
Tablo 3.1. QS-QQ Aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan değişkenler.....	24
Tablo 3.2. Fermantasyonların değerlendirilmesinde kullanılan kinetik parametreler.....	25
Tablo 4.1. EPS üreten LAB suşlarının seçimi.....	30
Tablo 4.2. Ekstraktların ve Peynir Suyunun kimyasal kompozisyonu.....	38
Tablo 4.3. <i>P. aeruginosa</i> spp. biyofilm üretim miktarları.....	89

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Çekirdek algılama devreleri.....	4
Şekil 2.2 AHL Sinyalinin temel yapısı	6
Şekil 2.3. QSİS Tarama sistemlerinin düzeni.....	9
Şekil 3.1. Bitkisel polifenolik bileşiklerin ekstraksiyon yöntemi.....	21
Şekil 3.2. Ekstraktların toplam fenolik analizlerinde kullanılan standart kurve grafiği.....	26
Şekil 3.3. Ekstraktların şeker tayını analizlerinde kullanılan standart kurve grafiği.....	27
Şekil 3.4. Ekstraktların Biüret analizlerinde kullanılan standart kurve.....	28
Şekil 4.1. Bitkisel kaynaklardan fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu.....	30
Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlardaki çözgenlerin (kloroform, etanol, metanol) LAB suşlarının gelişimi üzerindeki antimikrobiyal etkileri.....	33
Şekil 4.3. <i>Lactobacillus plantarum</i> MF232 hücre gelişimine metanol ve etanolün etkisi....	35
Şekil 4.4. <i>Lactobacillus plantarum</i> MF159 hücre gelişimine metanol ve etanolün etkisi...	36
Şekil 4.5. <i>Lactobacillus brevis</i> MF87 hücre gelişimine metanol ve etanolün etkisi.....	36
Şekil 4.6. <i>Lactobacillus namurensis</i> MF210 hücre gelişimine metanol ve etanolün etkisi...	37
Şekil 4.7. Kuşburnu ekstraktlarının LAB suşlarının hücre gelişimine etkisi.....	44
Şekil 4.8. Zerdeçal ekstraktlarının LAB suşlarının hücre gelişimine etkisi.....	47
Şekil 4.9. Tarçın ekstraktlarının LAB suşlarının hücre gelişimine etkisi.....	50
Şekil 4.10. Mahlep ekstraktlarının LAB suşlarının hücre gelişimine etkisi.....	53
Şekil 4.11. Gallik asit çözeltisi ve peynir suyu ekstraktının LAB suşlarının hücre gelişimine etkisi.....	55
Şekil 4.12. Kuşburnu ekstraktlarının <i>L. plantarum</i> MF232 EPS fermantasyonuna etkisi....	58
Şekil 4.13. Kuşburnu ekstraktlarının <i>L. plantarum</i> MF159 EPS fermantasyonuna etkisi....	59
Şekil 4.14. Kuşburnu ekstraktlarının <i>L. brevis</i> MF87 EPS fermantasyonuna etkisi.....	61
Şekil 4.15. Kuşburnu ekstraktlarının <i>L. namurensis</i> MF210 EPS fermantasyonuna etkisi...	62
Şekil 4.16. Tarçın ekstraktlarının <i>L. plantarum</i> MF232 EPS fermantasyonuna etkisi.....	65
Şekil 4.17. Tarçın ekstraktlarının <i>L. plantarum</i> MF159 EPS fermantasyonuna etkisi.....	67
Şekil 4.18. Tarçın ekstraktlarının <i>L. brevis</i> MF87 EPS fermantasyonuna etkisi.....	68
Şekil 4.19. Tarçın ekstraktlarının <i>L. namurensis</i> MF210 EPS fermantasyonuna etkisi.....	70
Şekil 4.20. Mahlep ekstraktlarının <i>L. plantarum</i> MF232 EPS fermantasyonuna etkisi.....	72
Şekil 4.21. Mahlep ekstraktlarının <i>L. plantarum</i> MF159 EPS fermantasyonuna etkisi.....	73

Şekil 4.22. Mahlep ekstraktlarının <i>L. brevis</i> MF87 EPS fermantasyonuna etkisi.....	75
Şekil 4.23. Mahlep ekstraktlarının <i>L. namurensis</i> MF210 EPS fermantasyonuna etkisi....	77
Şekil 4.24. Zerdeçal ekstraktlarının <i>L. plantarum</i> MF232 EPS fermantasyonuna etkisi....	79
Şekil 4.25. Zerdeçal ekstraktlarının <i>L. plantarum</i> MF159 EPS fermantasyonuna etkisi....	80
Şekil 4.26. Zerdeçal ekstraktlarının <i>L. brevis</i> MF87 EPS fermantasyonuna etkisi.....	82
Şekil 4.27. Zerdeçal ekstraktlarının <i>L. namurensis</i> MF210 EPS fermantasyonuna etkisi...	83
Şekil 4.28. Peynir suyunun LAB suşlarının EPS fermantasyonuna etkisi.....	85
Şekil 4.29. Gallik asidin LAB suşlarının EPS fermantasyonuna etkisi.....	87



1. GİRİŞ

Laktik asit bakterileri (LAB) tarafından üretilen ve sentezlenen bileşikler ile ilgili birçok çalışma mevcut olmakla birlikte bu bakteriler tarafından üretilen bileşiklerin bazılarının üretim mekanizmaları ve tetikleyici faktörleri hala tam olarak açıklanamamaktadır. Bu bileşiklerden en dikkat çekici olanlardan birisi de ekzopolisakkaritlerdir (EPS). EPS'ler özellikle LAB türleri tarafından sentezlenebilmektedir. LAB'nin gıda endüstrisinde fermente gıdaların üretiminde yaygın olarak kullanılması EPS'lerin önemini arttırmaktadır. Bazı fermente gıda ürünlerinde LAB'leri tarafından EPS sentezi ürünlere olumlu fizyokimyasal katkılar sağlar iken bazı ürünlerde ise olumsuz etkiler oluşturabilmektedir. Örneğin yoğurt, turşu ve peynir gibi ürünlerin fermentasyonunda kontrolsüz ve aşırı derecede EPS sentezi istenmeyen sorunlara (sünme) neden olurken özellikle ayran, kefir, yoğurt gibi ürünlerde ise kontrollü bir EPS sentezi istenen viskozitenin oluşmasında önemli bir katkı sağlamaktadır. Bu bakımdan bakteriyel EPS sentezinin kontrol altında tutulması ürünlerde istenen veya istenmeyen özelliklerin kontrolüne de olanak sağlayacaktır.

LAB tarafından EPS sentezi ikincil metabolitlerin üretim mekanizması ile ilgili olması sebebi ile sentez ve kontrol mekanizmaları önem arz etmektedir. Özellikle son yıllarda EPS ile benzer özelliklere sahip bakteriyel biyofilm sentezinin Quorum Algılama (Quorum Sensing-QS) ve Quorum İnhibisyon (Quorum Quenching-QQ) sistemleri ile kontrolünü sağlama üzerine bazı çalışmalar ve hipotezler ortaya konmaktadır. Günümüzde EPS sentezinin kontrolünün sağlanmasında, genetik mühendisliği, moleküler biyoloji vb. tekniklerle belirli oranlarda başarı elde edilmekle birlikte, bu çalışmaların maliyetli olması, gerekli tecrübe ve bilgi birikiminin yetersiz olması ayrıca tekrarlanabilirliğinin düşük olmasından dolayı QQ ve QS sistemlerinin dışarıdan kontrolü yolu ile LAB'nin EPS sentezinin kontrol altında tutulması bu çalışmada hedeflenmiştir. Ayrıca; literatürde bu sistemlerin kullanımı ile LAB EPS üretimlerinin kontrolüne yönelik herhangi bir çalışmanın mevcut olmaması çalışmaya özgünlük katmaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

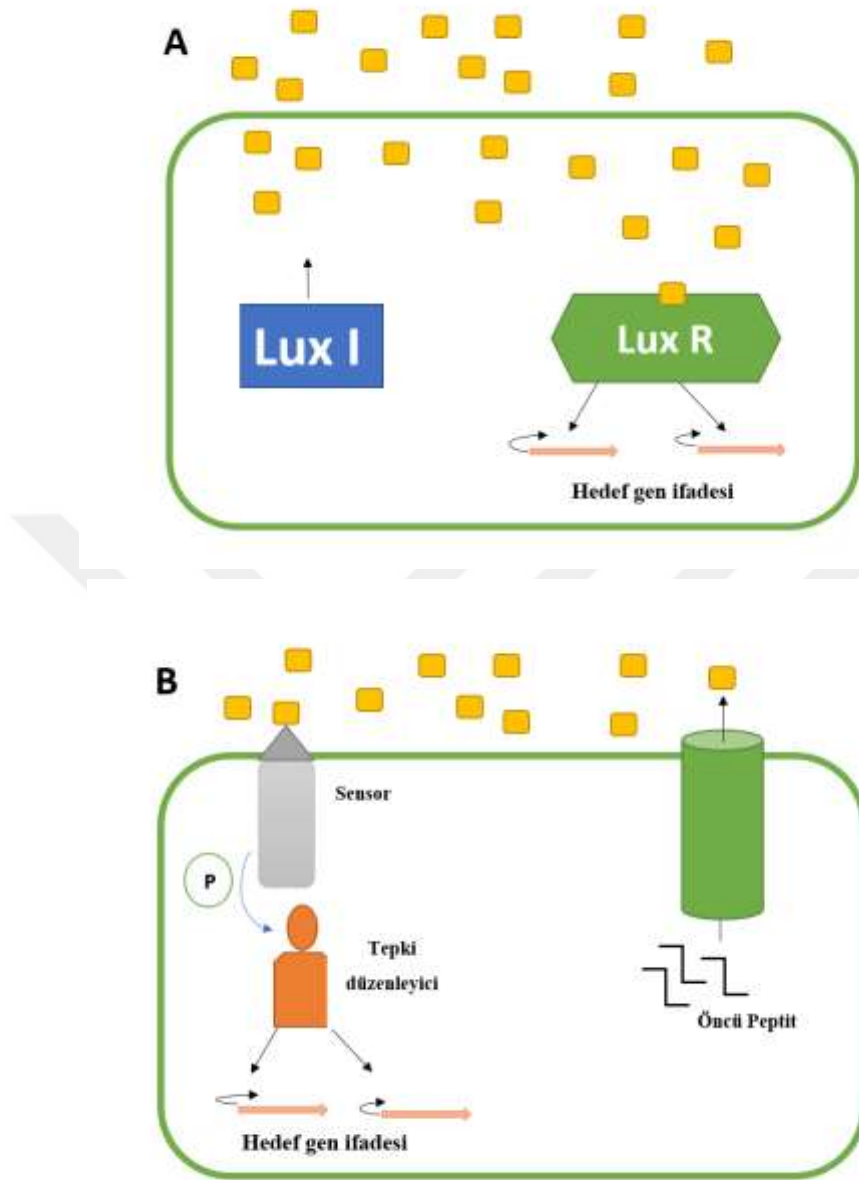
2.1. Quorum Algılama (Quorum Sensing-QS) ve Quorum İnhibisyon (Quorum Quenching-QQ)

Bakteriler, düşük hücre yoğunluklarında tek hücreli organizmalar gibi davranır; ancak, nüfus yoğunluğunun bir eşik seviyesine ulaştığını hissederek davranışlarını 'çok hücreli' tipe kaydırabilirler. Bu aşamada, özellikle öldürücü davranışlarından sorumlu olanlar olmak üzere farklı fenotipler için genleri ifade etmelerini sağlayan küçük sinyal molekülleri aracılığıyla iletişim kurarlar. *Pseudomonas aeruginosa* gibi fırsatçı patojenler "uykuda" yatmayı tercih eder ve popülasyon büyüklükleri konağın savunma mekanizmalarını alt edecek kadar büyüyene kadar öldürücü fenotiplerini ertelemeyi tercih eder. Bakteriye QS olarak adlandırılan bu fenomen, (1) Oligopeptidler (5-10 amino asit siklik tiolaktin) (2) N-açilhomoserin laktonlar (AHL'ler) (3) Furanosil borat (Otoindükleyici-2) (4) Hidroksil-palmitik asit metilester ve (5) Metildodekanoik asit gibi çok çeşitli sinyaller aracılığıyla çalışır (Dong ve Zhang, 2005; McDougald ve ark., 2007). En çok çalışılan iki QS sinyali şunlardır: (i) 70'den fazla Gram-negatif bakteri türü tarafından üretilen, hücre zarı boyunca yayılan ve hücre içindeki düzenleyici proteinlere bağlanan N-açil-homoserin-laktonlar (AHL) ve (ii) Gram- membrana bağlı reseptör histidin kinazlar aracılığıyla çalışan gram pozitif bakteriler (Waters ve Bassler, 2005; Amara ve ark., 2011).

Quorum Algılama (QS), birçok mikroorganizma tarafından yerel hücre yoğunluklarını algılamak için kullanılmaktadır. Hücreden hücreye iletişim sistemlerini ifade etmektedir. Bu algılama mekanizması, hücreler tarafından küçük sinyal moleküllerinin üretimine, salgılanmasına ve algılanmasına dayanır. Sinyal molekül konsantrasyonu belli bir eşik değere ulaştığında, "yeterli çoğunluğun" mevcut olduğu anlaşılır ve iletişim kuran mikroorganizmalar, gen ekspresyon profillerinde koordineli bir değişiklik üstlenir. Sonuç olarak, bu mikroorganizmalar, virülans faktörlerinin salgılanması, biyofilm (EPS) oluşumunun başlaması, spor oluşumu, gelişimin başlaması veya durması, kök nodülasyonu, biyoluminesans ve ikincil metabolitlerin salgılanması gibi bazı faaliyetleri başlatırlar (Swati ve ark., 2010). Günümüze kadar birçok QS sinyali yapısal olarak tanımlanmıştır. Birçoğu türe özgü olsa da bazı QS sinyalleri birçok tür tarafından da tanınabilmekte ve sonuç olarak da türler arası iletişime olanak sağlamaktadır. Bazı canlılar, heterolog bakteriler arasındaki

besin için olan rekabeti azaltmak için QS'yi bozan enzimler salgılar. Aslında, çok hücreli organizmalar bakteriyel QS iletişimlerini “dinler” veya onları “karıştırır” ya da bilgiyi kendi çıkarları için kullanırlar (Joint ve ark., 2007). QS sisteminin temel çalışma mekanizması, doğrudan veya algılayıcı bir kinaz enzim aktivasyonu yoluyla bir sinyalin transkripsiyonel düzenleyiciler ile etkileşimini kapsamaktadır. QS sinyalleri aynı zamanda "otomatik indükleyiciler (AI)" olarak da adlandırılır. QS sinyallerinin hücreler tarafından tanınmalarının, genellikle kendi transkripsiyonlarını arttırması ile sonuçlanması bu şekilde isimlendirilmelerinin sebebidir (Boedicker ve ark., 2009; Carnes ve ark., 2009; Swati ve ark., 2010).

QS sisteminin, hücrel biyofilmlerin (EPS) sentezinde yer aldığı düşünülmektedir. Biyofilmlerin karmaşık ve çok katmanlı yapıları, bakteri topluluklarının sabit ve korunaklı bir ortamda yaşamalarına yardımcı olmaktadır (O'Toole ve ark., 2000; Greenberg 2003; Oggioni ve ark., 2006). Biyofilm oluşumu, mikrobiyal yüzey bağlanması, hücre-hücre toplanması ve çoğalması, EPS sentezi, büyüme, olgunlaşma ile başlayan ve son olarak biyofilm oluşumu ile devam eden çok aşamalı kapsamlı bir süreçtir (Camara ve ark., 2002; Yarwood ve Schlievert 2003). QS sistemlerinin, biyofilm oluşumunun tüm aşamalarında rol oynadığı düşünülmektedir. QS sistemi, biyofilm içindeki popülasyon yoğunluğunu ve metabolik aktiviteyi, mevcut besin ihtiyaçlarına ve kaynaklara uyacak şekilde düzenlemede etkin bir rol alır. Biyofilmlerde bulunan bakteriler, aynı türlere ait diğer bakterilerden belirgin bir şekilde farklı transkripsiyon programlarına sahiptir (Jamuna Bai ve ark., 2011). QS iletişim sistemlerinin bakterilerin biyofilm ortamından dışarıya salınmasında da işlevi olduğu bulunmuştur. Biyofilmler tarafından hücreler için sağlanan korunaklı sığınaklar olup, bakterilerin içinde bulunduğu ortamdan dış ortama yayılma sorununu ortaya çıkarmaktadır. Biyofilmlerdeki hücre popülasyon yoğunlukları yükseldiğinde, bakteriler çevreye salınmaktadır. Hücre yoğunlukları yüksek olduğu zaman peptitler QS kontrolü altında, biyofilm içindeki bakterilerin serbest bırakılması için kullanılabilir (Novick ve ark., 2003).



Şekil 2.1. Çekirdek algılama devreleri

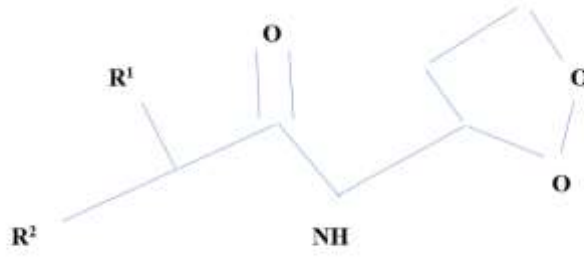
Tipik Gram-negatif LuxIR devrelerinde, LuxI tipi protein, bir AHL oto indükleyicisinin sentezini katalize eder. LuxR tipi protein, AHL'ye bağlanır ve hedef genlerin ekspresyonunu kontrol eder. Tipik Gram pozitif AIP iki bileşenli çekirdek algılama devrelerinde öncü peptitler, ayrılmış taşıyıcılar tarafından bölünür, değiştirilir ve ihraç edilir. Ortaya çıkan AIP'ler iki bileşenli sensör-histidin kinazlar tarafından saptanır ve duyuşal bilgi, aynı kökten gelen yanıt düzenleyicilerin fosforilasyonu (P) ile iletilir ve bu da hedef gen ekspresyonunu

kontrol eder. Oto indükleyici bağlanmasından sorumlu proteinler gri renkte gölgelenmiştir (Şekil 2.1).

2.2. N-açıl-homoserin-lakton (AHL) Tabanlı QS

AHL bağımlı bakteriyel QS sistemlerinde, tek bir sentaz düzenleyici kompleks spesifik genlerin ifadesinden sorumludur. Bu durumda, sinyal molekülleri, sentaz geni (luxI gibi) tarafından düşük bir konsantrasyonda yapısal olarak sentezlenir ve hücrelerin içine ve çevresinde dağıtılır. Yüksek hücre yoğunluğunda reseptörüne bağlanır ve transkripsiyonel düzenleyiciyi (LuxR) aktive eder. AI-LuxR, DNA'ya (genin promotör bölgesi) bağlanır ve QS sistemi tarafından düzenlenen genlerin ekspresyonunu tetikler (Zhang ve ark., 2002).

Üç reseptör LasR, RhIR ve QscR, bağımsız ve örtüşen regülonlara da sahiptir, öyle ki LasR, RhIR'yi düzenler ve LasI, QscR'yi düzenler (Lequette ve ark., 2006). Ek olarak, *Sinorhizobium meliloti*'nin Sin, Tra ve Mel olarak adlandırılan üç QS sistemine sahip olduğu bildirilmiştir (Marketon ve ark., 2002). Burada Sin sistemi, konakçısı *Medicago sativa*'da etkili nitrojen sabitleme nodüllerinde yer alan C14HSL'den C18HSL'ye kadar 14 karbondan daha uzun açıl zincirlerine sahip AHL'ler üretir (Marketon ve ark., 2002). *Vibrio harveyi* QS, HAI-1, CAI-1 ve AI-2 olarak etiketlenen AI'lar tarafından düzenlenen üç farklı yoldan çalışır. Bu durumda, OHC4HSL'nin kimyasal yapısına sahip HAI-1, türe özgü bir AHL yolu sağlar, CAI-1 — (S)-3-hidroksitridekan-4-one, bakterilere jenerasyonlar arası iletişimde yardımcı olur. Burada AI-2, furanosil borat diester, türler arası iletişime özgüdür (Bassler ve ark., 1994, 1997; Henke ve Bassler, 2004; Higgins ve ark., 2007). Başlangıçta *Vibrio harveyi*'de rapor edilen AI-2 düzenlenmiş QS sisteminin daha sonra çok çeşitli Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerde meydana geldiği bulunmuştur (Miller ve Bassler, 2001; Waters ve Bassler, 2005)



Şekil 2.2 AHL sinyalinin temel yapısı (molekül R1 = H, OH, veya O ve R2 = C1–C18) (Rasmussen TB ve ark., 2006)

2.3. Peptit Bazlı QS

Gram pozitif bakteriler, çevreye salgılanan oligopeptitler aracılığıyla QS kaynaklı gen ekspresyonunu düzenler. Bu küçük hücre dışı peptitler (Otoindükleyici peptid, AIP) 2 bileşenli bir sinyal sistemi aracılığıyla çalışır. Gram pozitif bakterilerden *Bacillus subtilis*'in iletişim kurabileceği en az 4 grubu vardır. Varyasyon, ComX (hücre dışı bir feromon) ve ComP'nin (histidin kinaz) sensör alanı konumuna göre 4 gruba mevcuttur (Tran ve ark., 2000; Tortosa ve ark., 2001). Benzer şekilde, *Staphylococcus aureus* Agr sistemi de bunların 4 ayrı gruba ayrılmasından sorumludur. Sistemin benzersizliği her birinde bağımsız olarak korunur (Lyon ve Muir, 2003).

2.4. Diğer QS Sistemleri

Bakterilerde QS sisteminde doğal bir varyasyon gözlenir. Kendi sinyal moleküllerini sentezlemezler, ancak başkaları tarafından üretilenlere yanıt verirler: (i) LuxR'nin bir homologu olan SdiA'ya sahip olan *Escherichia coli* (Van Houdt ve ark., 2006) ve (ii) kistik olan *Burkholderia cepacia* fibroz hastaları, *P. aeruginosa* tarafından üretilen QS sinyallerini algılar ve bunlara yanıt verir (Riedel ve ark., 2001). Ökaryotik patojenik bir maya olan *Candida albicans*'taki QS işlemleri, maya hücrelerinin miselyum formuna dönüştürülmesi için gerekli olan farnesolün üretilmesiyle sonuçlanır (Hornby ve ark., 2001).

QS sistemi farklı mekanizmalarla engellenebilmektedir. Bunlar; i) AHL ile aynı kökenli reseptör proteininin veya AHL sentazın aktivitesini azaltarak, ii) QS sinyal moleküllerinin

üretimini inhibe ederek, iii) AHL'nin bozunması ve iv) sinyal moleküllerinin analogları olarak sentetik bileşikler kullanarak sinyal moleküllerini taklit etme şeklinde sıralanabilir. QS sinyal moleküllerinin (AHL'ler) enzimatik olarak tahrip edilmesi en çok kullanılan ve uygulanan mekanizmalardan biridir (Kalia ve ark., 2013). Bitki ekstraktlarının kimyasal yapılarındaki bazı bileşiklerin QS sinyalleriyle (AHL) benzerliklerinden ve sinyal reseptörlerini (LuxR/LasR) bozma yeteneklerinden dolayı QS inhibitörü görevi gördüğü bildirilmektedir (Kalia., 2011). QS sinyalleri, enzimatik olarak bozulabilir. Üç tür enzim AHL sinyallerini hedef almaktadır. Bunlardan; AHL-laktonaz, AHL'de bulunan homoserin lakton halkasının ester bağını hidrolize etmektedir. QS sinyallerinin, AHL'yi parçalayan ve ayrıca 3-oksoodekanoik asit ve homoserin laktonu (HSL) oluşturan açılaz enzimi tarafından indirgendiği bulunmuştur. Oksidoredüktaz olarak bilinen üç sınıf enzim AHL degradasyonuna sebep olmaktadır. Ayrıca katalitik antikorlar AHL sinyalini hidrolize edebilmektedir (Kaushik ve ark., 2019).

2.5. QS Sinyallerini Algılama

Biyosensörlere duyulan ihtiyaç, çeşitli organizmalar tarafından üretilen QS sinyallerindeki artan çeşitlilik nedeniyle oldukça erken fark edilmiştir. Sebep ve sonuçlar arasındaki bağlantıyı kurmak için Tablo 2.1'de listelenen farklı araştırmacılar tarafından belirli bir süre boyunca çalışılmıştır (Bassler ve ark., 1993; Fuqua ve Winans, 1996; Givskov ve ark., 1996; McClean ve ark., 1997; Shaw ve ark., 1997; Swift ve ark., 1997; Wood ve ark., 1997; Winson ve ark., 1998; Lindum ve ark., 1998; Steidle ve ark., 2001; Venturi, 2006). Bu biyomonitör suşları AHL'ler gibi QS sinyallerinin hassas, nicel ve gerçek zamanlı tespitine izin verir.

AHL sentaz enzimi, promotör aktivitesi, eksojen QS sinyalleri tarafından indüklenir. Burada alıcı aynı kökenli LuxI promotörüne bağlanan ve belirli genlerin ekspresyonunu başlatan AHL'lerin mevcudiyeti ile aktive olur. İlgili genlerin ekspresyonu, sinyal moleküllerinin konsantrasyonu ile orantılıdır (Swift ve ark., 1997; Winson ve ark., 1998). Kısaca, kolayca tanımlanabilen bazı fenotiplerle doğal QS sistemini taklit eder (Tablo 2.1). Her haberci suşu bir dizi QS sinyali tespit etse de bunların tamamlayıcılıkları çok çeşitli AHL'lerin ve hatta AHL analoglarının veya taklitlerinin saptanmasına izin verir (Teplitski ve ark., 2000; Steidle ve ark., 2001; Someya ve ark., 2009). *Chromobacterium violaceum*, 4-6 karbon açıl yan zincirli QS sinyal bileşikleri için yüksek duyarlılığa sahiptir (McClean ve ark., 1997; Winson

ve ark., 1998). *C. violaceum* CV026 biyosensörünün AHL'nin 3-hidroksi türevlerini tespit edememesi, *P. fluorescens*'in mevcut olabileceği potansiyel vakaları aydınlatmada yardımcı olabilir (Cha ve ark., 1998).

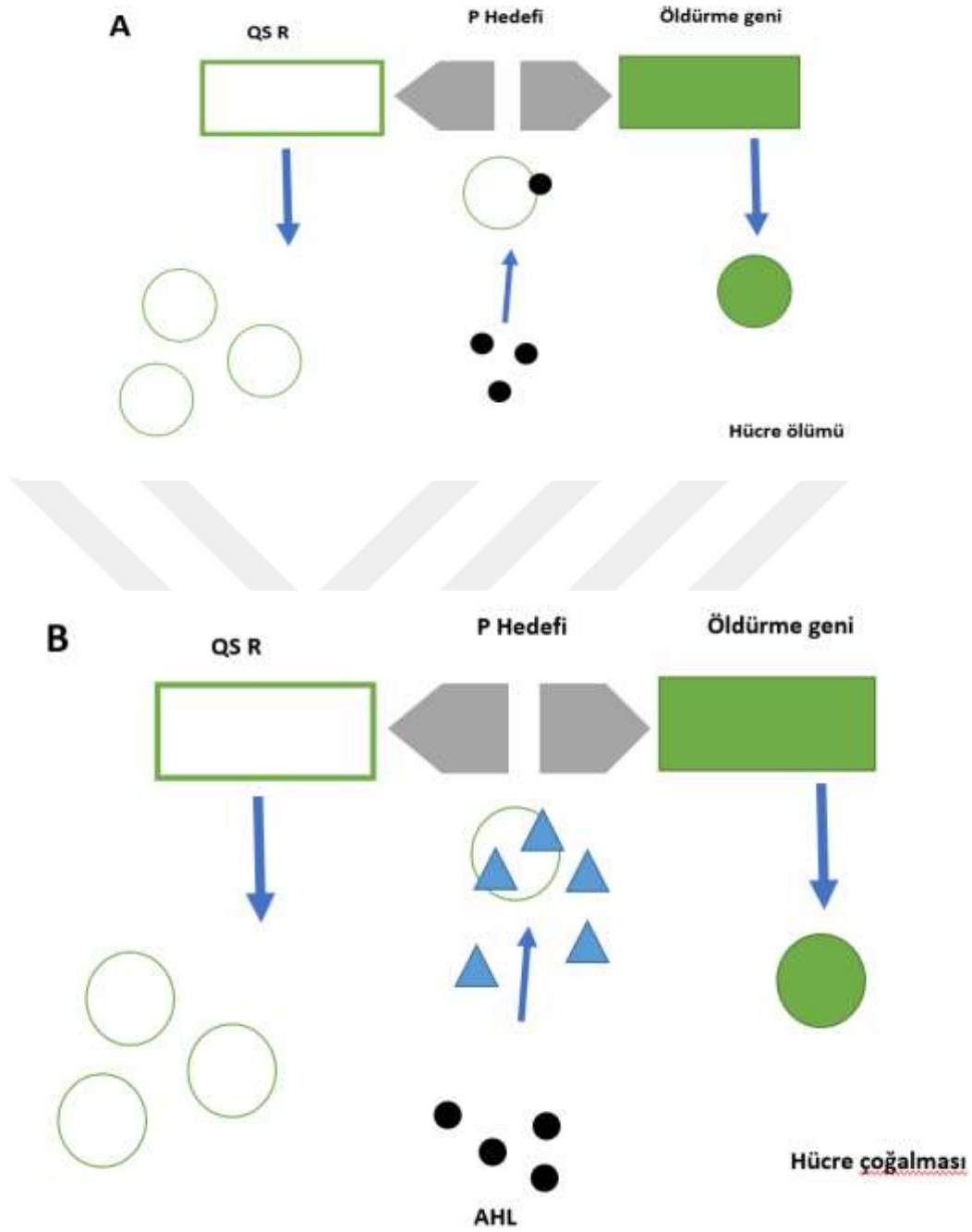
Uzun zincirli AHL inhibitör taraması için eşit derecede etkili bir başka biyosensör, *Agrobacterium tumefaciens* NT1'dir. Bu biyosensör türünün en iyi yanı, çok düşük konsantrasyonlarda çok çeşitli AHL'lere yanıt verme yeteneğidir (Shaw ve ark., 1997). Uzun zincirli AHL'leri hedefleyebilecek QSI'leri tanımlamak için gereken üçüncü raportör türü *S. meliloti* ile temsil edilir (Llamas ve ark., 2004) (Tablo 2.1).

Tablo 2.1 QS sinyallerini tespit etmek için kullanılan bakteriyel raportör suşları

Organizma	QS sinyali	Fenotip	Referans
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	C6HSL'den C14-HSL'ye	β -galaktosidaz aktivitesi	Fuqua ve Winans, 1996
<i>A. tumefaciens</i> suşu NT1	C4HSL hariç tüm uzunluklarda 3-okso-, 3-hidroksi- ve 3-süstitüe edilmemiş yan zincirlere sahip AHL'ler (C6-C14HSL)	β -galaktosidaz aktivitesi	Shaw ve ark., 1997
<i>Chromobacterium violaceum</i>	AHL'lerin geniş ana bilgisayar yelpazesi	Violacein pigment üretimi	McClellan ve ark., 1997
<i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın	C4HSL	biyoluminesans	Swift ve ark., 1997
<i>Vibrio harveyi</i>	AI-2	biyoluminesans	Bassler ve ark., 1993
<i>Vibrio harveyi</i>	AI-1	biyoluminesans	Bassler ve ark., 1993

2.6. QSI Seçim Kriterleri

QS tarafından düzenlenen gen ekspresyonunun etkin bir şekilde azaltılması, bakteri veya konakçı üzerinde herhangi bir olumsuz etki olmaksızın belirli bir QS düzenleyicisi için oldukça spesifik olması olası değildir (Rasmussen ve ark., 2005). Son olarak düşük moleküler ağırlıkları nedeniyle antijenite göstermeyen bu QSI'lerin bulaşıcı hastalıklara karşı ilaç keşfini hızlandırması beklenmektedir.



Şekil 2.3. QSİS Tarama sistemlerinin düzeni

Bir AHL alıcısı/yanıt düzenleyicisi, dışarıdan sağlanan AHL tarafından etkinleştirilir. Aktive LuxR homologu (QS R), büyümenin durmasına veya hücre ölümüne yol açan toksik bir proteini kodlayan bir genin (öldüren gen) ifadesini kontrol eden, QS tarafından düzenlenen bir promotörden (P Target) gelen ifadeyi yukarı doğru düzenler. Bir QSI bileşiği

mevcutsa, AHL sinyalinin alınması bloke edilir ve öldürücü genin ekspresyonu engellenerek, tarama bakterisinin büyümesine izin verilir (Şekil 2.3) (Rasmussen TB ve ark., 2006).

2.7. QS İnhibitörleri

2.7.1. Sentetik QS inhibitörleri

AHL yapısı üç prosedürle geliştirilmektedir: lakton halkasını korumak için açıl yan zincirine ikame, açıl yan zincirini değişmeden bırakmak için lakton halkasına ikame ve son olarak hem açıl yan zincirinin hem de lakton halkasının kapsamlı modifikasyonlarıdır.

Açıl yan zincirine C-3 atomu yerine kükürt eklediğinde hem LuxR hem de LasR kontrollü QS raportörlerinde ifadeyi bloke edebilen analoglar yaratır. 3-oxo-C6 HSL/LuxR kontrollü sistemde başka bir QSI bileşikler, en azından yan zincirin sonundaki aril grubu ikame edilerek bulunur. İkame edicinin boyutu bir fenil grubununkinden fazla arttığında antagonistik etki kaybolur. Aril süstituentlerinin ve siklik alkollerin boyut farkı düşükse, aril bileşikler LuxR proteinindeki aromatik amino asit kalıntıları ile normal aktivasyonu önlemek için etkileşime girer.

2.7.2. Doğal QS inhibitörleri

Bitkiler ve funguslar, QSI bileşiklerinin izole edildiği doğal kaynaklardır. QS bakterileri uzun yıllardır hem funguslar hem de bitkilerle birlikte var olduğundan, bazılarının patojenik yeteneğin kolonileşmesini azaltmak, rekabet etmek ve bakterileri aktarmak için QSI bileşikler üretmesi beklenebilir. Doğal ekosistemlerde bir arada bulunan çok sayıda organizma vardır. Bakteriler, aralarında iş birliği yapmak ve ark.yle rekabet etmek için iletişim kurulabilir.

2.7.3. Prokaryotik QS inhibitörleri

QQ enzimleri üreten çeşitli organizmalar: (i) *Actinobacteria- Streptomyces* ve *Rhodococcus*, (ii) *Firmicutes-Bacillus*, *Arthrobacter* ve *Oceanobacillus* (iii) *Bacteroidetes Tenacibaculum*, (iv) *Cyanobacteria-Anabaena*, (v) *Proteobacteria Comomonas*, *Halomonas*, *P. aeruginosa*,

Ralstonia Acinetobacter, *Variovorax paradoxus*, *A.tumefaciens*, *Alteromonas*, *Klebsiella pneumonia*, *Hyphomonas* ve *Stappia* dır. Dört tip enzim, QS sinyallerini ayrıştırır ve AHL-laktonazlar, dekarboksilazlar lakton halkasını hidrolize eder. Fakat açıl yan zinciri, AHL-açılaz ve deaminaz tarafından parçalanır (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. QS inhibitörleri olarak bakteriyel enzimler

QS inhibitörü kaynağı	Enzim	QS sinyali
<i>Acinetobacter</i> sp. soy C1010	laktonaz	AHL
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AHL-laktonaz	AHL
<i>Arthrobacter</i> sp. IBN110	AHL-laktonaz	AHL
<i>Alteromonas</i> sp. strain 168	açılaz	C4HSL ve 3OC12-HSL 5
<i>Bacillus thuringiensis</i>	laktonaz	AHL
<i>Burkholderia</i> suşu GG4	AHL -oksidoreduktaz	3OC6HSL
<i>Bacillus megaterium</i>	AHL-oksidaz	C4HSL ve 3OC12HSL

2.8. Ekzopolisakkaritler ve Laktik Asit Bakterileri

Dünya genelinde Laktik Asit Bakterileri (LAB), süt, et, hububat ve meyve-sebze gibi çok çeşitli ürünlerin muhafazasında, duyuşal özelliklerini ve besin değerini iyileştirmede ürün fermentasyonlarında yer almaktadır. LAB, diğer bazı bakteri türlerinde olduğu gibi, birkaç polisakkarit türü sentezleyebilmekte ve bunlar hücredeki yerleşimlerine göre sınıflandırılmaktadır. Hücre içerisinden hücre dışına doğru sentezlenen polisakkaritler ekzo-selüler polisakkaritler (EPS) olarak adlandırılmaktadır. Bunlar yapışkan bir tabaka oluşturabilen kapsüller polisakkaritler olarak da bulunabilmektedir. EPS'ler ayrıca ortama gevşek bir yapıda veya yapışkan bir sıvı olarak salgılanırlar (Patricia ve ark., 2002). Bu maddelerin doğal ortamda koruyucu bir işlevi bulunmaktadır. Bunlar; hücreleri kurumaya, fagositoza ve protozoa ve faj saldırısına, antibiyotiklere, toksik bileşiklere ve ozmotik strese karşı temel bir koruma sağlayabilmektedir. Ayrıca; EPS'ler hücre tanımada, yüzeylere yapışmada ve çeşitli ekosistemlerin kolonizasyonunu kolaylaştıran biyofilmlerin üretiminde

büyük rol oynarlar (Looijesteijn ve ark., 2001). EPS, biyofilm oluşumunda yer alan temel bir maddedir ve proteinler, lipitler ve nükleik asitler gibi toplam organik maddelerin % 50-90'nı oluşturabilirler (Vu ve ark., 2009). Birçok LAB türleri, EPS olarak adlandırılan polisakkarit polimerleri salgılama yeteneğine sahiptir. Bu türler arasında çoğunlukla Laktobasiller, Streptokoklar ve Laktokoklar bulunmaktadır (Nishimura ve ark., 2003). Ayrıca; bazı Bifidobakteri türleri de EPS sentezleyebilmektedir (Salazar ve ark., 2009).

EPS üreten LAB'leri, fermente süt ürünlerinin kıvamına ve reolojisine olan etkilerinden dolayı süt endüstrisinde önemli bir yere sahiptir. EPS polimerleri, güvenli olarak kabul edilen (GRAS) LAB starter kültürleri tarafından üretilen doğal kıvam vericiler olarak düşünülebilir. LAB tarafından üretilen EPS, GRAS statüsü nedeniyle gıda endüstrisi tarafından büyük ilgi görmektedir (Badel ve ark., 2011; Zannini ve ark., 2016). EPS'lerin fizikokimyasal özellikleri viskozite yeteneklerini belirler. Bu nedenle, bu biyopolimerlerin yapı-işlev ilişkisinin temel bilgisi, belirli bir teknolojik uygulama için uygun polimerleri seçmek veya tasarlamak için çok önemlidir (Patricia ve ark., 2010). Fermente bir ürün olan yoğurtların en önemli tekstürel özellikleri sertlik, kıvam ve su tutma kabiliyetidir. Bu özellikler jel yapısı ile ilişkilidir. Ayrıca; bu yapı fermantasyonda kullanılan starter kültürlerin türlerinden de etkilenebilir. LAB tarafından üretilmiş EPS'lerin, yoğurtlara ilave edilmesiyle birçok reolojik özelliğin iyileştiği bilinmektedir (Hess ve ark., 1997). Diğer taraftan EPS üreten suşlarla yapılan yoğurtların sertliği, EPS miktarı arttıkça azalabilmektedir. EPS, kazein miselleri arasındaki interaksiyonlara müdahale ederek daha yumuşak bir pıhtı oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu açıdan fermantasyonlarda oluşan EPS miktarının kontrolü ürünün fiziksel kalitesi açısından önemlidir (Hassan ve ark., 1996).

LAB EPS'lerinin, nihai ürünlerin viskozitesini, dokusunu, kararlılığını ve tat algısını iyileştirmek için günümüzde kullanılan bitki veya deniz yosunundan elde edilen hidrokolloidlerin yerini tamamen veya kısmen alabileceği düşünülmektedir. Özellikle, LAB EPS'leri, yoğurt ve taze peynirler gibi fermente süt ürünlerinin reolojik ve duyuşal özelliklerini iyileştirerek, fermantasyon sırasında veya depolama sırasında istenmeyen bir özellik olan peynir altı suyunun ayrılmasını önleyebilirler (Lynch ve ark., 2018). Son zamanlarda, gıda sektöründe endüstriyel uygulama için doğal polimerlere yönelik artan talep, fermantasyon aşamasında EPS üreten suşların kullanımına olan ilgiyi arttırmıştır (Zannini ve ark., 2016). LAB'nin stres direnci üzerine birçok çalışma yapılmaktadır. Çoğu çalışma LAB'nin mide asitlerine karşı olan direncine odaklanırken, bazıları da gıda

bozulmasına odaklanmaktadır. Yüksek asetik asit konsantrasyonlarında yaşayabilen bazı *L. acetotolerans* ve *L. fructivorans* türleri, sirkenin bozulmasından sorumludur (Entani ve ark., 2000). Gıda bozulmasına veya kontaminasyonuna neden olan LAB türleri, *L. plantarum*, *L. brevis* ve *L. fructivorans*'dir. *L. plantarum*, birçok gıda maddesinde bozulma ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca; biyofilm-EPS oluşumu olası bir kontaminasyon kaynağı olarak gösterilmiştir (Hiromi ve ark., 2008).

Bazı bakterilerin ve mikroorganizmaların insan sağlığı üzerinde olumlu bir etkisi olduğu açıktır. Günümüzde, probiyotik bakteri içeren fonksiyonel gıdaların geliştirilmesi hem sağlık hem de ekonomik faydaları olan gittikçe kapsamı genişleyen bir pazar konumundadır. Probiyotikler, sağlığa faydalı canlı mikrobiyal gıda bileşenleri olarak tanımlanmaktadır (Salminen ve ark., 1998). Yaşadığımız dönemde kullanılan probiyotik bakteriler, çoğunlukla EPS üreten Laktobasiller ve Bifidobakterilerdir. EPS üreten suşların sağlık üzerine iyileştirici etkisinin bu biyopolimerlerin biyolojik aktiviteleriyle ilişkili olduğu öne sürülmüştür. Ekzopolisakkaritler, prebiyotikler olarak veya antitümör, ülser önleyici, immüno-modülatör veya kolesterol düşürücü aktiviteleri nedeniyle insan sağlığına katkıda bulunabilmektedir (De Vuyst ve Degeest, 1999). Nakajima ve ark., (1995), *L. lactis subsp. cremoris* SBT 0495 suşundan elde ettikleri EPS'leri intraperitonel olarak uyguladıkları farelerde spesifik antikörlerin üretimini arttırdığını göstermişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada ise, *Streptococcus cremoris* suşundan izole edilen EPS'nin kimyasal yapısı incelenmiş ve nötr ve asidik olarak iki polisakkarit fraksiyonuna sahip olduğu bulunmuştur. APS-1073 fraksiyonunun, esas olarak murin B lenfositleri için etkili mitojenik aktiviteye sahip bir fosfopolisakkarit olduğu ve fosfat grubunun bu EPS'nin mitojenik indüksiyonunun bir tetikleyicisi olarak hareket ettiğini keşfetmişlerdir. LAB tarafından üretilen hücre dışı polisakkaritler, T-lenfositlerin çoğalması gibi diğer immünolojik fonksiyonları da geliştirmektedir (Forsen ve ark., 1987). Kefir tanelerinden elde edilen suda çözünür EPS'nin (KGF-C), oral olarak alındığında tümör büyümesini geciktirme özelliğine sahip olduğu bulunmuştur. EPS ile oral immün güçlendirmenin, muhtemelen T-hücresi yoluyla indüklendiği tespit edilmiştir (Zubillaga ve ark., 2001). Yoğurt starter kültürü olarak kullanılan *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* OLL 1073R-1 suşu tarafından üretilen EPS'lerin antitümör aktivitesi gösterdiği rapor edilmiştir (Kitazawa ve ark., 1998).

QS kontrolü için etkin maddelerinin taranmasına yönelik yapılan çalışmalarda tıbbi bitki kaynaklarına daha fazla önem verilmektedir. *Psoralea corylifolia* L. bitki tohumlarından

farklı çözümler kullanılarak (metanol, benzen, etil asetat, aseton) elde edilen ekstraktların anti-QS aktiviteleri incelenmiştir. Yapılan bu çalışmada metanol ekstraktının, patojenik bakteriler (*Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* ve *Aeromonas hydrophila*) ve biyo-monitör test bakterisi *Chromobacterium violaceum* CVO26 üzerinde QS aktivitesini azalttığı bulunmuştur. Metanol ekstraktının bakteriler üzerinde anti-QS aktivitesi sonucu EPS, elastaz, kitinaz ve proteaz sentezlerinde değişimler meydana gelmiş ve tüm bakterilerde biyofilm oluşumunu anlamlı bir şekilde azalttığı bulunmuştur. Yapılan bu çalışma ile, ekstrakt içerisinde bulunan bakuchiolün QS ile ilgili proteinlere bağlandığı ve biyofilm oluşumunu engellediğini ortaya konmuştur (Husain ve ark., 2018).

2.9. QS ve QQ Konusunda Yapılmış Çalışmalar

Zhang ve ark., (2014) yaptıkları çalışmada, polifenoller ve flavonoidler açısından zengin olan *Rosa rugosa* çayının polifenol ekstraktının (RTP) anti-biyofilm ve Quorum algılama önleyici potansiyellerini araştırmışlardır. RTP'nin hücre gelişimini etkilemeden *Chromobacterium violaceum* 026 suşunda QS kontrollü violacein pigmenti üretiminde %87,56 oranında azalma ile spesifik olarak inhibe ettiğini bulmuşlardır. Ayrıca, RTP'nin konsantrasyona bağlı bir şekilde sırasıyla *Escherichia coli* K-12 ve *Pseudomonas aeruginosa* PAO1'in hareketliliğinde (%84,90 ve %78,03) ve biyofilm oluşumunda (%67,02 ve %72,90) inhibisyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu bulgular ile, RTP'nin potansiyel olarak raf ömrünü ve gıda güvenliğini artırmak için yeni bir QS inhibitörü ve/veya anti-biyofilm maddesi olarak geliştirilebileceğini kuvvetle önermişlerdir.

Erdönmez ve ark., (2018) yaptıkları çalışmada; Gram-pozitif ve Gram-negatif patojenik bakteriler üzerinde *Viscum album* L. bitkisinin gövde, yaprak ve meyve gibi bölümlerine ait etanol, kloroform ve diklorometan:metanol ekstraktlarının antimikrobiyal, anti biyofilm ve anti-quorum sensing aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Ekstraktların 50 mg/mL'lik konsantrasyonda antimikrobiyal etki göstermediği için anti-quorum sensing ve antibiyofilm etkilerinin belirlenmesi için bu değerin altındaki konsantrasyonları kullanılmışlardır. En iyi biyolojik aktivite ise diklorometan:metanol olarak belirlenmiştir. Yaprak ve gövde kısımlarının antimikrobiyal, anti-biyofilm ve anti-quorum sensing aktivitesi, meyve ekstraktına göre daha yüksek verimlilik göstermiştir. Araştırmacılar *V. album* özütlerinin, biyofilm ya da QS inhibisyonu yoluyla mikrobiyal enfeksiyonları tedavi etme potansiyeline sahip olduğu kanısına varmışlardır.

Güney Hindistan bölgesinde yetiştirilen ve 22 farklı tıbbi bitki ile yapılan bir çalışmada; *Cuminum cyminum*'un bitkisinden elde edilen metanolik ekstraktların mikrobiyal biyofilm oluşumunun bozulmasını sağladığı ve minimum inhibisyon seviyeleri altında (MIC - 2 mg/mL) *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Proteus mirabilis* ve *Serratia marcescens* hücrelerinde in vitro biyofilm oluşumunu güçlü bir şekilde inhibe ettiği bulunmuştur. Ayrıca, mevcut araştırmanın sonucunda, *C. cyminum* ekstraktlarının, flagellar hareketlilik ve EPS üretimini azalttığını ve açıl homoserin lakton (AHL) tarafından düzenlenen fizyolojik fonksiyonlara güçlü bir şekilde etki ettiğini ortaya koymuşlardır. Moleküler tanılama analizinin sonuçlarına göre ise, *C. cyminum* ekstraktlarında bulunan metil öjenolün (ME) Quorum Sensing inhibitörleri (QSI) olarak etki ettiği tespit edilmiştir (Packiavathy Vasantha ve ark., 2012).

Bali ve ark., (2019) bazı fitokimyasalların (kurkumin, kuarsetin, apigenin, gallik asit vb) QS'ye karşı inhibitör potansiyelini araştırmış ve karşılaştırmışlardır. Fitokimyasalların besiyerinde *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 suşunun pigment oluşumuna ve *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşunun ise biyofilm yeteneklerine etkisini incelemişlerdir. Fitokimyasalların anti-QS potansiyeli, 46,87 ile 750 µg/mL arasında değişen minimum inhibitör konsantrasyonlarda, disk difüzyon testi ile pigment inhibisyonu değerlendirilmiştir. *C. violaceum* suşunda anti-QS ve antibiyofilm aktiviteleri pirogallol ve gallik asit dışındaki tüm fitokimyasallarda gerçekleşmiştir. Araştırmacılar ayrıca, biyofilm oluşumunun da tüm fitokimyasalların varlığında önemli ölçüde inhibe edildiğini, kuarsetin, kurkumin, apigenin ve luteolin'in *C. violaceum* QS sistemine karşı umut verici ajanlar olabileceğini ortaya koymuşlardır.

Amerika Birleşik Devletleri'nin güney bölgesinde doğal olarak yetişen tıbbi bitki *Liriodendron tulipifera*, *Aralia spinosa* ve *Quercus alba* ekstraktlarının çoklu ilaç direncine sahip patojenik bakterilerin gelişimini engellemesi üzerine yapılan çalışmada, ekstraktların *Staphylococcus aureus* hücrelerinde QS inhibisyonu yolu ile biyofilm oluşumunu engellediği tespit edilmiştir. *Q. alba* ekstraktlarının, testlerde kullanılan üç bakteri türünde (sırasıyla IC₅₀ 64, 32 ve 32 µg/mL) büyümeyi inhibe ettiği ve *S. aureus*'ta biyofilm oluşumunu (IC₅₀ 1 µg/mL) inhibe ettiği belirlenmiştir. Ayrıca *L. tulipifera* ve *A. spinosa* ekstraktlarında, *S. aureus*'ta biyofilm oluşumunu (IC₅₀ 32 µg/mL) ve (IC₅₀ 2 µg/mL) inhibe ettiği bulunmuştur (Dettweiler ve ark., 2019).

Greyfurt meyvesinde doğal olarak oluşan furokumarinlerin, *V. harveyi* BB886 ve BB170 suşlarının QS AI-1 ve QS AI-2 aktivitelerini yaklaşık %95'lik inhibisyona uğrattığı bulunmuştur. Ayrıca *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium ve *P. aeruginosa* gibi patojenlerin neden olduğu biyofilm oluşumunu engellediği tespit edilmiştir. Saflaştırılmış furokumarinlerin, dihidroksibergamottin ve bergamottinin %94,6-97,7 aralığında AI inhibisyonlarına neden olduğu tespit edilmiştir. Fakat, greyfurt sularının ise AI-1'e karşı %47-62 ve AI-2'ye karşı %16,8-27,5 oranları arasında inhibisyon gösterdikleri belirlenmiştir (Girennavar ve ark., 2008).

Al-Haidari ve ark. (2016) çalışmalarında, 20 farklı tıbbi bitkinin alkol ekstraktlarının QS inhibitör aktivitesini *Chromobacterium violaceum* ATCC12472 ve *Pseudomonas aeruginosa* PA14 test suşlarını kullanarak agar difüzyon metodu ile test etmişlerdir. Ekstraktların çoğu, test suşlarına karşı güçlü antibakteriyel aktivite göstermiştir. QS inhibitör etkisinin belirlenmesinde; *C. violaceum* kültürünün mor renk pigment inhibisyonunun besiyeri ortamında kolaylıkla gözlemlenebilmesi taramayı basitleştiren ve kolaylaştıran fenotip sağlamıştır. Test edilen ekstraktların yedisinin, QS inhibitör aktivite gösterdiği bulunmuştur. *C. sinensis*, *L. nobilis*, *E. cardamomum*, *A. cepa* ve *C. sativum* ekstraktları, belirgin bir QQ etkisi göstermiştir (Tablo 2.3). Ekstraktların sırasıyla 20, 10, 10, 20 ve 10 mm boyutlarında zon oluşturdıkları gözlemlenmiştir. *C. sinensis*, *L. nobilis*, *E. kakule*, *A. cepa* ve *C. sativum* ekstraktlarının, tüp yöntemi kullanılarak *Pseudomonas sp.* hücreleri tarafından biyofilm oluşumu için test edilmiş ve tüm örneklerin kontrole kıyasla, oluşan biyofilm miktarlarında azaltıcı etki gösterdiği belirlenmiştir. Bazı ekstraktların kükürt bakımından zengin moleküller içermesi *P. aeruginosa* hücrelerinde LuxR temelli QS inhibitör etki gösterdiği rapor edilmiştir., *P. guajava* ve *M. longifoli* ekstraktlarının ise orta derecede QS inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir.

Tablo 2.3. Test edilen bitki ekstraktlarının QS inhibitör potansiyeli (Al-Haidari ark., 2016)

Bitki	Kullanılan bölüm	Zon Çapı (mm)	QS inhibitör etki
<i>Citrus sinensis</i>	Tohumlar	20	++
<i>Coriandrum sativum</i>	Meyveler	10	++
<i>Laurus nobilis</i>	Yapraklar	10	++
<i>Psidium guajava</i>	Yapraklar	3	+
<i>Allium cepa</i>	Kabuklar	20	++
<i>Mentha longifolia</i>	Kökler	5	+
<i>Elettaria cardamomum</i>	Tohumlar	10	++
<i>Allium sativa</i> (Pozitif kontrol)	Soğan	10	++

+: Orta düzeyde QS inhibitör aktivitesi, ++: Yüksek QS inhibitör aktivite

Junli ve ark. (2016), *Pseudomonas fluorescens*'in quorum sensing (QS) sinyalini içeren hücresiz süpernatantın (CFS) *Pseudomonas fluorescens*'in büyümesi, biyofilm gelişimi ve bozulma potansiyeli üzerindeki etkisini in vitro olarak değerlendirmiştir.

Shewanella baltica ve çeşitli kimyasal olarak sentezlenmiş otoindüktörlerin *S. baltica*'nın bozulma fenotipleri üzerindeki etkileşimli etkilerini ön değerlendirmeye tabi tutulmuştur. Bozulmuş *Pseudosciaen crocea*'dan izole edilen PF01 suşu *P. fluorescens* olarak tanımlanmıştır. *S. baltica* kültürüne %25 ve %50 CFS ilavesi lag ve eksponansiyel faz sırasında büyüme hızını etkilememiş, ancak durağan faz sırasında hücre azalmasına neden olmuştur. *P. fluorescens*'ten elde edilen CFS'nin varlığı biyofilm gelişimini önemli ölçüde engellemiş ve *S. baltica*'nın üretimini büyük ölçüde azaltmıştır. CFS'de bulunan sentezlenmiş yedi AHL'nin eksojen takviyesi *S. baltica*'da biyofilm oluşumunu ve trimethylamine TMA üretimini azaltırken, eksojen siklo-(L-Pro-L-Leu) maruziyetinin bozulma potansiyelini arttırdığı gösterilmiştir. Bu da *S. baltica*'nın iki QS molekülünü de algıladığını ortaya koymuştur. Ayrıca, siklo-(L-Pro-L-Leu)'nun uyarıcı etkisi AHL eş zamanlı olarak eklendiğinde etkilenmiştir, bu da *S. baltica*'daki bozulma fenotiplerinin inhibitör aktivitesinin, bu QS bileşiklerinin *P. fluorescens*'in CFS'sindeki rekabetçi etkisine atfedilebileceğini düşündürmektedir. Mevcut çalışmalar QS'nin bozulma mikrobiyal florasının düzenlenmesindeki rolüne ilişkin gelecekteki araştırmalar için iyi bir temel sağlamaktadır.

Yue ve ark. (2021), yeni bir QS inhibitör enzimi olan PF-1240'ı buldular; *Pseudomonas fluorescens* 08'de klonlandı ve ifade edildi. SDS-PAGE proteinin AHL açılazların yapısına benzer şekilde iki alt birimden oluşan bir dimer olduğunu doğrulamıştır. *H. alvei*'nin biyofilm oluşum oranını %44,4'e ve siderofor verimini %54'e kadar önemli ölçüde azaltabilir, proteaz ve lipaz üretimini engelleyebilir ve *H. alvei*'nin hareketliliğine müdahale edebilir. Bu bozulma fenotipleri sayesinde, PF-1240'ın spesifik uygulama etkisi, pratik su ürünlerinin korunmasında uygulanması için teorik bir temel sağlamak üzere daha fazla belirlenebilir.

Pilar ve ark. (2012) bakterilerin hücre yoğunluklarını izlemek ve çeşitli fizyolojik süreçleri kontrol etmek için QS sistemlerini kullandıklarını göstermiştir. Bu çalışmada, on bir fenolik bileşiğin bir biyosensör suşu (*Chromobacterium violaceum*) ve iki patojenik bakteride (*Yersinia enterocolitica* ve *Erwinia carotovora*) QS sinyallerini inhibe etme kapasitesi değerlendirilmiştir. Test edilen tüm bileşikler biyosensör suşunda QS tarafından düzenlenen fenotipleri inhibe etmiştir. N-açıl-homoserin laktonların (AHL'ler) LCeMS/MS spektrometresi ile tanımlanması ve miktarının belirlenmesi, minimum inhibitör konsantrasyonlarının altındaki konsantrasyonlarda sinnamaldehit, ellagik asit, nar özü, resveratrol ve rutin hem *Y. enterocolitica* hem de *E. carotovora*'nın AHL konsantrasyonunu azaltabildiğini göstermiştir.

George ve ark., (2005) Psikrotrofların, özellikle de *Pseudomonas fluorescens* suşlarının, soğutulmuş çiğ sütün mikroflorasına hâkim olduğunu ve pastörizasyondan ve hatta UHT ısıtma işlemlerinden sonra çiğ sütün yapısını bozarak peynir veriminde azalmaya, UHT sütün jelleşmesine ve birçok süt ürününde kötü tatlara neden olan ısıya dayanıklı hücre dışı enzimler (proteazlar ve lipazlar) salgıladığını bildirmiştir. Bu enzimler genellikle hücre yoğunluğunun yüksek olduğu geç log/erken durağan büyüme evrelerinde üretilir. Bu durum, bu enzimlerin indüklenmesinin, bakterilerin homoserin lakton molekülüne dayalı kimyasal sinyaller aracılığıyla hücre popülasyon büyüklüğünü algılayıp yanıt verebildiği bir fenomen olan çekirdek algılama için bir aday olabileceğini göstermiştir. Bu enzimlerin üretiminin psikrotrofların seçici avantajına katkıda bulunduğu ve dolayısıyla büyüme kinetikleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu varsayılmaktadır. Burada rapor edilen çalışmada, homoserin lakton bileşiği, kontrol olarak su kullanılarak, 1, 3 ve 5 günlük depolamadan sonra soğutulmuş çiğ süttten izole edilen üç *Pseudomonas fluorescens* suşunun gecikme fazı süresi ve üstel büyüme hızı üzerindeki etkileri açısından taranmıştır. N-benzoiloksikarbonil-

L-homoserin lakton ve N-3-oksiheksanoil-DL-homoserin lakton olmak üzere iki bileşimin gecikme fazı süresini önemli ölçüde azalttığı ve üç suşun üstel büyüme hızını arttırdığı bulunmuştur. Bu türde hücre dışı enzim üretimine çekirdek algılama fenomeninin ne ölçüde aracılık ettiğini belirlemek için enzim üretimine paralel olarak büyümeyi izleyerek bu bileşiklerle daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Tez kapsamında, Quorum Algılama (Quorum Sensing-QS) ve Quorum Algılama İnhibisyonu (Quorum Quenching-QQ) sistemlerinin kontrolü ile EPS üretim miktarları değiştirilmesi planlanan yerel laktik asit bakteri (LAB) suşları *Lactobacillus plantarum* MF159 (Acs. Num: KJ994456), *Lactobacillus plantarum* MF232 (Acs. Num: KJ994418), *Lactobacillus brevis* MF87 (Acs. Num: KJ994485), *Lactobacillus namurensis* MF210 (Acs. Num: KJ994432) daha önceki bir çalışmada fermente gıdalardan izole edilmiş olup, moleküler yöntemlerle tanımlanmış (Elmacı ve ark., 2015), teknolojik-probiyotik özellikleri (Tokatlı ve ark., 2015; Tokatlı ve ark., 2017) ve EPS üretim yetenekleri (Mıdık ve ark., 2020) belirlenmiştir. Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Kültür Koleksiyonunda muhafaza edilen LAB suşları bu çalışmada kullanılmıştır.

Ekstraktların (zerdeçal, tarçın, kuşburnu, mahlep, peynir suyu) ve QS–QQ aktif bileşiklerin (gallik asit) etkilerinin belirlenmesinde referans ve biyo-monitör olarak kullanılan *Pseudomonas aeruginosa* spp. (Biyofilm-EPS sentezi) bakteri suşları ise diğer kültür koleksiyonlarından temin edilmiştir.

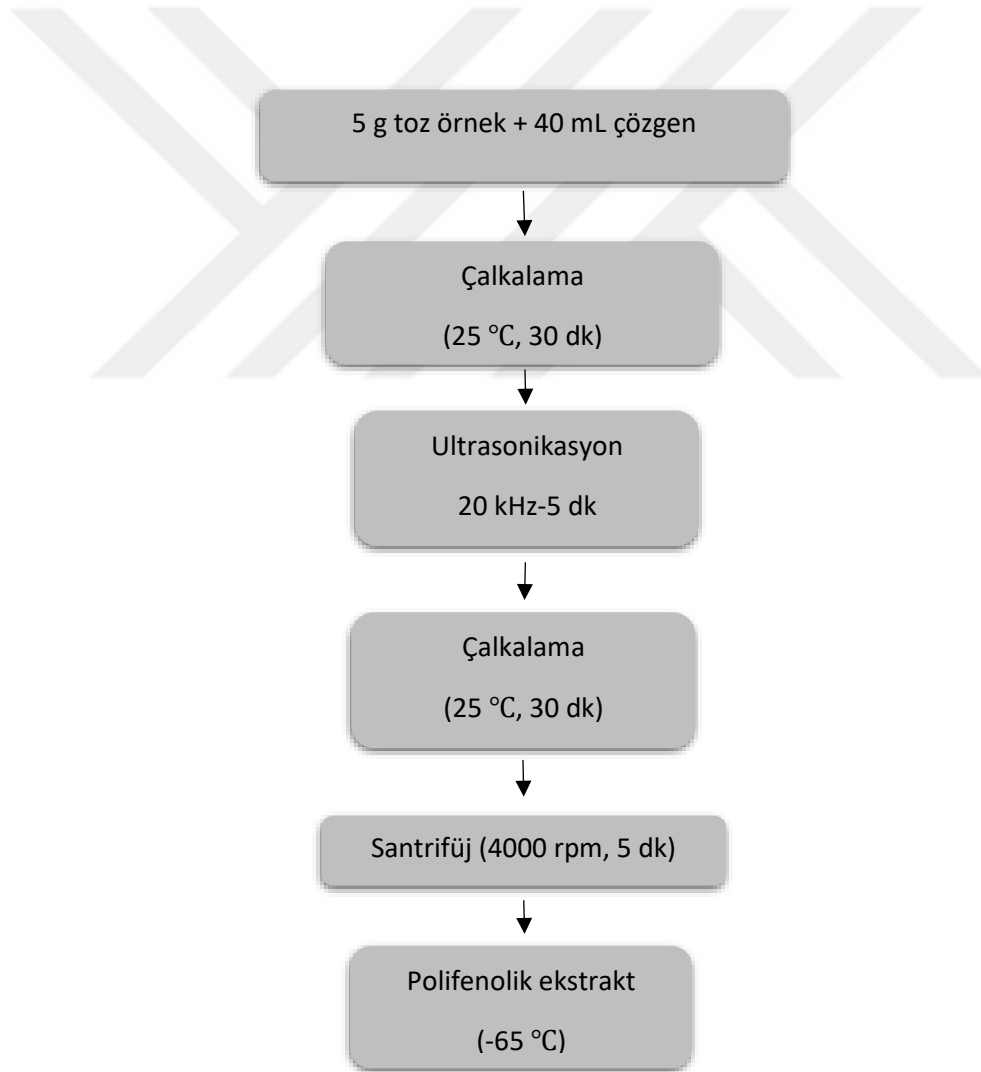
Polifenolik bileşenlerce zengin zerdeçal (Bağdat baharat), tarçın (Bağdat baharat), kuşburnu (yerel market), mahlep (Bağdat baharat) ve oligopeptid bileşenlerce zengin peynir suyu (yerel tulum peyniri) ekstraktların elde edilmesinde kullanılan ürünler bazı firmalardan temin edilmiştir. QS–QQ aktif bileşiklerin etkilerinin belirlenmesi amacı ile kullanılan gallik asit gibi saf moleküller Sigma-Merck firmalarından temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitkisel ekstraktların ve peynir altı suyunun elde edilmesi

Çalışmada kullanılan zerdeçal, tarçın, kuşburnu, mahlep gibi bitkisel kaynaklardan QS-QQ aktif polifenollerin ekstraksiyonu için uygulanacak yöntem belirtilen metoda (Şekil 3.1) göre yapılmıştır. Zerdeçal ve tarçın örnekleri öğütülmüş ve kurutulmuş olarak toz formunda temin edilmiş olup, kuşburnu ve mahlep meyvesi ise bütün kurutulmuş olarak temin edilmiş, sap ve çekirdek kısımları ayrıldıktan sonra öğütücü yardımı ile parçalanarak elekten geçirilmiş

ve 1 mm'den küçük toz formu elde edilmiştir. Elde edilen kuru toz örneklerden farklı fraksiyonlara sahip polifenollerin ekstraksiyonu, etanol, metanol ve su gibi çözümler ile tek tek gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada 5 g toz örnek, 40 mL çözümler (1:8) ile 30 dk çalkalayıcıda karıştırılmış ve polifenollerin verimli ve etkin bir şekilde ekstrakte edilmelerini sağlamak amacıyla ultrasonikasyon (Nanolinker, 20 kHz, 5 dk) işlemi uygulanmıştır. Ultrasonikasyon işlemi sonrası tekrar 30 dk çalkalanan örnekler çözünmeyen katı partiküllerin uzaklaştırılması amacıyla 4000 rpm'de 5 dk santrifüj işlemi uygulanarak üst fazları toplanmıştır. Farklı çözümler ile farklı bitkilerden elde edilen ekstraktlar sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -65°C'de depolanmıştır (Zhang ve ark., 2014; Bacha ve ark., 2016; Erdönmez ve ark., 2018).



Şekil 3.1. Bitkisel polifenolik bileşiklerin ekstraksiyon yöntemi

Oligopeptid açısından iyi bir kaynak olan peynir suyu (PS) ise, yerel bir marketten temin edilen olgunlaştırılmış tulum peynirine (yerel üretim) saf su ilave edilerek (1:1) karıştırılmış ve daha sonrasında kaba filtreden geçirilerek elde edilmiştir. Peynir suyu (PS) doğrudan QS aktif bileşen kaynağı olarak kullanılmıştır (Verbeke ve ark., 2017).

3.2.2. Laktik asit bakteri kültürlerinin seçimi ve aktifleştirilmesi

LAB kültür koleksiyonunda bulunan ve EPS üretme yeteneğine sahip suşlar içerisinde üretim miktarları birbirinden farklı (düşük-yüksek EPS üreten) ve farklı LAB türleri daha önce yapılan çalışma (Mıdık ve ark., 2020) sonuçları dikkate alınarak seçilmiştir. Bu şekilde seçilen farklı *Lactobacillus* türlerine ait *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. namurensis* suşlarının aktifleştirilmesi için, kültürler MRS (De Man, Rogosa and Sharpe, Biolife Italian) besiyerinde 30°C’de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Aktifleştirme işlemi EPS üretiminden önce birkaç kez tekrarlanmıştır.

3.2.3. Çözgenlerin, ekstraktların ve fenolik bileşiklerin minimum inhibisyon konsantrasyonlarının ve hücre gelişimine etkilerinin belirlenmesi

Çalışmamızda kullanılan farklı konsantrasyonlardaki çözgenlerin, ekstraktların, PS veya fenolik bileşiklerin LAB kültürleri üzerinde herhangi bir antimikrobiyal veya hücresel gelişimi arttırıcı bir etki göstermemesi gerekmektedir. Bu bakımdan örneklerin, LAB EPS sentezi üzerine doğrudan QS veya QQ aktivitesi göstererek etkili olduğunun belirlenebilmesi amacı ile örneklerin minimum inhibisyon dozlarının ve bu dozlarda hücresel gelişime etki etmediklerinin belirlenmesi gerekmektedir.

Bu amaç için ilk olarak, bitkisel ekstraktların elde edilmesinde kullanılacak olan çözgenlerin (etanol, metanol, kloroform) LAB kültürlerinin gelişimi üzerinde antimikrobiyal etkinin başladığı minimum dozlarının (sıvı kültür makrodilüsyon yöntemi) belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan *L. plantarum* MF159, *L. plantarum* MF232, *L. brevis* MF87, *L. namurensis* MF210 suşlarının kültür ortamına (MRS besiyeri-5 mL) %0,5-%1,0-%2,0-%4,0 oranlarında çözgenler ilave edilerek 30°C’de 48 saat inkübe edilmiş ve optik yoğunluk (OD₆₀₀) ölçümlerine göre hücre miktarındaki değişim kontrol örneğine göre kıyaslanmıştır. Optik yoğunluk sonuçlarına göre kültürlerin gelişiminin etkilenmeye

başladığı minimum konsantrasyonlar belirlenmiştir. Bu sayede, bitkisel ekstraksiyonda kullanılabilecek çözenlerin çeşidi ve antimikrobiyal etki göstermeyen en yüksek konsantrasyon limitleri belirlenmiştir. Çözenlerin belirlenmesinden sonra, seçilmiş çözenler (etanol, metanol) %0,4, %0,8, %1,2, %1,6 ve %2 konsantrasyonunda olacak şekilde besiyerine ilave edilerek LAB suşları 30°C'de 48 saat inkübe edilmiş ve optik yoğunluk (OD₆₀₀) ölçümlerine göre hücre miktarındaki değişim kontrol örneğine göre kıyaslanmıştır.

Daha sonraki aşamada ise seçilmiş çözenlerle üretilen bitkisel ekstraktların, Peynir suyunun (PS) ve gallik asit çözeltisinin LAB kültürlerinin gelişimi üzerindeki minimum antimikrobiyal etki dozları yukarıda belirtilen yöntemde olduğu gibi belirlenerek, EPS fermantasyonunda kullanılabilecek maksimum dozajlar belirlenmiştir. Kullanılacak olan örneklerde bulunan aktif bileşiklerin sıcaklıktan etkilenmemesi için 0,22 µm gözenek çapındaki steril filtreden geçirilerek soğuk sterilizasyon yapıldıktan sonra kültür ortamına (%0,01, %0,02, %0,4, %0,8, %1,2, %1,6 ve %2) ilave edilmiştir (Zhang ve ark., 2014).

Gallik asit çözeltisinin konsantrasyonları ise, çalışmada kullanılan bitkisel kaynaklar dikkate alınarak benzer konsantrasyonlarda (5 mg/mL) olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.2.4. EPS fermantasyonu

QS-QQ aktivitesine sahip olduğu düşünülen örneklerin LAB suşlarının EPS sentezine etkisini belirlemek için: kuşburnu, zerdeçal, tarçın ve mahlep örneklerine ait etanol, metanol, su ve etanol (%50) ekstraktları, PS ve gallik asit çözeltileri 0,22 µm steril filtreden geçirildikten sonra steril MRS besiyeri içerisine 3 farklı oranda (%0,01, %0,4 ve %2) ilave edilerek EPS fermantasyon besiyerleri hazırlanmıştır (Tablo 3.1). Hazırlanan besiyerleri %0,1 oranında 4 farklı LAB suşu (*L. plantarum* MF159, *L. plantarum* MF232, *L. brevis* MF87, *L. namurensis* MF210) ile aşılansak kültürler 30°C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. LAB suşları ile gerçekleştirilecek denemelerde fermantasyon besiyerinde ve inkübasyon bitiminde (72. saat) kültür ortamının toplam LAB sayısı (log kob/mL), toplam indirgen şeker (DNS) ve EPS miktarları (g/mL) belirlenmiştir.

Bitkisel ekstraktların ve gallik asit örneklerinin hazırlandığı çözenlerin (etanol, metanol, su) aynı oranlarda ilave edildiği kültür ortamı her bir LAB suşu için kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Tablo 3.1. QS-QQ Aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan değişkenler

EPS üreten LAB suşları	Ekstraktlar	Besiyerinde kullanılan dozlar
<i>Lactobacillus plantarum</i> MF232 <i>Lactobacillus plantarum</i> MF159 <i>Lactobacillus brevis</i> MF87 <i>Lactobacillus namurensis</i> MF210	*Zerdeçal (etanol, metanol, su, etanol-su ekstraktları) *Tarçın (etanol, metanol, su, etanol-su ekstraktları) *Kuşburnu (etanol, metanol, su, etanol-su ekstraktları) *Mahlep (etanol, metanol, su, etanol-su ekstraktları) *Peynir suyu (PS) *Gallik asit çözeltisi (5mg/mL)	3 doz %0,01 %0,4 %2

EPS fermantasyonlarına ait kinetik parametreler Tablo 3.2’de verilen denkliklere göre hesaplanmıştır. Kullanılan her bakteri suşu için besiyerine ilave edilen katkıların EPS sentezine etkileri kinetik parametrelerden elde edilen veriler yoluyla yorumlanmıştır. Kültür ortamına ilave edilen katkıların QS-QQ aktiviteye sahip olup olmadıkları hücre sayısında bir değişim olmadan EPS sentezinde meydana getirdiği değişim (artış-azalış) ile belirlenmiştir. Fermantasyonların değerlendirilmesinde kullanılacak olan özgül spesifik gelişme hızı (μ), EPS verimi ($Y_{p/s}$), özgül EPS oluşum hızı (q_p), Tablo 3.2’de verilen formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 3.2. Fermantasyonların değerlendirilmesinde kullanılan kinetik parametreler

Kinetik Parametre	Denklemler	
Özgül spesifik gelişme hızı (μ)	$\mu = \frac{\ln x - \ln x_0}{t}$	$\mu = (\mu_{\max} S) / (K_s + S)$
EPS verimi ($Y_{\text{EPS/S}}$)	$Y_{\text{EPS/s}} = \frac{\Delta \text{EPS}}{\Delta S}$	$\frac{dS}{dt} = - (1/Y_{\text{EPS/s}})(dx/dt)$
Özgül EPS oluşum hızı (q_{EPS})	$Q_{\text{EPS}} = \frac{1}{x} \frac{dp}{dt}$	$\frac{\mu}{Y_{x/s}} = \frac{(\mu_{\max}/Y_{x/s}) S}{(K_s + S)}$

X_0 : başlangıç hücre konsantrasyonu (g/L)
 X : t anında mikroorganizma konsantrasyonu (g/L)
 ΔS : t zamanda substrat konsantrasyonu azalma miktarı
 K_s : substrat doygunluk sabiti (g/L)
 μ : spesifik büyüme hızı (1/saat)
 $\mu_{\max}$: kültür için max spesifik büyüme hızı (1/saat)
 S : substrat konsantrasyonu (g/L)

3.2.5. Doğrulama testi

Örneklerin (bitkisel ekstrakt, gallik asit çözelti, PS) biyofilm oluşumuna QS-QQ etkisi Kristal Viole Metodu ile doğrulanmıştır. Tryptic Soy Broth (TSB) içinde 37°C'de 24 saat inkübe edilen biyo-monitör test bakterisi (*Pseudomonas aeruginosa* spp.) inkübasyonun ardından mikrotüp içerisine 900 μL TSB+ 50 μL ekstrakt + 50 μL test bakterisi olacak şekilde eklenmiş ve 48 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası besi ortamı uzaklaştırılarak mikropalakalar fizyolojik tuzlu su (FTS) ile üç kez yıkanmıştır. Mikropalakalar 65°C'de bir inkübatörde kurutulduktan sonra 2 dakika boyunca %1'lik Kristal Viole ile boyaması yapılmıştır. Boyama sonunda yıkanarak tekrar kurutulan mikropalakalar %30'luk asetik asit solüsyonu ile çözündürülerek kontrol grubuna karşı 595 nm'de spektrofotometrede absorbanları okunmuştur. Böylece; test bakterisinin biyofilm oluşturma yeteneğine örneklerin etkisi belirlenmiştir (Stepanović ve ark. 2000, Hoffman ve ark. 2005, O'Toole 2011, Kaya ve ark. 2016; Erdönmez ve ark., 2018).

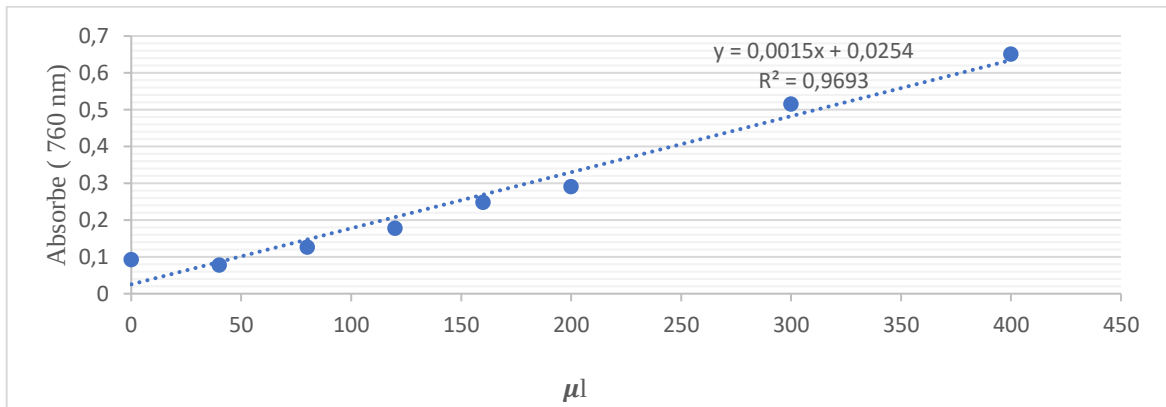
3.2.6. Analizler

EPS izolasyonu ve miktarının belirlenmesi;

EPS izolasyonu için MRS broth besiyerinde fermentasyonunu tamamlayan LAB kültürleri %1 oranında %80 (v/v)'lik trikloroasetik asit solüsyonu ile muamele edilerek oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Karıştırılan kültürler, 10 dakika boyunca -18°C'de bekletilmiş ve hücrelerin uzaklaştırılması için 10 dakika boyunca 6000 rpm'de santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. EPS izolasyonu için ayrılan üst fazın 1:2 oranında soğuk etanol (%95, v/v) ile karıştırılarak -18°C'de 30 dakika EPS flokulasyonu için bekletilmiştir. EPS'nin daha sonra 6000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek çökmesi sağlanmıştır. Santrifüj sonrası elde edilen çökeltiler tekrar etanol ile yıkama işlemi yapılarak kalan EPS çökeltileri 105°C'de etüvde kurutularak gravimetrik olarak EPS miktarları hesap edilmiştir (Yüksekdağ ve Aslım 2008).

Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi;

Ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarı, Folin-Ciocalteu prosedürüne göre belirlenmiştir (Singleton ve Rossi, 1965; Clifford, M., 1999). Standart çözelti olarak gallik asit kullanılmıştır. İlk olarak, 100 µL artan oranlarda gallik asit konsantrasyonları ve numune çözeltileri, 500 µL 0,2 N Folin–Ciocalteu reaktifi ilave edilerek karıştırılmış ve 3 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 1,50 mL Na₂CO₃ (%2) eklenmiştir. Oluşturulan karışım 30 dk, 20°C'de inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda örneklerin absorbansı 760 nm'de ölçülmüştür. Toplam fenolik miktarı mg GAE eşdeğeri olarak ifade edilmiştir.



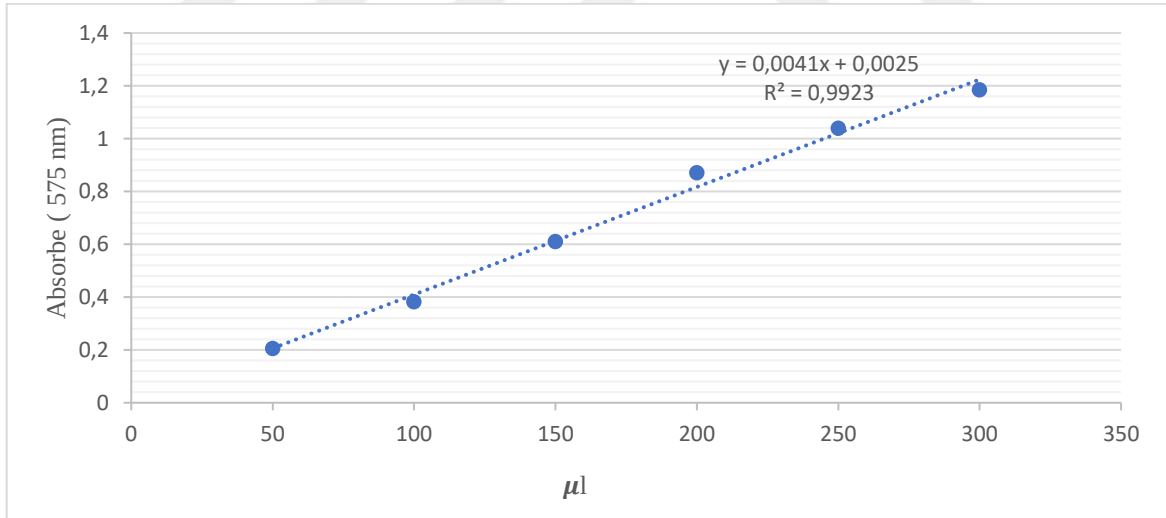
Şekil 3.2. Ekstraktların toplam fenolik analizlerinde kullanılan standart kurve grafiği

Kuru madde miktarının belirlenmesi;

Bitkisel ekstraktların ve peynir suyu (PS)'nin toplam kurumadde içerikleri (nem) $105\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlı etüvde gravimetrik olarak belirlenmiştir (AOAC, 1997)

İndirgen şeker miktarı tayini;

Bitkisel ekstraktlar ve PS indirgen şeker miktarları değiştirilmiş Miller yöntemi kullanılarak DNS (3,5-Dinitrosalisilik asit) ile glikoz standardı kullanılarak tayin edilmiştir (Miller, 1959). Analizden önce örnekler santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatant $0,45\ \mu\text{m}$ gözenek çapındaki PVDF (polyvinylidene fluoride) filtreden (Millipore) geçirilerek berraklaştırılmıştır. Örnek çözeltilerden $100\ \mu\text{L}$ alınarak, $900\ \mu\text{L}$ saf su ile karıştırılmış ve üzerine $1,5\ \text{mL}$ DNS çözeltisi eklenmiştir. Karışım 100°C 'de 5 dakika kaynatılmış ve daha sonra örnekler oda sıcaklığına soğumaya bırakılmış ve oluşan renk spektrofotometrede $560\ \text{nm}$ 'de okunmuştur.



Şekil 3.3. Ekstraktların şeker tayini analizlerinde kullanılan standart kurve grafiği

Toplam protein tayini;

PS ve bitkisel ekstraktların toplam protein içerikleri Bradford metodu ile BSA (Bovin Serum Albumin) standardı kullanılarak tayin edilmiştir (Bradford, 1976). $10\ \text{mL}$ örnek içerisine $5\ \text{mL}$ su ve $200\ \mu\text{L}$ $0,1\ \text{N}$ NaOH ilave edilerek 2 dakika süresince kaynatılmıştır. Hazırlanan

Graph of Absorbance (540 nm) vs Volume (μl) for the calibration curve of the colorimetric assay. The graph shows a linear relationship with the equation $y = 0,0001x + 0,0851$ and $R^2 = 0,9995$.

Volume (μl)	Absorbance (540 nm)
0	0,0851
250	0,1051
1000	0,1851
2000	0,2851
4000	0,4851

Toplam LAB sayımı;

3.2.7. İstatistiksel değerlendirme

28

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Bitkisel Ekstraktların Elde Edilmesi

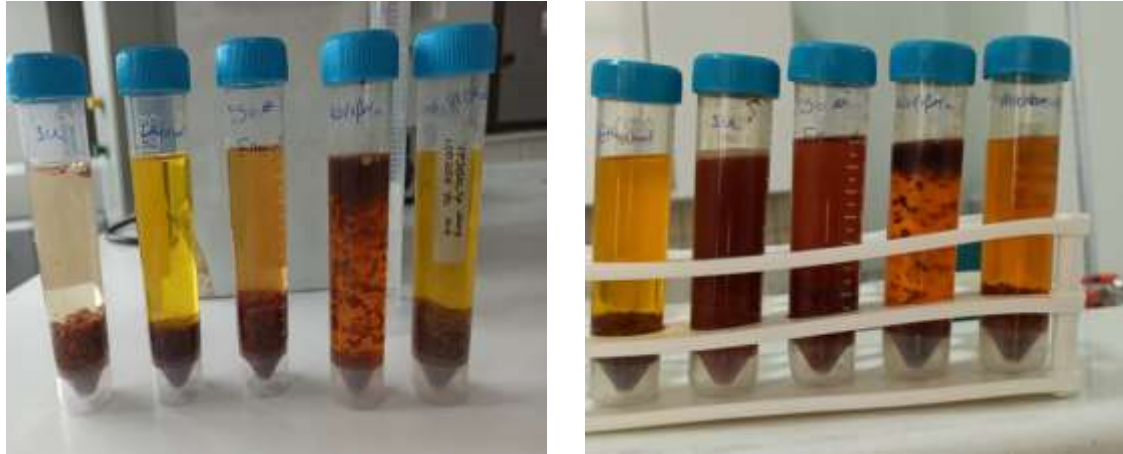
Fermantasyondan sorumlu starter kültürler fermantasyonun güvenli gerçekleşmesinin garantisi olmasının yanı sıra, fermantasyon sırasında ürettikleri metabolitler sayesinde ürüne önemli karakteristik özellikler kazandırmaktadır. Böylece ürüne tüketici açısından ciddi katkılar sağlanmaktadır. Bu doğrultuda, mevcut kültürlerin metabolik özelliklerinin bazı teknikler ile geliştirilmesi, endüstriyel anlamda da büyük katkılar sağlamaktadır. Suş metabolizmasının düzenlenmesi yöntemlerinden biri olan QS-QQ sistemleri bu hedefler doğrultusunda kullanılabilmektedir. Bu çalışma ile biyoteknolojik uygulamalarda büyük öneme sahip doğal ve yerel laktik asit bakteri suşlarının EPS üretim miktarlarının QS-QQ sistemleri ile kontrolü geliştirilerek, endüstriyel anlamda starter kültür olarak kullanım faydaları arttırılmış olacaktır. Çalışma kapsamında seçilen laktik suşlar için farklı QS-QQ aktif bileşiklerin denenmesiyle EPS üretme özelliklerin geliştirilmesi için uygun teknikler belirlenmiştir. Bu çalışma sonuçları, QQ ve QS metotların kullanım mekanizmaları ile EPS üretim prosesinin detaylı bir şekilde anlaşılması ve değişik materyaller tercih edilerek farklı çalışmalarda kullanım olanakları açısından imkân sağlamıştır. Kullanılan gen mühendisliği vb. yöntemlerin aksine daha kolay uygulanabilen bir yöntem olması da çalışmaların devamlılığını sağlamaktadır. Ayrıca; maliyeti düşük ve daha az işgücü isteyen bir proses olması da endüstride ve bilimsel çalışmalarda daha geniş bir kullanım olanağı sağlamaktadır.

Çalışma kapsamında QS ve QQ sistemlerinin kontrolü ile EPS üretim miktarları değiştirilecek olan LAB suşlarının seçiminde, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümünde muhafaza edilen ve EPS üretim yeteneğine sahip olduğu daha önceki çalışmalar ile bilinen 15 suş içerisinde farklı LAB türlerini kapsayacak şekilde farklı miktarlarda EPS üretim yeteneğine sahip 4 suş seçilmiş ve çalışmaya dahil edilmiştir (Tablo 4.1). Suşların seçim aşamasında özellikle farklı LAB türleri çalışmaya dahil edilerek QS ve QQ aktivitesinin etkileri türler arasındaki farklılıklardan yararlanarak yakalanmaya çalışılmıştır. Bakterilerde türler veya cinsler arasındaki hücresel farklılıklar QS ve QQ sistemlerinin çalışma mekanizmalarını da etkileyebilmektedir. Hücresel sinyal mekanizmaları aynı türler içerisinde benzer yollar ile işlerken genetik farklılıklar arttıkça bu yollar değişebilmektedir.

Tablo 4.1. EPS üreten LAB suşlarının seçimi

No	LAB suşu	Gen Bank Accession Number	EPS (Mıdık ve ark., 2020)
1	<i>L. brevis</i> MF87	KJ994485	568 mg/L
2	<i>L. plantarum</i> MF159	KJ994456	488 mg/L
3	<i>L. namurensis</i> MF210	KJ994432	343 mg/L
4	<i>L. plantarum</i> MF232	KJ994418	379 mg/L

Çalışmada kullanılan zerdeçal, tarçın, kuşburnu, mahlep gibi bitkisel kaynaklardan QS-QQ aktif polifenollerin ekstraksiyonu yöntem kısmında belirtilen metoda göre yapılmıştır. Örneklerden farklı fraksiyonlara sahip polifenollerin ekstraksiyonu için etanol, metanol, su ve %50 etanol kullanılarak işlemler gerçekleştirilmiştir. Etanol, metanol, su ve %50 etanol ile farklı bitkisel kaynaklardan elde edilen ekstraktlar minimum inhibisyon ve quorum algılamada kullanılmak üzere -65°C’de depolanmıştır (Şekil 4.1). Oligopeptid kaynağı olarak ise elde edilen peynir ekstraktı doğrudan QS aktif bileşen kaynağı olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.1. Bitkisel kaynaklardan fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu

4.2. Çözgenlerin ve Ekstraktların Hücre Gelişimine Etkileri

Kullanılacak olan farklı konsantrasyonlardaki çözgenlerin, ekstraktların, PS bileşiklerin LAB kültürleri üzerinde herhangi bir antimikrobiyal veya hücresel gelişimi arttırıcı bir etki göstermemesi gerekmektedir. Bu bakımdan örneklerin LAB EPS sentezi üzerine doğrudan QS veya QQ aktivitesi göstererek etkili olduğunun belirlenebilmesi amacı ile örneklerin minimum inhibisyon dozları ve bu dozlarda hücresel gelişime etki etmedikleri belirlenmiştir.

4.2.1. Uygun ekstraksiyon çözgeninin belirlenmesi

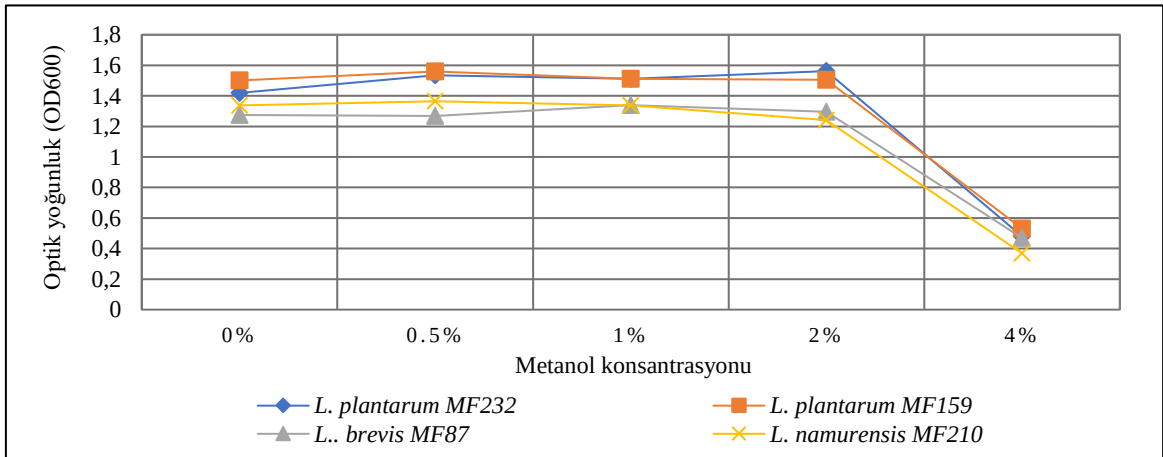
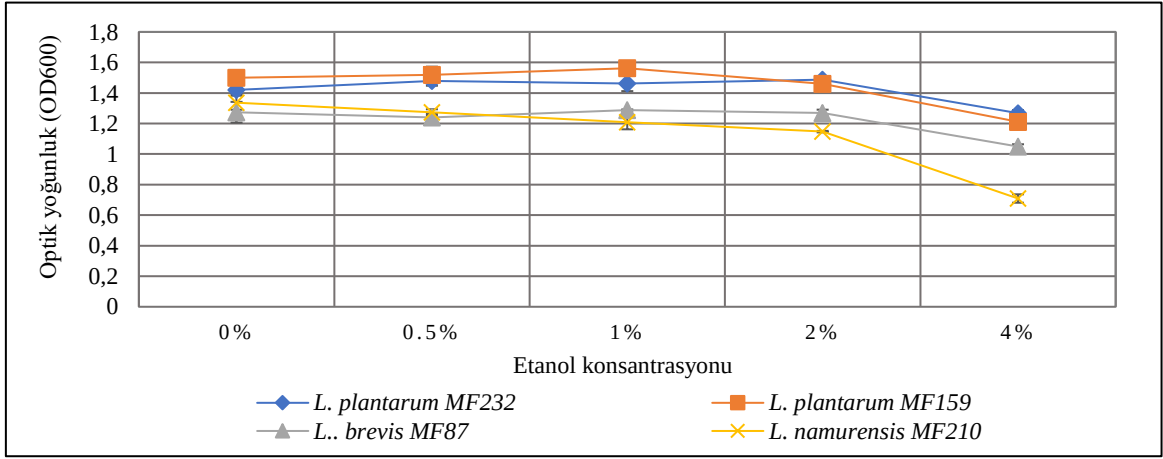
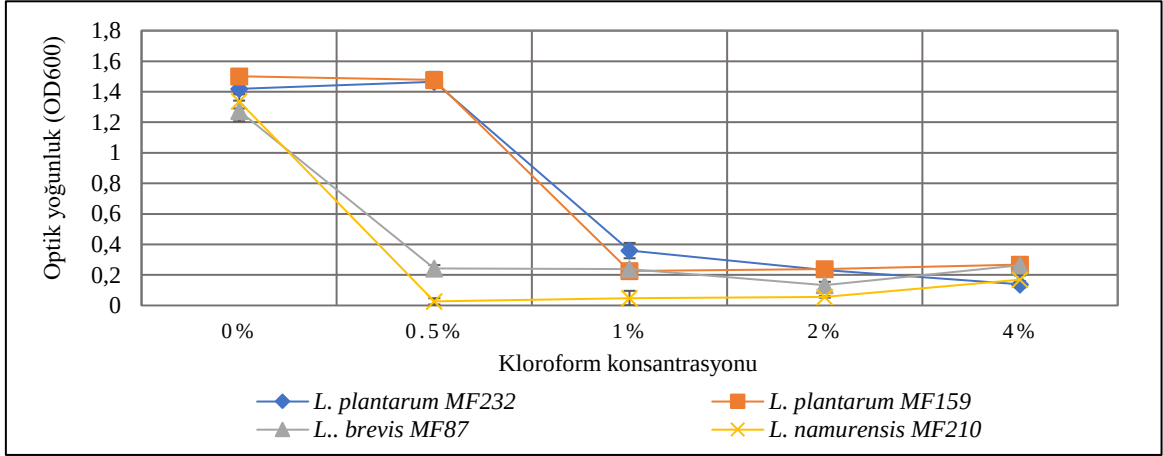
Bu amaç için ilk olarak, bitkisel ekstraktların elde edilmesi için kullanılması planlanan çözgenlerin (etanol, metanol, kloroform) LAB kültürlerinin gelişimi üzerinde antimikrobiyal etkinin başladığı minimum dozlarının (sıvı kültür makrodilüsyon yöntemi) belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan *Lactobacillus plantarum* MF159, *Lactobacillus plantarum* MF232, *Lactobacillus brevis* MF87, *Lactobacillus namurensis* MF210 suşları kültür ortamına artan konsantrasyonlarda çözgenler ilave edilerek inkübe edilmiş ve optik yoğunlukları (OD₆₀₀) ölçülerek hücre sayılarındaki değişim kontrol örneğine göre kıyaslanmıştır. Ölçüm sonuçlarına göre kültürlerin gelişiminin etkilenmeye başladığı minimum konsantrasyonlar belirlenmiştir. Bu sayede bitkisel ekstraksiyonda kullanılabilecek çözgenlerin çeşidi ve antimikrobiyal etki göstermeyen en yüksek konsantrasyon limitleri ortaya konmuştur.

Şekil 4.2 incelendiğinde %0,5, %1, %2 ve %4 oranlarında besiyerine ilave edilen kloroform çözeltisinin özellikle *Lactobacillus brevis* MF87, *Lactobacillus namurensis* MF210 suşlarının gelişimlerini önemli ölçüde baskılayarak kontrol gruplarına (%0 kloroform) göre bu suşlarda inkübasyon sonrasında düşük optik yoğunluk değerleri elde edilmiştir (OD₆₀₀: ~0,2-0,02). *L. namurensis* MF210 kültür ortamına ilave edilen kloroform konsantrasyonlarının meydana getirdiği inaktivasyonun daha fazla olduğu görülmektedir. Diğer taraftan *L. plantarum* MF159, *L. plantarum* MF232 suşlarında ise %0,5 kloroform konsantrasyonunda herhangi bir inhibisyon gerçekleşmemiş, artan kloroform konsantrasyonlarında ise diğer suşlarla benzer bir gelişim inhibisyonu gözlemlenmiştir. Her iki *L. plantarum* suşunun düşük kloroform konsantrasyonlarından etkilenmediği ancak artan konsantrasyon ile önemli ölçüde etkilendiği belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar ışığında çözgen olarak kloroformun bitkisel kaynaklardan polifenollerin ekstraksiyonunda

kullanımının uygun olmayacağı kanısına varılmıştır. Kloroformun çok düşük konsantrasyonlarda (%0,5 ve %1) LAB suşlarının hücresel gelişimini önemli ölçüde baskılaması bu tür bir çözgenin QS ve QQ aktif bileşiklerin kültür ortamına ilave edilmesinde hücresel gelişimi negatif yönde etkilemesinden dolayı kullanışlı olmayacağı düşünülmüştür. Çözgen olarak %0,5-%2 etanol ilave edilen kültür ortamında inkübasyon sonunda tüm LAB suşlarının hücresel gelişimde önemli bir düşüş yaşanmaz iken, %4 etanol konsantrasyonunda ise tüm suşlarda bir miktar inhibisyon gözlemlenmiştir. *L. namurensis* MF210 suşunda %4 etanol konsantrasyonunda meydana gelen inhibisyon daha yüksek olup, kontrol örneğine kıyasla $1,34 \pm 0,05$ OD₆₀₀ değerinden $0,709 \pm 0,04$ OD₆₀₀ değerine kadar düşmüştür.

Metanol ilave edilen kültür ortamında da benzer şekilde %4 konsantrasyonda gelişimde azalma meydana gelmiş ve %4 etanol konsantrasyonuna kıyasla LAB suşlarının gelişimleri daha fazla inhibe ($0,47-0,37$ OD₆₀₀) olmuştur. %0,5-%2 metanol konsantrasyonlarında ise çözgen ilave edilmeyen gruplara (%0) kıyasla hücre gelişimlerinde önemli bir değişim meydana gelmemiştir.

Elde edilen bu sonuçlar incelendiğinde, farklı konsantrasyonlarda kloroform, etanol ve metanol çözgenlerinin LAB kültür ortamına ilave edilmesi sonucunda özellikle kloroformun tüm konsantrasyonlarda LAB suşlarının gelişimini baskıladığı, etanol ve metanolün ise sadece %4 konsantrasyonda inhibisyona neden olduğu ve diğer konsantrasyonlarda hücresel gelişimi arttırmadığı görülmüştür. Etanol ve metanolün %2 ve altındaki konsantrasyonlarının hücresel gelişimi engelleyici veya arttırıcı etki göstermemesi sebebi ile QS denemelerinde kullanılabileceği belirlenmiş ve bitkisel polifenolik ekstraktların elde edilmesinde kullanılması planlanmıştır.



Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlardaki çözümlerin (kloroform, etanol, metanol) LAB suşlarının gelişimi üzerindeki antimikrobiyal etkileri

4.2.2. Çözgenlerin LAB suşları hücre gelişimine etkileri

Bitkisel ekstraktların elde edilmesinde kullanılacak çözgenlerin çeşidi (su, etanol, metanol ve %50 etanol) ve maksimum dozları belirlendikten sonra ekstraksiyonda kullanılacak çözgenlerin konsantrasyonları %0,4, %0,8, %1,2, %1,6 ve %2 olacak şekilde kültür ortamına ilave edilerek hücresel gelişimi inhibe edici veya aktivite edici etkilerinin olup olmadığı optik yoğunluk (OD₆₀₀) takip edilerek tekrar test edilmiştir. Çözgenlerin (su, metanol, etanol, %50 etanol) inhibisyon veya aktivasyon konsantrasyonlarının belirlenmesi için *Lactobacillus plantarum* MF159, *L. plantarum* MF232, *L. brevis* MF87 ve *L. namurensis* MF210 suşlarında gerçekleştirilen OD₆₀₀ ölçüm sonuçları Şekil 4.3, 4.4, 4.5, 4.6'da yer almaktadır.

Şekil 4.3 incelendiğinde; *L. plantarum* MF232 suşu ile gerçekleştirilen 48 saatlik inkübasyon sonunda çözgen içermeyen kontrol gruplarında $1,43 \pm 0,03$ - $1,42 \pm 0,04$ aralığında OD₆₀₀ değeri ölçülmüştür. Besiyerine metanol ilave edilen örneklerde (%0,8 ve %1,2) konsantrasyonlarda hücresel gelişim $1,38$ OD₆₀₀ olarak biraz daha düşük düzeyde ölçülmüştür. Ancak; bu konsantrasyonlarda ölçülen değerlerin standart sapmalarının yüksek olması ($\pm 0,08$ ve $\pm 0,11$) hücresel gelişimde anlamlı bir azalma olarak görülmemiştir. Metanolün *L. plantarum* MF232'nin hücresel gelişimi üzerinde kontrol örneğine kıyasla anlamlı bir etki göstermediği belirlenmiştir. Artan konsantrasyonlardaki etanol ilavesinin ise

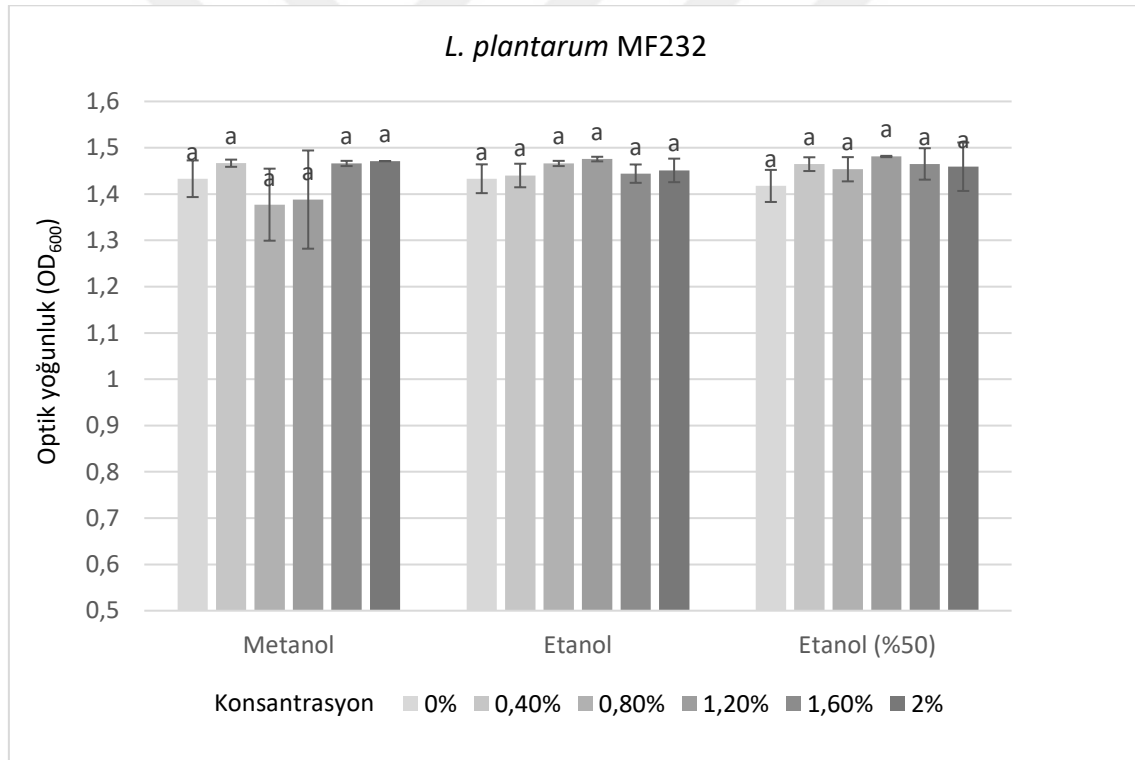
L. plantarum MF232 suşunun hücre gelişimi üzerinde anlamlı bir etki göstermediği ve OD₆₀₀ değerlerinin $1,43$ - $1,48$ aralığında gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Etanol (%50) ilavesinde ise kontrol örneğine ($1,42 \pm 0,04$ OD₆₀₀) kıyasla diğer konsantrasyonlarda hücre gelişiminde küçük bir artış ($1,45$ - $1,48$ OD₆₀₀) olmakla birlikte bu fark anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

L. plantarum MF159 hücre gelişimine farklı çözgenlerin etkisi Şekil 4.4'te verilmiştir. Metanol ilave edilen kültür ortamında inkübasyon sonunda OD₆₀₀ değerleri $1,45$ - $1,42$ aralığında değişim göstermiş ve kontrol örneğine göre ($1,42 \pm 0,03$) benzer değerler elde edilmiştir ($p > 0,05$). Benzer durum etanol ve etanol (%50) ilave edilen gruplarda da gözlemlenmiştir.

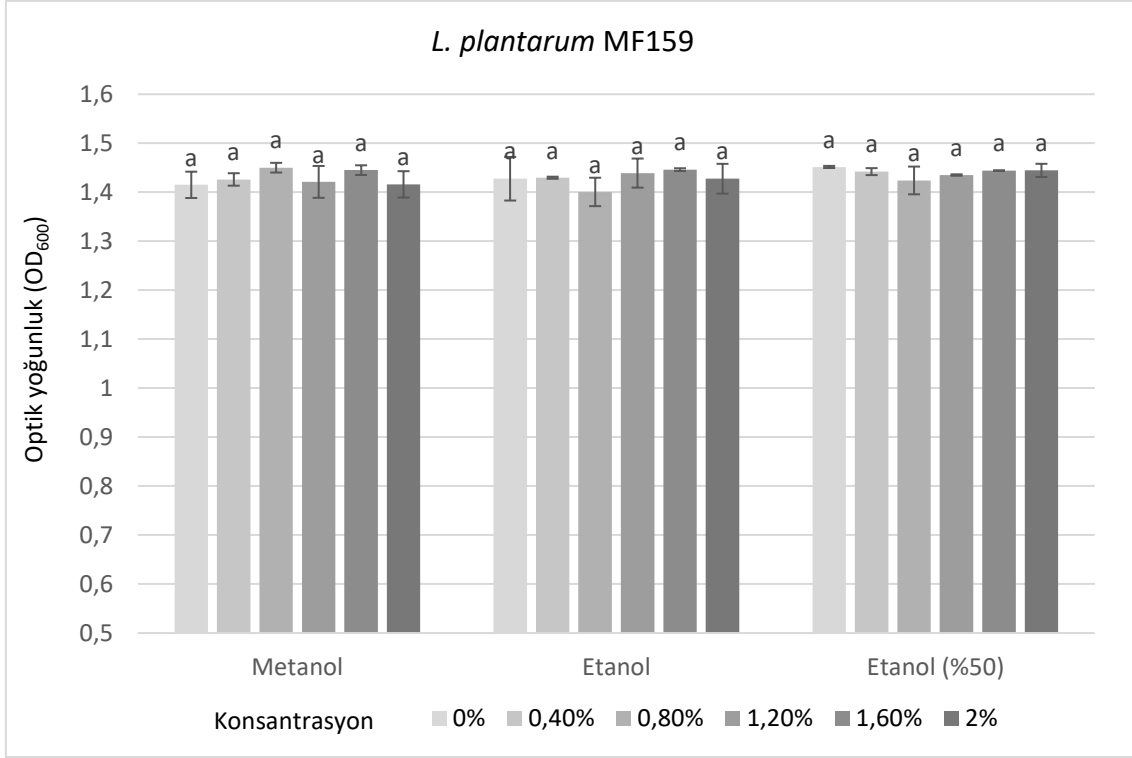
Şekil 4.5'te *L. brevis* MF87 kültür ortamına ilave edilen metanolün artan konsantrasyon ile OD₆₀₀ değerlerinde kontrol grubuna ($1,22$ OD₆₀₀) göre bir miktar artışa ($1,24$ - $1,27$ OD₆₀₀) sebebiyet verdiği ancak bu artışın çok düşük düzeylerde ve standart sapma içinde kaldığı görülmektedir. Etanol ilavesinde ise en düşük OD₆₀₀ değeri %1,2 konsantrasyonda $1,21$

OD₆₀₀ olarak belirlenmiş diğer konsantrasyonlarda ise 1,23-1,24 OD₆₀₀ değerleri aralığında değişmiştir. Çözgen olarak etanol (%50) kullanılan örneklerde de hücresel gelişimde anlamlı bir değişim belirlenmemiştir (p>0,05).

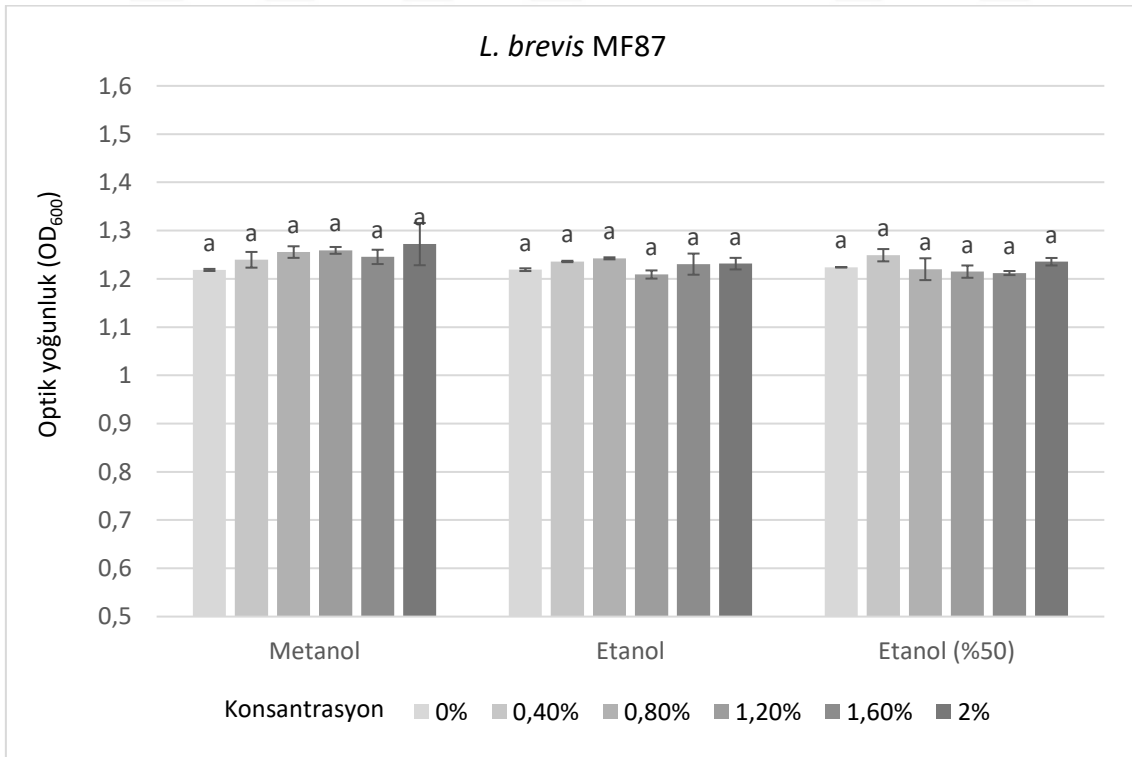
Şekil 4.6 incelendiğinde ise; *L. namurensis* MF210 suşunda %0,4 konsantrasyonunda metanol ilave edilen örnekte hücresel gelişimin kontrol grubuna (1,22±0,02 OD₆₀₀) kıyasla bir miktar azaldığı ve OD₆₀₀ değerinin 1,16±0,01 olarak ölçüldüğü görülmektedir. Bu fark istatistiksel olarak önemli olmakla birlikte, hücresel gelişimde anlamlı bir azalma olarak görülmemiştir. Zıt bir şekilde %0,8 etanol ilave edilen kültür ortamında ise kontrol grubuna (1,19±0,08 OD₆₀₀) kıyasla hücresel gelişimde bir miktar artış (1,25±0,01 OD₆₀₀) gözlemlenmiş ancak bu durumda da anlamlı bulunmamıştır (p>0,05).



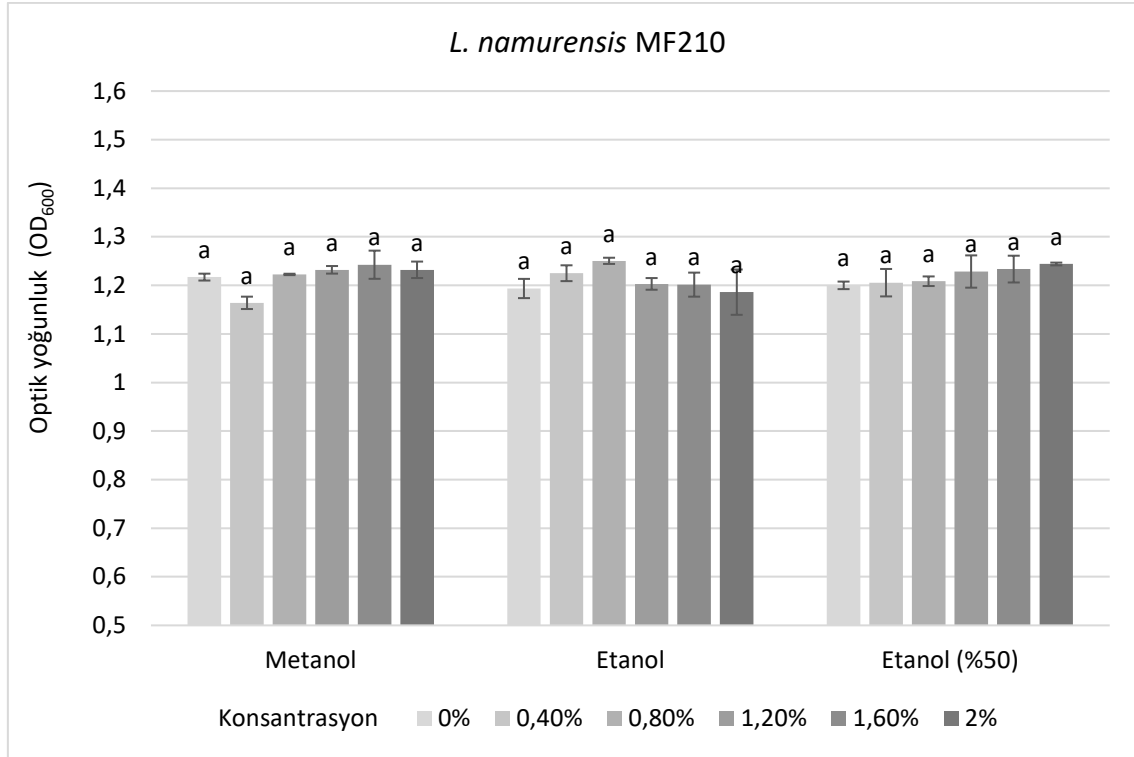
Şekil 4.3. *Lactobacillus plantarum* MF232 hücre gelişimine metanol ve etanolün etkisi



Şekil 4.4. *Lactobacillus plantarum* MF159 hücre gelişimine metanol ve etanolün etkisi



Şekil 4.5. *Lactobacillus brevis* MF87 hücre gelişimine metanol ve etanolün etkisi



Şekil 4.6. *Lactobacillus namurensis* MF210 hücre gelişimine metanol ve etanolün etkisi

Sonuç olarak artan konsantrasyonlarda (%0,4-%2) metanol ve etanolün *L. plantarum* MF159, *L. plantarum* MF232, *L. brevis* MF87 ve *L. namurensis* MF210 suşlarında hücresel gelişimi belirgin bir şekilde arttırıcı veya azaltıcı bir etkisi oluşmamıştır ($p>0,05$). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda LAB suşlarının EPS sentezinde QS ve QQ etkileri incelenecek olan bitkisel ekstraktların elde edilmesinde metanol ve etanol çözenlerinin en yüksek doz olarak %0,4-%2 aralığındaki konsantrasyonlarının kullanılabileceği öngörülmüştür. Çalışmanın bundan sonraki aşamasında belirlenen konsantrasyonlar ve çözenler ile bitkisel ekstraktların elde edilmesi aşamasına geçilmiştir. Elde edilen ekstraktların da benzer şekilde hücresel gelişimi arttırıcı veya azaltıcı etkileri farklı konsantrasyonlarda ön denemeler ile belirlendikten sonra EPS sentezine olan QS ve QQ etkileri çalışılmıştır.

4.2.3. Ekstraktların Bileşimi

Belirli konsantrasyonlarda LAB hücre gelişimine etkisi olmadığı belirlenen çözümler (etanol, metanol, su ve %50 etanol) ile yöntem kısmında belirtilen prosedür ile bitkisel ekstraktların üretimi gerçekleştirilmiş olup ilk olarak QS ve QQ aktiviteleri belirlenecek olan zerdeçal, tarçın, mahlep ve kuşburnu ekstraktlarının ve peynir suyunun (PS) kimyasal bileşimi belirlenmiştir.

Tablo 4.2. Ekstraktların ve Peynir Suyunun kimyasal kompozisyonu

Örnek	Çözgen	Kurumadde (mg/10mL)	Toplam Şeker (mg/10mL)	Toplam Protein (mg/10mL)	Toplam Fenolik (mg GAE/10mL)
Kuşburnu	Etanol	23,89 ±0,46 ^A	16,35±0,64 ^G	6,46 ±0,38 ^A	0,05 ±0,00 ^{AB}
	Su	134,14±6,93 ^{GH}	63,10±2,21 ^L	67,60 ±4,63 ^B	1,70 ±0,20 ^E
	Metanol	76,58 ±1,76 ^{DE}	47,37±1,45 ^I	21,18 ±0,29 ^A	1,13 ±0,05 ^D
	Etanol (%50)	68,34 ±1,41 ^{CDE}	58,23±1,53 ^K	8,30 ±0,48 ^A	0,67 ±0,04 ^{CD}
Zerdeçal	Etanol	347,69±12,05 ^I	7,49 ±0,52 ^{CD}	309,10±24,54 ^D	0,62 ±0,01 ^C
	Su	32,79 ±1,85 ^{AB}	3,23 ±0,43 ^{AB}	28,48 ±0,53 ^A	0,08 ±0,01 ^{AB}
	Metanol	130,48±0,39 ^{GH}	2,45 ±0,29 ^A	102,31±1,54 ^C	0,48 ±0,01 ^{ABC}
	Etanol (%50)	97,79 ±0,60 ^{EF}	7,63 ±0,83 ^{CDE}	85,92 ±4,12 ^{BC}	0,48 ±0,06 ^{ABC}
Tarçın	Etanol	117,78±6,20 ^{FG}	6,44 ±0,48 ^{BC}	97,89 ±0,79 ^{BC}	1,66 ±0,02 ^E
	Su	33,72 ±0,26 ^{AB}	15,00±0,34 ^{FG}	18,25 ±0,31 ^A	0,52 ±0,03 ^{BC}
	Metanol	93,35 ±2,90 ^{EF}	11,48±0,50 ^{EF}	99,39 ±3,95 ^{BC}	1,69 ±0,21 ^E
	Etanol (%50)	122,38±6,83 ^{FG}	23,59±1,83 ^H	84,83 ±1,54 ^{BC}	2,54 ±0,38 ^F
Mahlep	Etanol	26,82 ±1,18 ^A	6,63 ±0,24 ^{BC}	21,30 ±0,46 ^A	0,02 ±0,00 ^A
	Su	530,38±25,48 ^K	17,12±0,34 ^G	411,29±20,77 ^E	0,35 ±0,00 ^{ABC}
	Metanol	41,73 ±0,68 ^{ABC}	3,21 ±0,29 ^{AB}	20,72 ±0,60 ^A	0,02 ±0,00 ^A
	Etanol (%50)	154,92±1,86 ^H	11,00±0,76 ^{DE}	103,3 ±2,23 ^C	0,04 ±0,00 ^{AB}
Peynir Suyu (PS)	Su	60,46 ±1,99 ^{BCD}	2,96 ±0,71 ^{AB}	8,31±0,33 ^A	nd

*A,B,C sütunlarda yer alan veriler arasındaki istatistiksel benzerlik

Tablo 4.2’de farklı çözümler ile hazırlanan ekstraktların kurumadde içerikleri incelendiğinde, en yüksek kurumadde içerikleri sırası ile mahlep su ekstraktında 530,38±25,48 mg ve zerdeçal etanol ekstraktında 347,69±12,05 mg olarak bulunmuştur. Diğer taraftan en düşük kurumadde içerikleri ise kuşburnu etanol ekstraktında 23,89±0,46 mg ve mahlep etanol ekstraktında 26,82±1,18 mg olarak hesap edilmiştir.

Kuşburnu örneklerinin kurumadde içerikleri incelendiğinde su ekstraktında en yüksek değere ($134,14 \pm 6,93$ mg) ulaşılırken etanol ekstraktında ise en düşük ($23,89 \pm 0,46$ mg) kurumadde değeri bulunmuştur ($p < 0,05$). Bu durum kuşburnu meyvesinde yüksek oranda bulunan şekerlerin su ile ekstraksiyonunda daha kolay çözünmesi ile ilişkilendirilmiştir.

Zerdeçal ekstraktlarında ise en yüksek kurumadde içeriklerine sırası ile etanol, metanol, etanol (%50) ve su kullanılan çözümler ile ulaşılmış olup özellikle etanol ve metanol ile yüksek kurumadde içerikleri elde edilmiştir ($p < 0,05$). Zerdeçalda su ile elde edilen ekstraktların kurumadde içeriği düşük ($32,79 \pm 1,85$ mg) düzeyde kalmıştır. Zerdeçal etanol ekstraktlarının aynı zamanda toplam protein içerikleri de yüksek bulunmuş ve etanol ekstraktının kurumadde içeriklerinin yüksek bulunmasında etken olmuştur.

Tarçın örneklerinde de su ekstraktının en düşük kurumadde değerine ($33,72 \pm 0,26$ mg) sahip olduğu, etanol ve etanol (%50) ekstraktlarının ise en yüksek kurumadde değerine sahip olduğu görülmüştür. Mahlep su ekstraktında ise tüm örnekler içinde en yüksek kurumadde değeri $530,38 \pm 25,48$ mg olarak bulunmuştur ($p < 0,05$). Bu ekstraktın aynı zamanda toplam protein içeriği de ($411,29 \pm 20,77$) diğer örneklerle kıyasla oldukça yüksek bulunmuştur. Mahlep etanol ve metanol ekstraktlarında kurumadde değerleri su ekstraktına kıyasla oldukça düşük düzeylerde belirlenmiştir. Peynir suyu örneklerinde ise kurumadde içeriği $60,46 \pm 1,99$ mg olarak bulunmuştur. Tüm örneklerde yağ miktarı belirlenmediği için özellikle etanol ve metanol ekstraktların kuru madde içerikleri yüksek yağ içeren örneklerde değişkenlik göstermiştir. Yapılan çalışmalarda, Güzel ve ark., (2011), mahlep çekirdeği içi kurumadde oranlarını %6,29; Çelik ve ark., (2015) kuşburnunun toplam kuru madde içeriğini %45,70 ila %53,26 arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Tüm ekstraktların toplam şeker içerikleri Tablo 4.2’de verilmiştir. Tablo incelendiğinde, en yüksek toplam şeker içeriğinin özellikle kuşburnu ekstraktlarında ölçüldüğü ve kuşburnu su ekstraktında $63,10 \pm 2,21$ mg, kuşburnu etanol (%50) ekstraktında $58,23 \pm 1,53$ mg olarak en yüksek toplam şeker değerleri bulunmuştur ($p < 0,05$). Diğer taraftan en düşük toplam şeker miktarları ise zerdeçal metanol ekstraktında $2,45 \pm 0,29$ mg, peynir suyunda $2,96 \pm 0,71$ mg, zerdeçal su ekstraktında $3,23 \pm 0,43$ mg ve mahlep metanol ekstraktında $3,21 \pm 0,29$ mg olarak belirlenmiştir. Kuşburnu ekstraktları içerisinde en düşük toplam şeker miktarı etanol ile hazırlanan çözümlerde belirlenmiş olup genel olarak tüm kuşburnu ekstraktlarının toplam şeker içerikleri daha yüksek bulunmuştur. Zerdeçal ekstraktlarındaki toplam şeker miktarı 2,45-7,63 mg aralığında değişmekle birlikte özellikle su ve metanol ekstraktlarının şeker içerikleri

daha düşük değerlerde kalmıştır. Tarçın ekstraktlarının şeker miktarları incelendiğinde en yüksek değerlerin su ve etanol (%50) ekstraktlarında sırası ile $15,00\pm0,34$ mg ve $23,59\pm1,83$ mg olduğu belirlenmiştir. Mahlep ekstraktında benzer şekilde su ve etanol (%50) ekstraktlarının şeker içerikleri yüksek bulunmuştur. Bu durum şekerlerin su gibi hidrofilik çözgenler ile daha iyi ekstrakte olması ile ilişkilendirilmiştir. Ekstraktlarda bulunan şeker miktarları özellikle EPS fermentasyonlarında besiyeri şeker içeriğinde değişim yaparak mikrobiyal gelişimi arttırıcı yönde etkilemesi açısından önem arz etmektedir. LAB'nin EPS sentezinde QS ve QQ etkileri belirlenecek olan ekstraktların özellikle toplam şeker içerikleri fermentasyonun seyrini etkileyebilmektedir. Ancak ekstraktların fermentasyon ortamına çok düşük düzeylerde ilave edilecek olması bu etkileri azaltacaktır. Moure ve ark. (2001) kuşburnu çekirdeklerinden su ile yapılan ekstraksiyonda çözünür şeker miktarını %7,85 bulmuşlardır. Öztürk ve ark., (2014) mahlep meyvesindeki glikoz, fruktoz ve sakaroz konsantrasyonunu kuru madde bazında sırasıyla %4,4, %2,3 ve 4,4 olarak belirlemişlerdir.

Farag ve ark., (2021), kırmızı mahlepte monosakkaritlerin tespit edilen başlıca şekerler olduğunu bildirmiştir. Nilgün Güneri (2021), zerdeçalın toplam şeker içeriğini 3,21 gr olarak bildirmişlerdir.

Ekstraktların protein miktarları özellikle QS mekanizmasında peptitlerin ve kısa zincirli proteinlerin mekanizma üzerinde etkili olması açısından önemlidir. EPS sentezinde kullanılacak olan LAB'nin Gram pozitif hücre yapısına sahip olmaları, peptitlerin QS sistemleri üzerindeki bilinen etkisinden dolayı ekstraktlardaki protein miktarları dolaylı olarak başarı şansını arttırıcı bir etki göstermektedir. Tablo 4.2'de örneklere ait protein içerikleri verilmiş olup en yüksek protein miktarları mahlep su ekstraktında $411,29\pm20,77$ mg ve zerdeçal etanol ekstraktında $309,10\pm24,54$ mg olarak belirlenmiştir ($p<0,05$). En düşük protein içerikleri ise kuşburnu etanol ekstraktında $6,46\pm0,38$ mg ve kuşburnu etanol (%50) ekstraktında $8,30\pm0,48$ mg olarak belirlenmiştir. Genel olarak kuşburnu ekstraktlarında düşük protein miktarları gözlemlenirken mahlep ve zerdeçal ekstraktlarında daha yüksek protein içerikleri elde edilmiştir. Ayrıca; kuşburnu ve mahlep rneklelerinde çözgen olarak su kullanıldığında, tarçın ve zerdeçal rneklelerinde ise çözgen olarak etanol ve metanol kullanıldığında daha yüksek protein içeriğine ulaşılmıştır. Peynir suyu örneğinde ise hammaddenin yüksek protein içeriğine sahip olmasına rağmen ekstraktında çok daha düşük düzeyde ($8,31\pm0,33$ mg) protein miktarı belirlenmiştir. Bu durum peynir örneğinin olgunlaştırılmadığını ve su ekstraktına hidrolize proteinlerin geçmediğini göstermektedir.

Kuşburnu, zerdeçal, tarçın ve mahlep örneklerinden farklı çözümler ile elde edilen ekstraktların toplam fenolik içerikleri Tablo 4.2’de verilmiştir. Ekstraktların fenolik içerikleri ve dağılımı özellikle QQ aktivitesi açısından önemlidir. QS mekanizmaları özellikle fenolik bileşikler tarafından inhibe edilerek sinyal azalmakta ve ilgili molekülün sentezi azalmaktadır.

Kuşburnu ve tarçın örneklerinden elde edilen bazı ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri mahlep ve zerdeçal örneklerine kıyasla daha yüksek miktarlarda bulunmuştur. Ekstraktlar içerisinde en yüksek fenolik madde tarçın etanol (%50) ekstraktında $2,54 \pm 0,38$ mg, metanol ekstraktında $1,69 \pm 0,21$ mg, etanol ekstraktında $1,66 \pm 0,02$ mg; kuşburnu su ekstraktında $1,70 \pm 0,20$ mg ve metanol ekstraktında $1,13 \pm 0,05$ mg olarak belirlenmiştir. Diğer örneklerle ait ekstraktların toplam fenolik içerikleri daha düşük düzeylerde belirlenmiş olup $0,02-0,67$ mg aralığında değişmiştir. Mahlep örneğinde su, tarçın örneğinde etanol, metanol, zerdeçal örneğinde etanol, metanol ve kuşburnu örneğinde ise su, metanol en iyi fenolik ekstraksiyonunu sağlayan çözümler olmuştur. Czemerly ve ark., (2007), zerdeçaldaki toplam fenolik içeriğin $1,72$ ila $7,46$ g GAE/100g arasında değiştiğini analiz etmişlerdir. Zerdeçalın kuru tozundaki toplam fenolik içeriğinin $825,58$ mg GAE/100g olduğu bulunmuştur. Nisar ve ark., (2015), zerdeçalın toplam fenolik içeriğini etanol (%60), etanol (%80), metanol (%60), metanol (%80) ve sulu ekstraktta sırasıyla $678,76$ mg GAE/100 g, $745,76$ mg GAE/100 g, $53,87$ mg GAE/100 g, $682,43$ mg GAE/100 g ve $496,76$ mg GAE/100 g olarak bildirmiştir. Sonuçlar en yüksek toplam fenolik içerik değerinin etanolik ekstraktta (%80), en düşük değerin ise sulu ekstraktta kaydedildiğini göstermiştir. İlbağ ve ark. (2013), saf su ile elde edilen ekstraktın $566,02$ mg/g değeri ile en yüksek verimi sergilediğini, en düşük toplam fenolik madde miktarının ise $153,35$ mg/g ile %50 etanol çözeltisi ile elde edildiğini bildirmiştir. Daels-Rokotoparison ve ark. (2002), kuşburnunun aseton/su çözeltisinde 40 °C’de maserasyon kullanılarak ekstraksiyonunu araştırmış ve 100 g kurutulmuş kuşburnu başına $197,24$ mg ekstrakt elde etmiştir. Wijewardhana ve ark. (2019), tarçın kabuğu özütünün toplam fenolik içeriğinin kaynaklar arasında en yüksek olduğunu ve 100 g kuru ağırlık başına $18,94$ mg GAE olduğunu göstermiştir. Ereifej ve ark. (2016) etanol kullanıldığında, fenolik konsantrasyonların metanolik ekstraktlardan daha yüksek değerler gösterdiğini bildirmiştir. Karanfil, sumak ve tarçın en yüksek değerlere sahipken; yeşil kakule, kişniş, kimyon ve zencefilin en düşük fenolik konsantrasyonlara sahip olduğunu bulmuşlardır. Metanol, etanol ve aseton ile ekstrakte edilen fenolik bileşik konsantrasyonları araştırılan baharatlar arasında farklılık göstermiştir. Mariod ve ark.

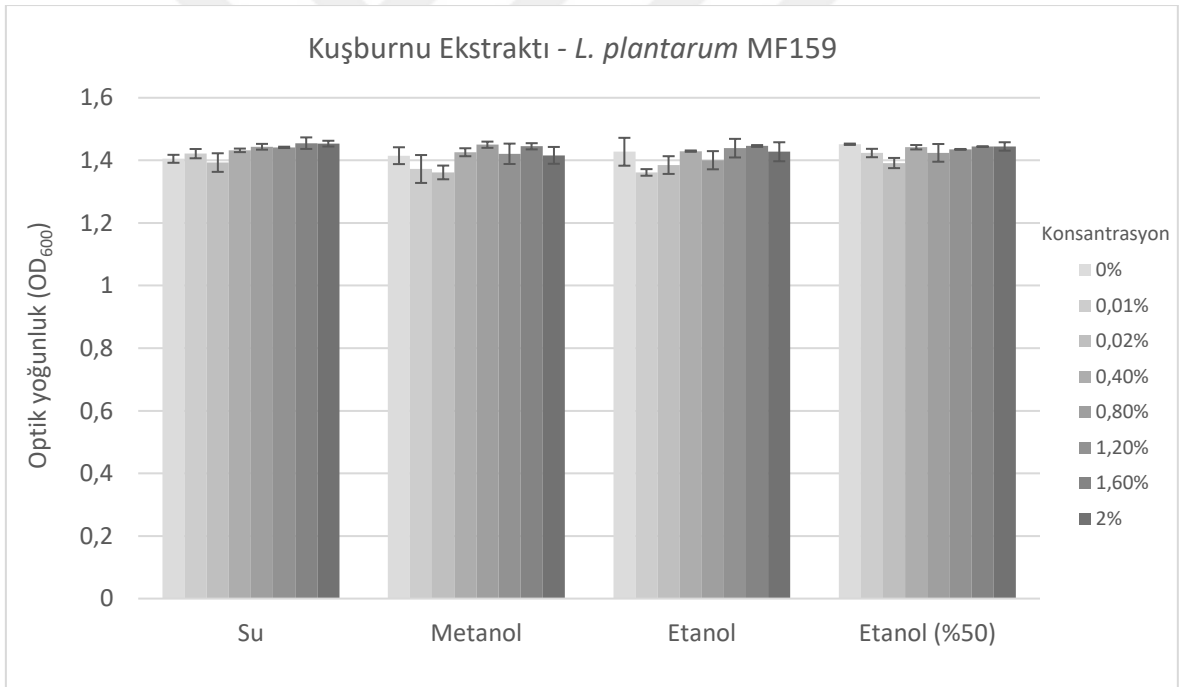
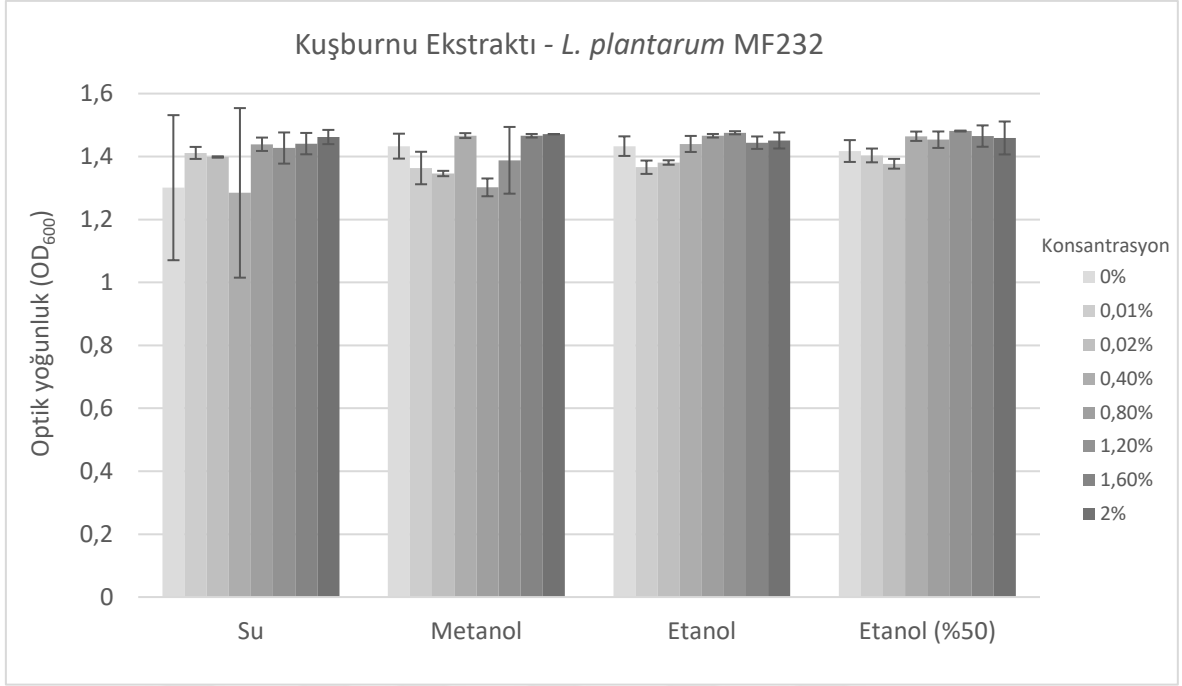
(2010), mahlep meyvesinin metanolik ekstraktının toplam fenolik içeriğini 71,9 olarak bulmuşlardır.

4.2.4 Ekstraktların LAB suşlarının hücre gelişimine etkileri

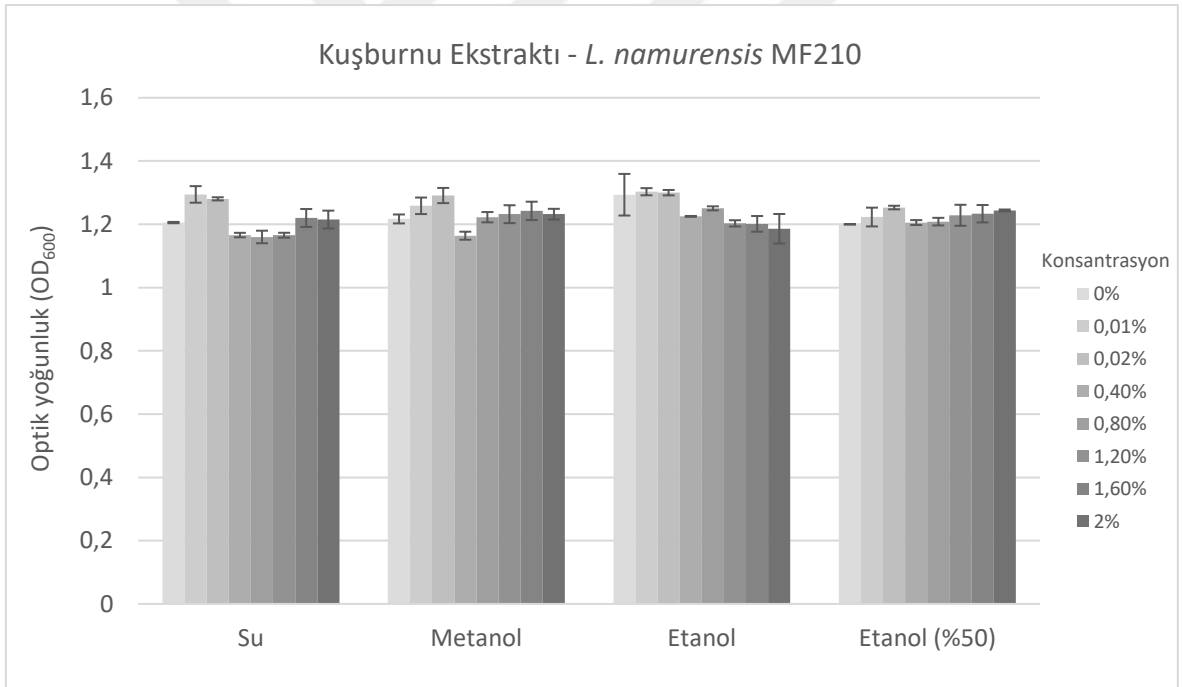
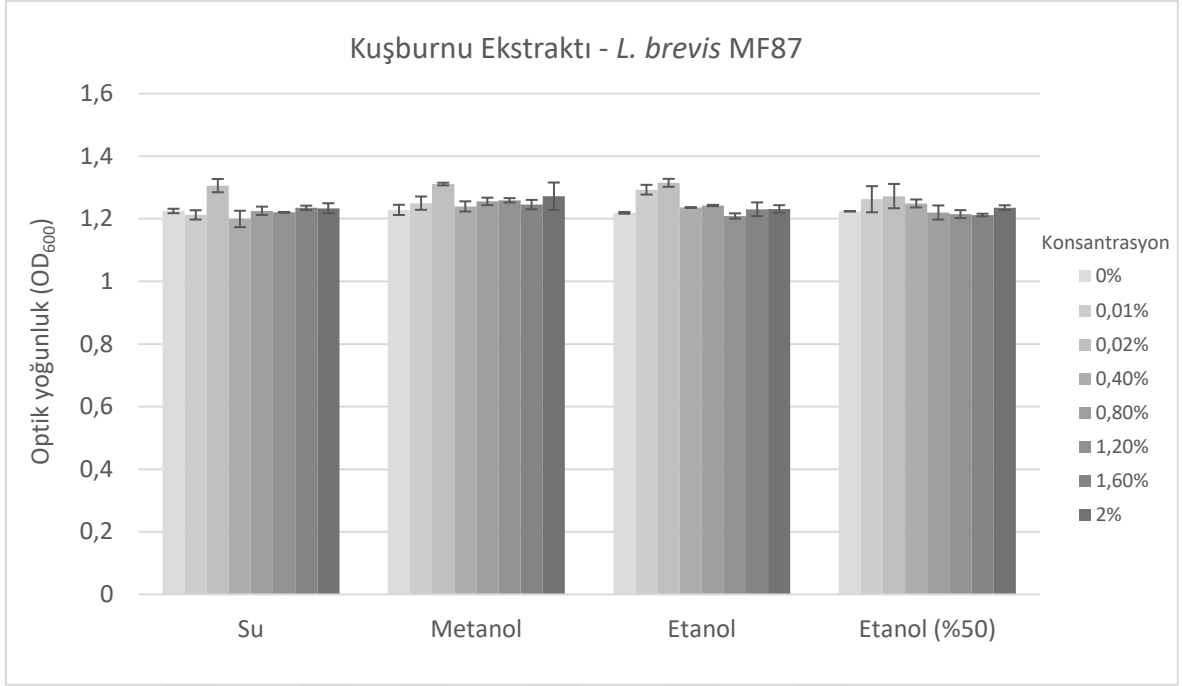
Elde edilen bitkisel ekstraktların (su, etanol, metanol ve %50 etanol), peynir suyunun (PS) ve gallik asit çözeltisinin (5 mg/mL) EPS fermentasyonlarında QS-QQ etkilerinin belirlenmesinden önce ekstraktların doğrudan hücresel gelişimi inhibe edici veya aktivite edici etkilerinin olup olmadığı optik yoğunluk (OD_{600}) takip edilerek test edilmiştir. Bu amaç için daha önceki testler ile belirlenen konsantrasyon aralıkları temel alınarak (%0,01, %0,02, %0,4, %0,8, %1,2, %1,6 ve %2) kültür ortamına ilave edilmiş ve inhibisyon veya aktivasyon etkileri belirlenmiştir. Bitkisel ekstraktların (su, metanol, etanol, %50 etanol), peynir suyunun ve gallik asit çözeltisinin inhibisyon veya aktivasyon konsantrasyonlarının belirlenmesi için *L. plantarum* MF232, *L. plantarum* MF159, *L. brevis* MF87 ve *L. namurensis* MF210 suşlarında gerçekleştirilen OD_{600} ölçüm sonuçları Şekil 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11’de yer almaktadır.

Şekil 4.7’de kuşburnundan farklı çözümler ile elde edilen ekstraktların artan konsantrasyonlarda (%0,01-%2) LAB suşlarının hücresel gelişimlerine etkileri görülmektedir. *L. plantarum* MF232 suş gelişimine kuşburnu ekstraktlarının etkisi incelendiğinde, etanol ve etanol (%50) ekstraktlarının tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna kıyasla hücresel gelişimde anlamlı bir değişim meydana getirmediği belirlenmiştir. Diğer taraftan su ekstraktının kontrol grubunda ölçülen OD_{600} değerinin ($1,30 \pm 0,23$) standart sapması yüksek bulunmuş olup su ekstraktlarının diğer konsantrasyonlarında ölçülen değerler ile benzer olduğu kabul edilmiştir. Kuşburnu metanol ekstraktında %0,02 ve %0,8 konsantrasyonlarında hücre yoğunluğu sırası ile $1,35 \pm 0,01$ ve $1,30 \pm 0,03$ olarak kontrol grubuna ($1,43 \pm 0,04$ OD_{600}) göre biraz daha düşük düzeylerde ölçülmüştür. *L. plantarum* MF159 hücre gelişimine kuşburnu ekstraktlarının etkileri incelendiğinde, su, metanol, etanol ve etanol (%50) ekstraktlarının hücresel gelişim üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı ve kontrol gruplarında ölçülen OD_{600} değerlerine yakın ölçümlerin alındığı görülmektedir. Kuşburnu su ekstraktlarının artan konsantrasyonları ile *L. plantarum* MF159 suş gelişiminde minimal bir artışa sebep olduğu belirlenmiştir. *L. brevis* MF87 suşu ile yapılan çalışmada kuşburnu %0,02 su ekstraktında ($1,31$ OD_{600}), %0,02 metanol ekstraktında ($1,31$ OD_{600}),

%0,01-%0,02 etanol ekstraktında (1,29-1,32 OD₆₀₀) kontrol gruplarına kıyasla hücre gelişimlerinde hafif bir artış gözlenmektedir. Su, metanol ve etanol ekstraktlarının diğer konsantrasyonlarında ise kontrol grupları ile benzer değerler ölçülmüştür. Kuşburnu etanol (%50) ekstraktında ise tüm konsantrasyonlardaki hücre gelişimleri benzer bulunmuştur. *L. namurensis* MF210 suşunun kuşburnu ekstraktlarına ait veriler Şekil 4.7’de incelenecek olursa, kuşburnu su ekstraktlarında %0,01 ve %0,02 konsantrasyonlarında hücre gelişiminde kontrol örneğine kıyasla (1,20 OD₆₀₀) bir miktar artış (1,30-1,28 OD₆₀₀) meydana gelirken %0,4, %0,8 ve %1,2 konsantrasyonlarında ise bir miktar düşüş (1,17 OD₆₀₀) meydana gelmiştir. Benzer şekilde metanol ekstraktlarında da düşük konsantrasyonlarda hücre gelişimi bir miktar artarken diğer konsantrasyonlarda kontrol grubu ile benzer veriler elde edilmiştir. *L. namurensis* MF210 kuşburnu etanol ekstraktında ise kontrol grubunun standart sapmasının yüksek olması diğer konsantrasyonlarda elde edilen ölçümler ile benzer sonuçlara sebep olmuştur. Etanol (%50) ekstraktında ise tüm konsantrasyonlarda hücre gelişimleri benzer bulunmuştur.

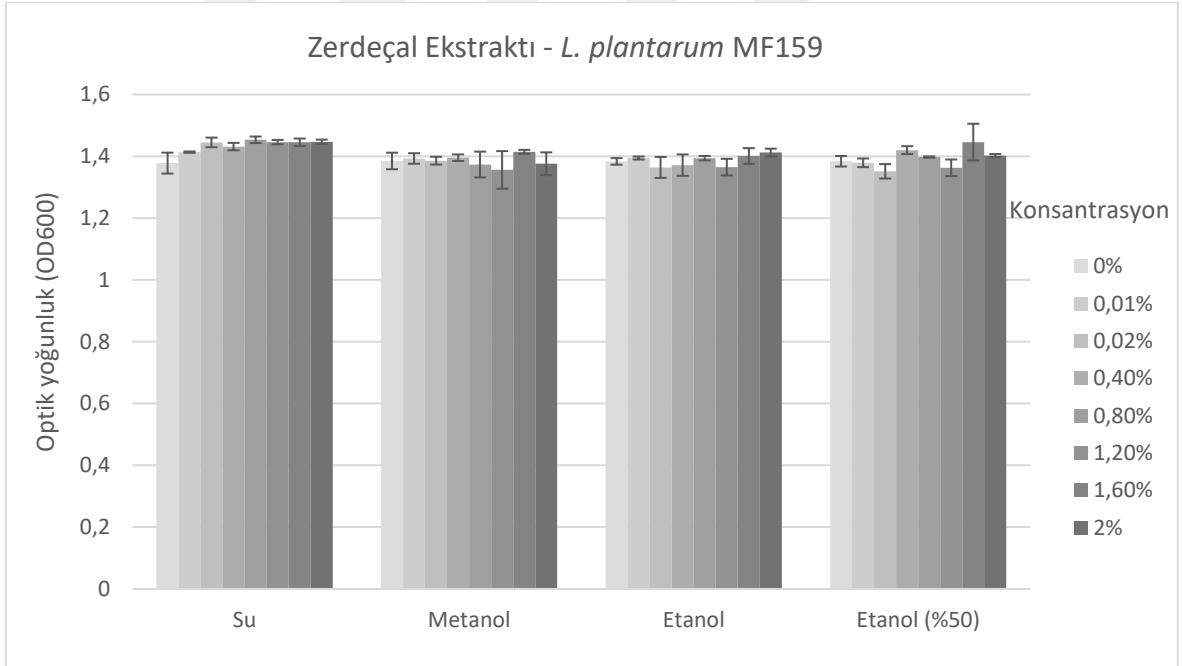
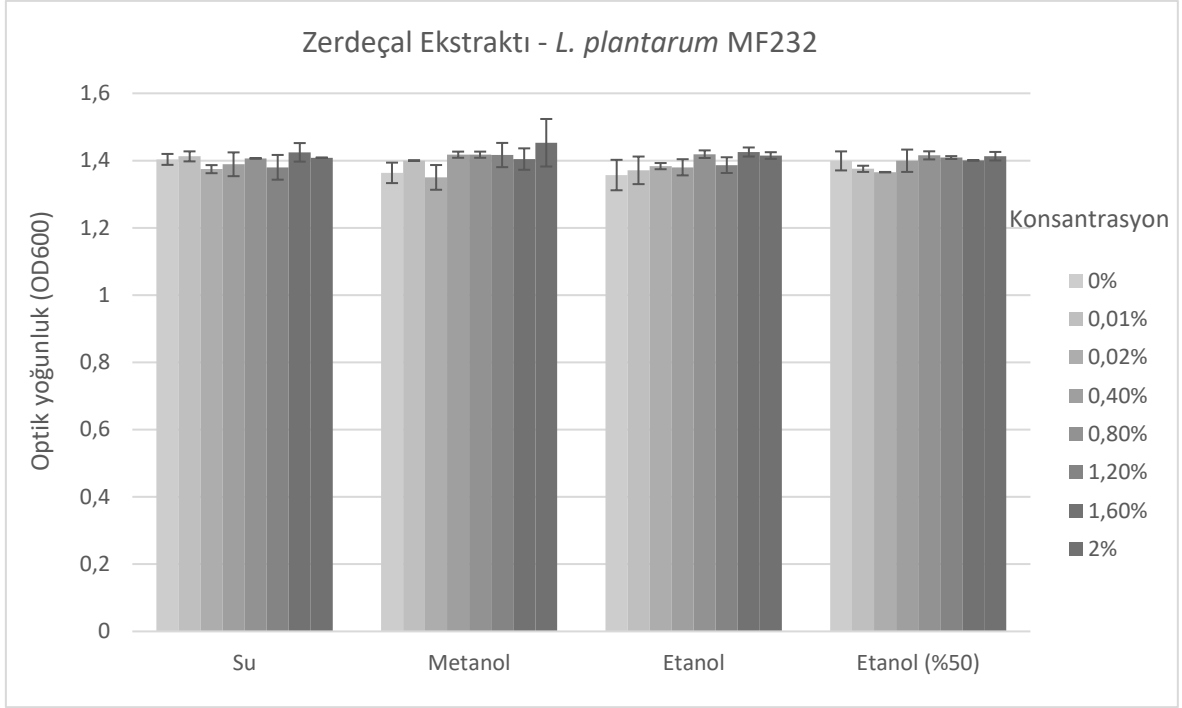


Şekil 4.7. Kuşburnu ekstraktlarının LAB suşlarının hücre gelişimine etkisi

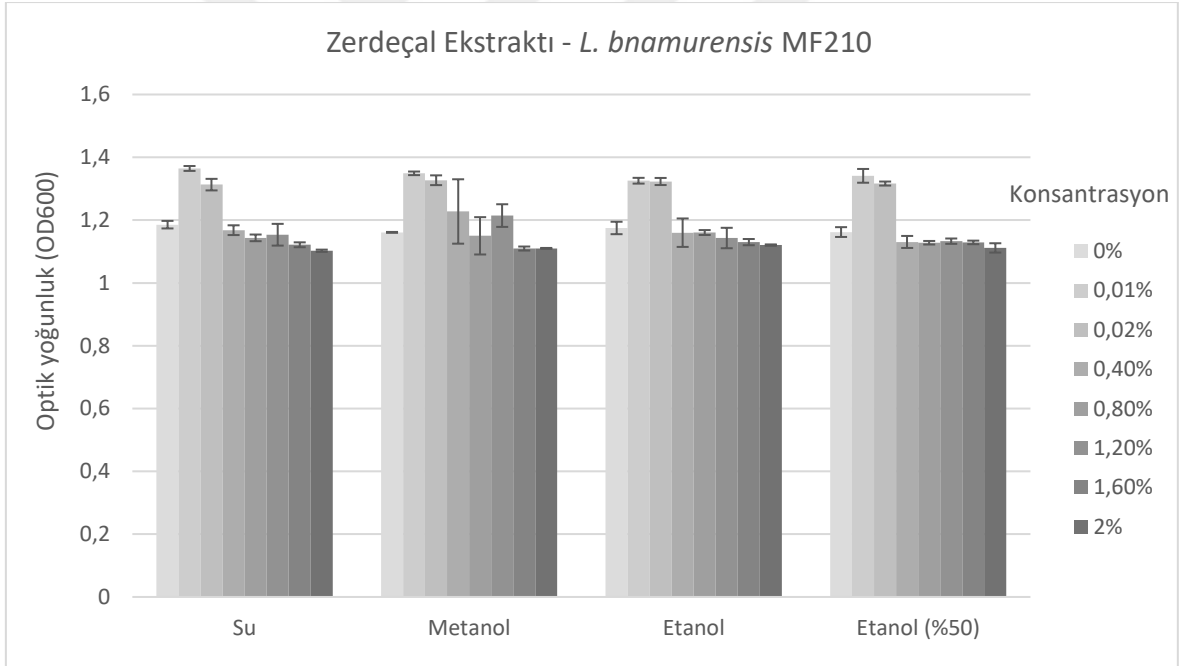
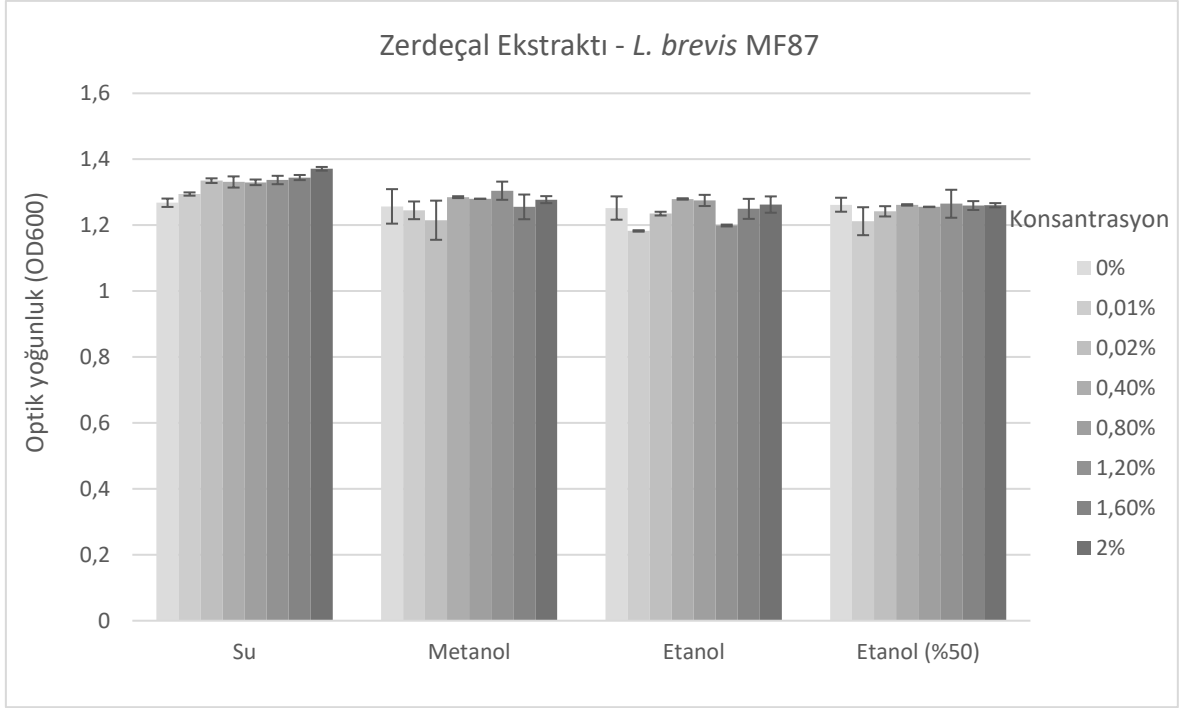


Şekil 4.7. Kuşburnu ekstraktlarının LAB suşlarının hücre gelişimine etkisi (devam)

Şekil 4.8’de zerdeçal örneklerinden farklı çözümler ile elde edilen ekstraktların artan konsantrasyonlarda LAB suşlarının hücresel gelişimlerine etkileri görülmektedir. *L. plantarum* MF232 suş gelişimine zerdeçal ekstraktlarının etkisi incelendiğinde su, metanol, etanol ve etanol (%50) çözümleri ile hazırlanan ekstraktların hücre gelişimini belirgin düzeyde azaltıcı veya arttırıcı etkisinin olmadığı görülmektedir. *L. plantarum* MF159 hücre gelişiminde ise zerdeçal su ekstraktının artan konsantrasyonu ile bir miktar hücre gelişiminde artış sağlandığı ve %2 ekstrakt konsantrasyonunda 1,45 OD₆₀₀ değerine ulaştığı görülmüştür. Ancak; bu tür artışlar istatistiksel olarak anlamlı olsa da hücre gelişiminin optik yoğunluk ile ölçülmesinden kaynaklı olarak hassasiyetinin düşük olması sebebi ile önemli görülmemiştir. Zerdeçal; metanol ve etanol ekstraktlarının ise *L. plantarum* MF159 suşunu etkilemediği belirlenmiştir. *L. brevis* MF87 suşunda zerdeçal su ekstraktının kontrol grubu ile %0,01 konsantrasyonu benzer hücre yoğunluğu gösterirken bu konsantrasyondan sonra hücre yoğunlukları biraz daha yüksek değerlerde ölçülmüştür. Metanol, etanol ve etanol (%50) ekstraktlarında ise kontrol grupları ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Zerdeçal ekstraktları ile gerçekleştirilen çalışmalarda en belirgin hücre aktivitesindeki değişimler *L. namurensis* MF210 suşunda meydana gelmiştir. Bu suş üzerinde zerdeçal ekstraktının tüm çeşitlerinin hücre konsantrasyonunda belirgin bir artışa veya azalmaya sebep olduğu Şekil 4,8’de görülmektedir. Zerdeçal su, metanol, etanol ve etanol (%50) ekstraktlarının %0,01 ve %0,02 konsantrasyonlarda *L. namurensis* MF210 suşunun hücre gelişiminde kontrol gruplarına kıyasla belirgin bir artış sağladığı belirlenmiştir. Kontrol gruplarında yaklaşık 1,16-1,19 ölçülen OD₆₀₀ değeri bu konsantrasyonlarda yapılan ölçümlerde yaklaşık 1,36 OD₆₀₀ değerlerine kadar yükselmiştir. Bu durum zerdeçal ekstraktlarının çok düşük konsantrasyonlarda hücre gelişimini QS aracılığı ile arttırıcı yönde bir etki gösterebileceğini düşündürmüştür. Diğer taraftan %1,6 ve %2 metanol ekstraktının; %1,6 ve %2,0 etanol ekstraktının; %1,2 ve %2,0 etanol (%50) ekstraktının ise *L. namurensis* MF210 suşunun gelişimini inhibe ederek inkübasyon sonunda kontrol örneklerine göre daha düşük düzeyde OD₆₀₀ değeri ölçülmesine sebep olmuştur. Zerdeçal ekstraktlarının hücre gelişimlerini bu şekilde etkilemesi EPS fermantasyonunda bu tür ekstraktın kullanımını sınırlandırabileceği ancak yine de bu tür hücre miktarındaki artış veya azalmaların EPS özgül ürün oluşumu açısından değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Zerdeçal ekstraktlarının düşük ve yüksek konsantrasyonlarının *L. namurensis* MF210 suşunun EPS fermantasyon çalışmalarında kullanımı kararı verilmiştir.

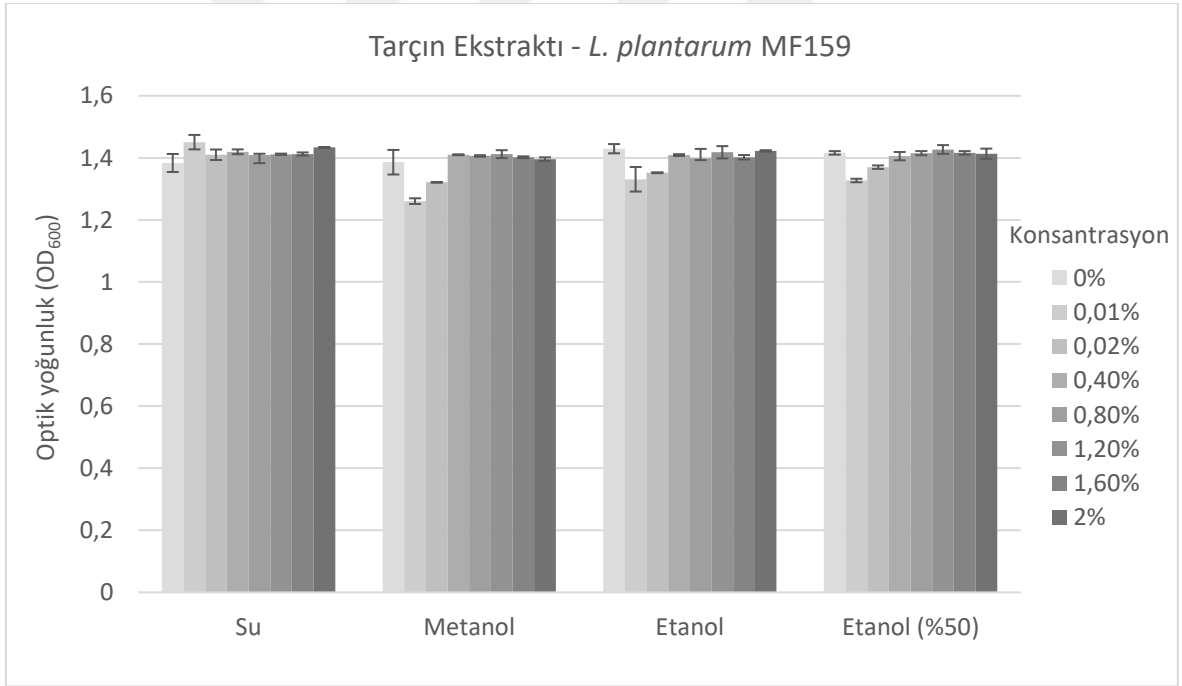
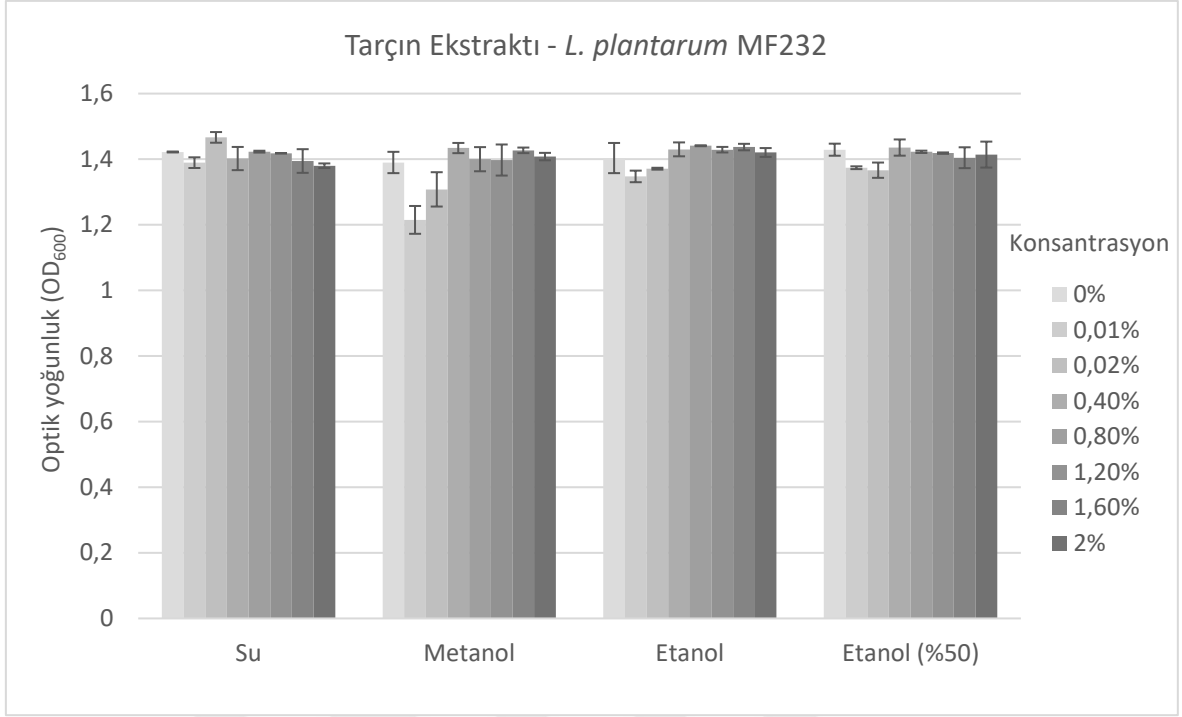


Şekil 4.8. Zerdeçal ekstraktlarının LAB suşlarının hücre gelişimine etkisi

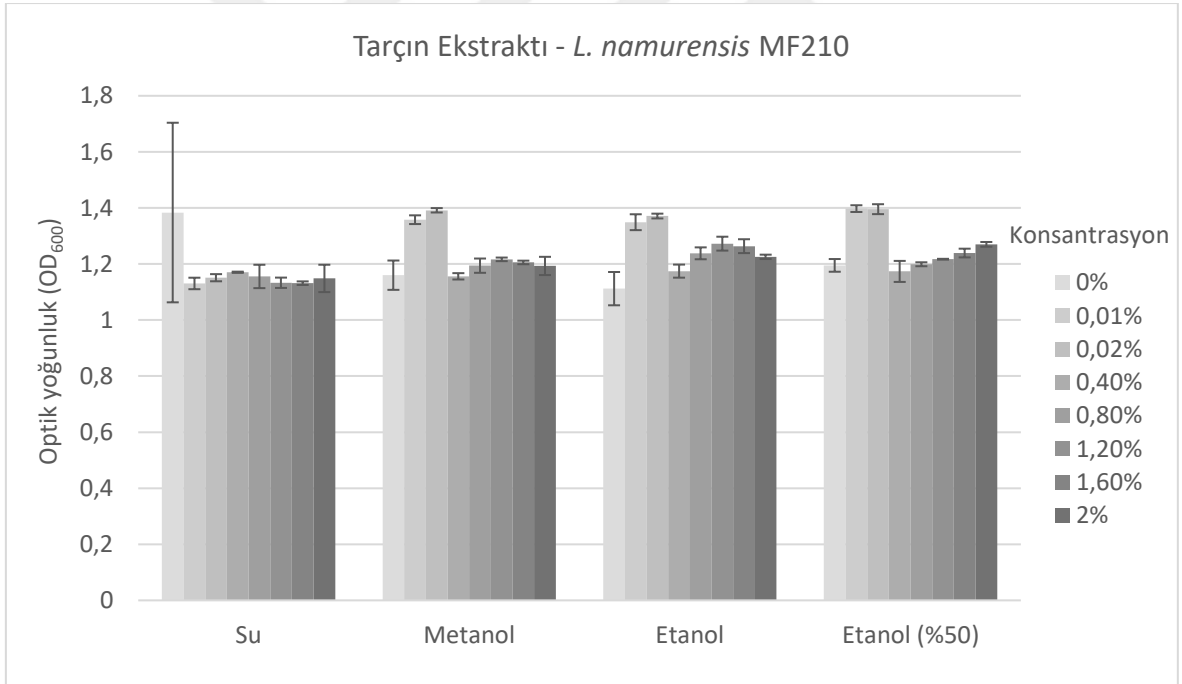
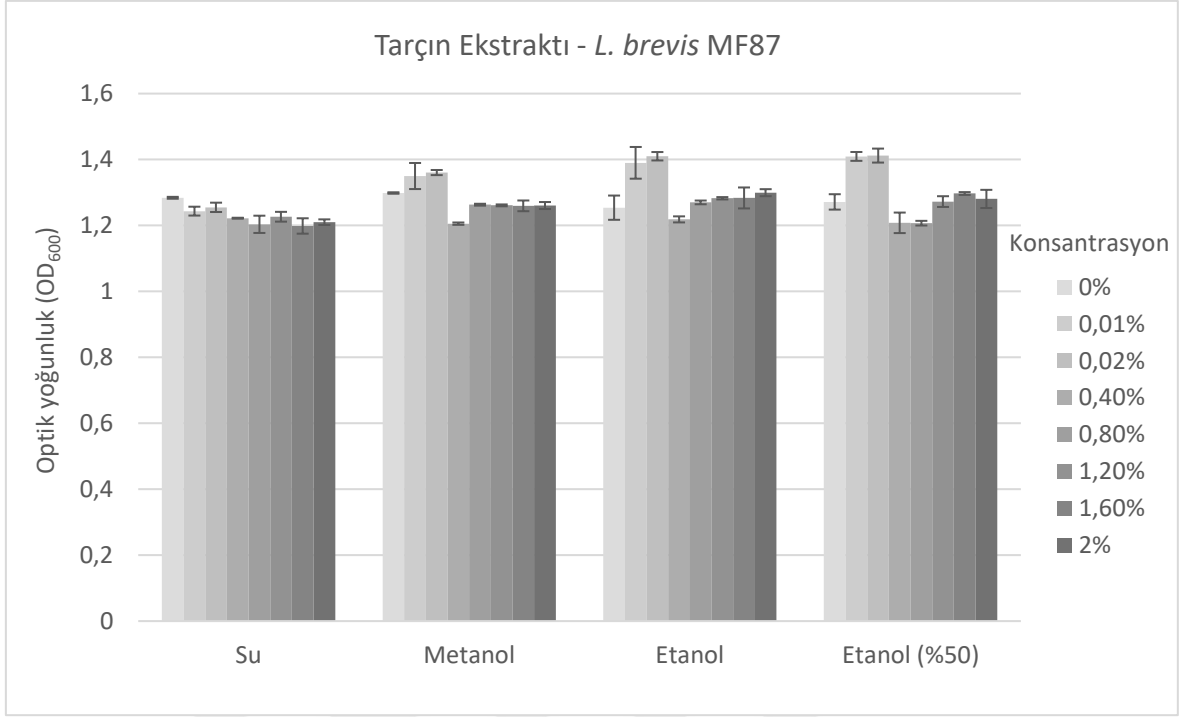


Şekil 4.8. Zerdeçal ekstraktlarının LAB suşlarının hücre gelişimine etkisi (devam)

Şekil 4.9’da tarçın örneklerinden farklı çözümler ile elde edilen ekstraktların LAB suşlarının inkübasyon sonunda hücresel gelişimlerine etkileri görülmektedir. *L. plantarum* MF232 suş gelişimine tarçın ekstraktlarının etkisi incelendiğinde; su, etanol ve etanol (%50) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının suş gelişimini önemli ölçüde etkilemediği ve kontrol örnekleri ile yakın değerlerde optik yoğunluk değerleri elde edildiği belirlenmiştir. Ancak; %0,01 ve %0,02 tarçın ekstraktlarının *L. plantarum* MF232 hücre gelişimini bir miktar baskıladığı ve kontrol grubunda 1,39 OD₆₀₀ değerinde ölçülen gelişmenin azalarak sırası ile 1,22 OD₆₀₀ ve 1,31 OD₆₀₀ olarak gerçekleştiği belirlenmiştir. *L. plantarum* MF159 hücre gelişiminde de benzer şekilde tarçın %0,01 ve %0,02 metanol, etanol ve etanol (%50) ekstraktlarında OD₆₀₀ değerleri kontrol gruplarına kıyasla bir miktar düşük bulunmuş olup su ekstraktlarında ve diğer çözümler konsantrasyonlarda gelişmede önemli bir değişim gerçekleşmemiştir. *L. brevis* MF87 suşuna ait şekil incelendiğinde tarçın su ekstraktlarının artan konsantrasyon ile gelişimi çok az baskıladığı ancak bu azalmanın önemsiz olduğu görülmektedir. Metanol ve etanol ekstraktlarında ise düşük konsantrasyonlarda (%0,01 ve %0,02) hücre gelişimlerinin artış gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle etanol ekstraktlarında bu artış önemli ölçüde gerçekleşmektedir. Benzer şekilde metanol ve etanolün düşük konsantrasyonlarında gözlenen hücre artışı *L. namurensis* MF210 suşunda da belirlenmiştir. Tarçın su ekstraktının ise *L. namurensis* MF210 hücre gelişimine önemli bir etkisi bulunmamıştır.



Şekil 4.9. Tarçın ekstraktlarının LAB suşlarının hücre gelişimine etkisi

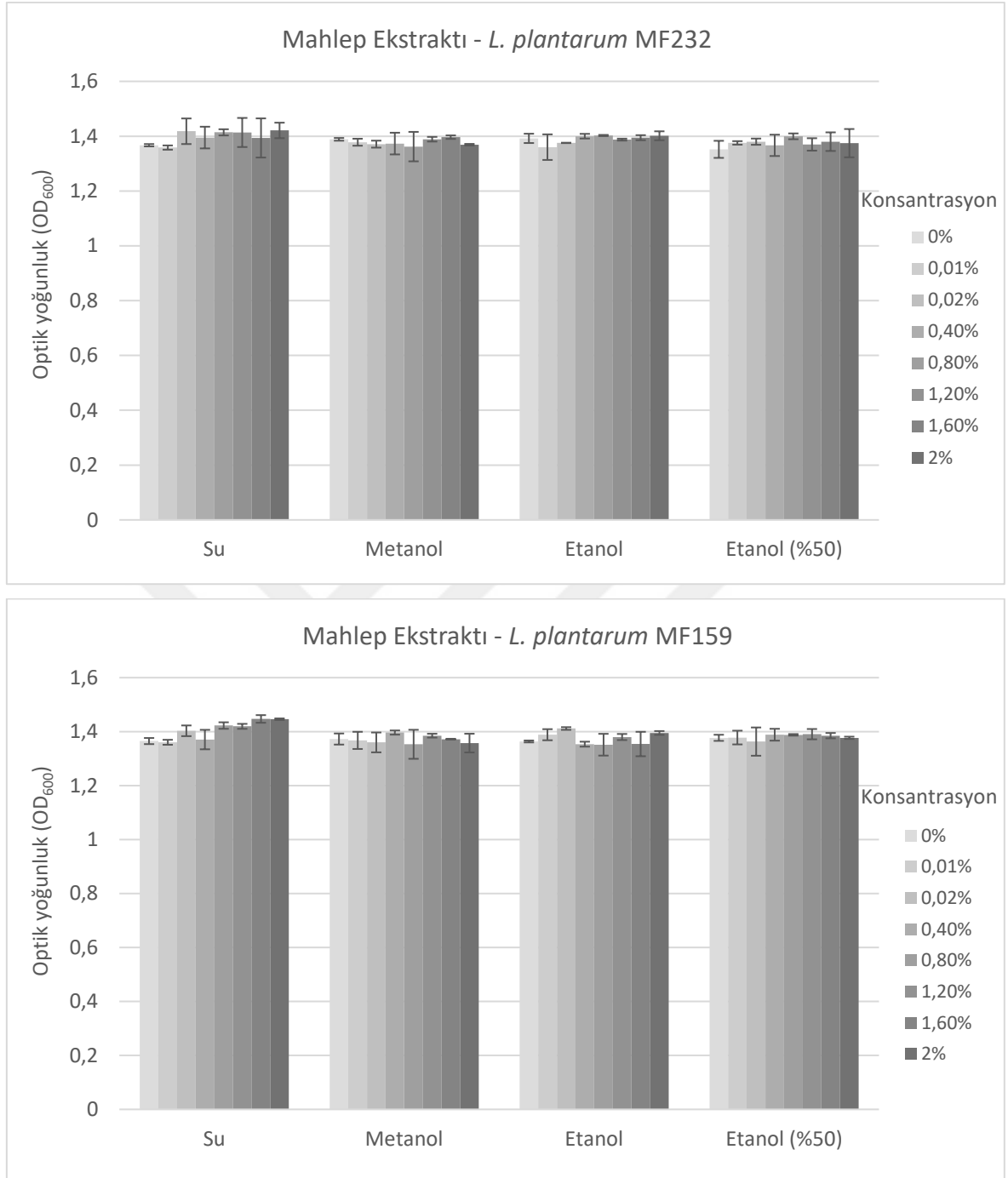


Şekil 4.9. Tarçın ekstraktlarının LAB suşlarının hücre gelişimine etkisi (devam)

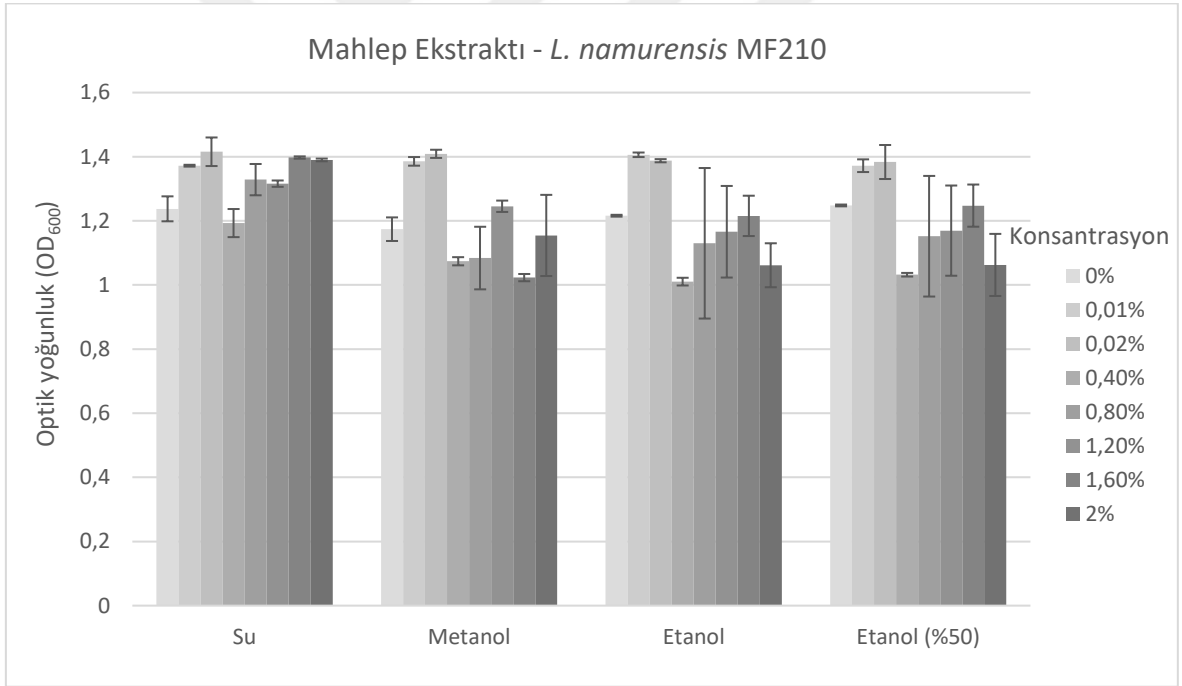
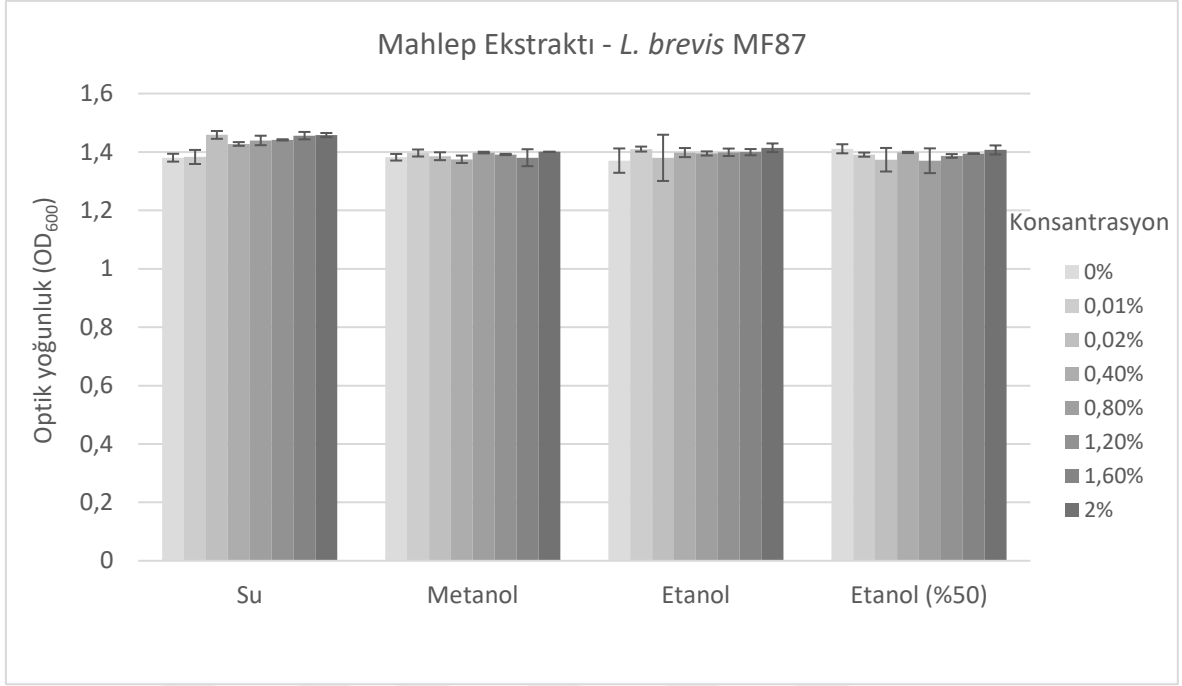
Şekil 4.10’da mahlep örneklerinden elde edilen ekstraktların suşların gelişimlerine etkileri görülmektedir. *L. plantarum* MF232 ve *L. plantarum* MF159 suş gelişimine mahlep ekstraktlarının etkisi incelendiğinde, tüm ekstraktların suşun gelişimde önemsiz etkilerinin olduğu ve gelişimi arttırıcı veya azaltıcı yönde etki etmedikleri belirlenmiştir. *L. brevis* MF87 suşunda da benzer şekilde metanol, etanol ve etanol (%50) ekstraktları gelişimi

etkilemezken su ekstraktında artan konsantrasyon ile birlikte düşük düzeyde bir artış belirlenmiştir. Mahlep ekstraktları zerdeçal ekstraktlarında olduğu gibi *L. namurensis* MF210 suşunun gelişiminde önemli farklılıklar ve dalgalanmalar meydana getirmiştir. Şekil 4.10 incelendiğinde düşük konsantrasyonlardaki (%0,01 ve %0,02) su, metanol, etanol ve etanol (%50) ekstraktlarının hücre gelişimini teşvik ederek OD₆₀₀ değerini 1,40'a kadar arttırdığı belirlenmiştir. Mahlep ekstraktlarının yüksek konsantrasyonlarında *L. namurensis* MF210 hücre gelişiminde ölçülen değerler ise dalgalı bir şekilde ve standart sapma değerleri yüksek olarak hesaplanmıştır. Mahlep su ekstraktında yüksek konsantrasyonlarda da hücresel gelişimdeki artış devam etmektedir.

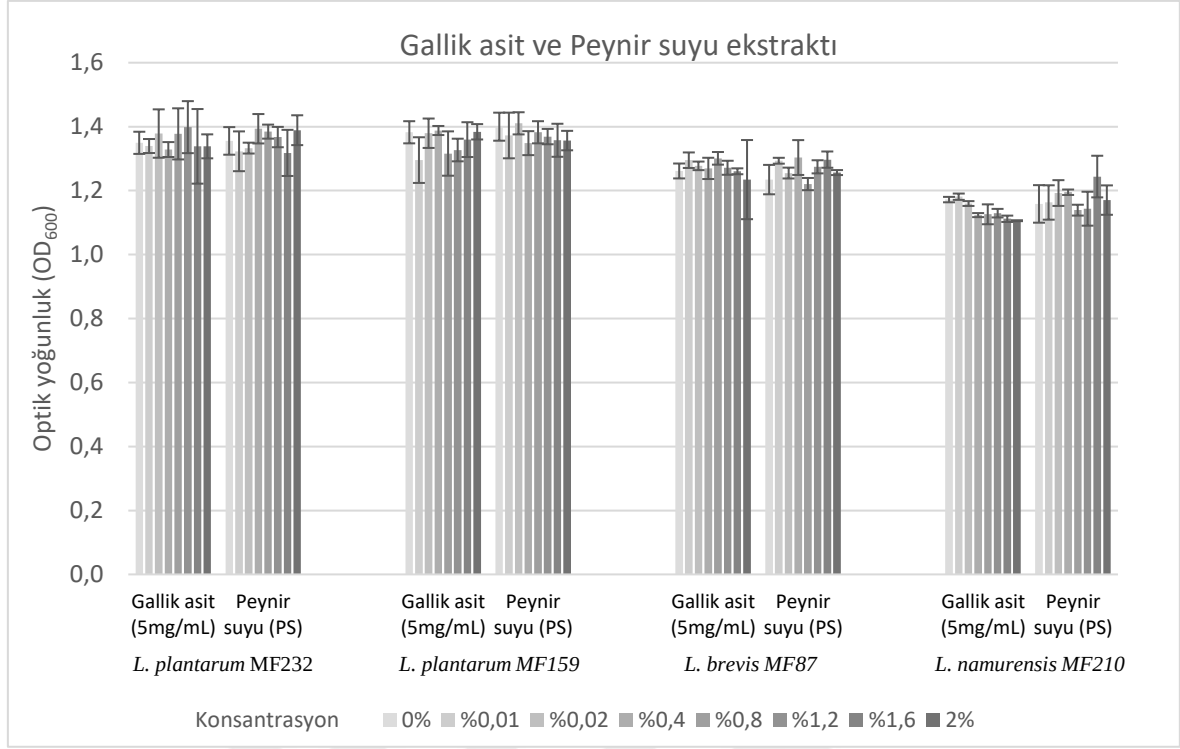
Peynir suyu ekstraktı ve gallik asit çözeltisinin farklı konsantrasyonlarda *L. plantarum* MF232, *L. plantarum* MF159, *L. brevis* MF87 ve *L. namurensis* MF210 suşlarının hücre gelişimleri üzerindeki etkisi Şekil 4.11'de gösterilmiştir. Gallik asit ve peynir suyu artan konsantrasyonlarda *L. plantarum* MF232, *L. plantarum* MF159, *L. brevis* MF87 suşlarında kontrol gruplarına göre gelişimde anlamlı bir değişim yapmamıştır. Ancak; *L. namurensis* MF210 hücre gelişiminde gallik asit çözeltisinin yüksek konsantrasyonları OD₆₀₀ değerinde bir miktar düşmeye sebep olduğu görülmektedir.



Şekil 4.10. Mahlep ekstraktlarının LAB suşlarının hücre gelişimine etkisi



Şekil 4.10. Mahlep ekstraktlarının LAB suşlarının hücre gelişimine etkisi (devam)



Şekil 4.11. Gallik asit çözeltisi ve peynir suyu ekstraktının LAB suşlarının hücre gelişimine etkisi

Yapılan bazı çalışmalarda elde edilen sonuçlar şu şekildedir; Gul ve ark. (2015) metanol, kloroform ve n-hekzan ile ekstrakte edilen zerdeçal ekstraktının *Salmonella* türlerine karşı inhibe edici aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Benzer sonuçlar Mohammad ve ark., (2010) tarafından da rapor edilmiştir. Cem Okan Özer (2017) tarafından yapılan çalışmanın sonuçları, kuşburnunun fermente et model sisteminde herhangi bir kalite sorunu oluşturmadan lipid oksidasyonunu engellemek için kullanılabileceğini göstermiştir. Bayıra ve ark. (2019), probiyotik yoğurda eklenen tarçının ürünün mikrobiyal ve kimyasal kalitesini iyileştirdiğini ve duyuşal özellikler üzerinde sınırlı olumlu etkileri olduğunu bildirmiştir.

4.3. EPS Fermantasyonuna Ekstraktların QS ve QQ Etkisi

4.3.1. Kuşburnu ekstraktlarının etkisi

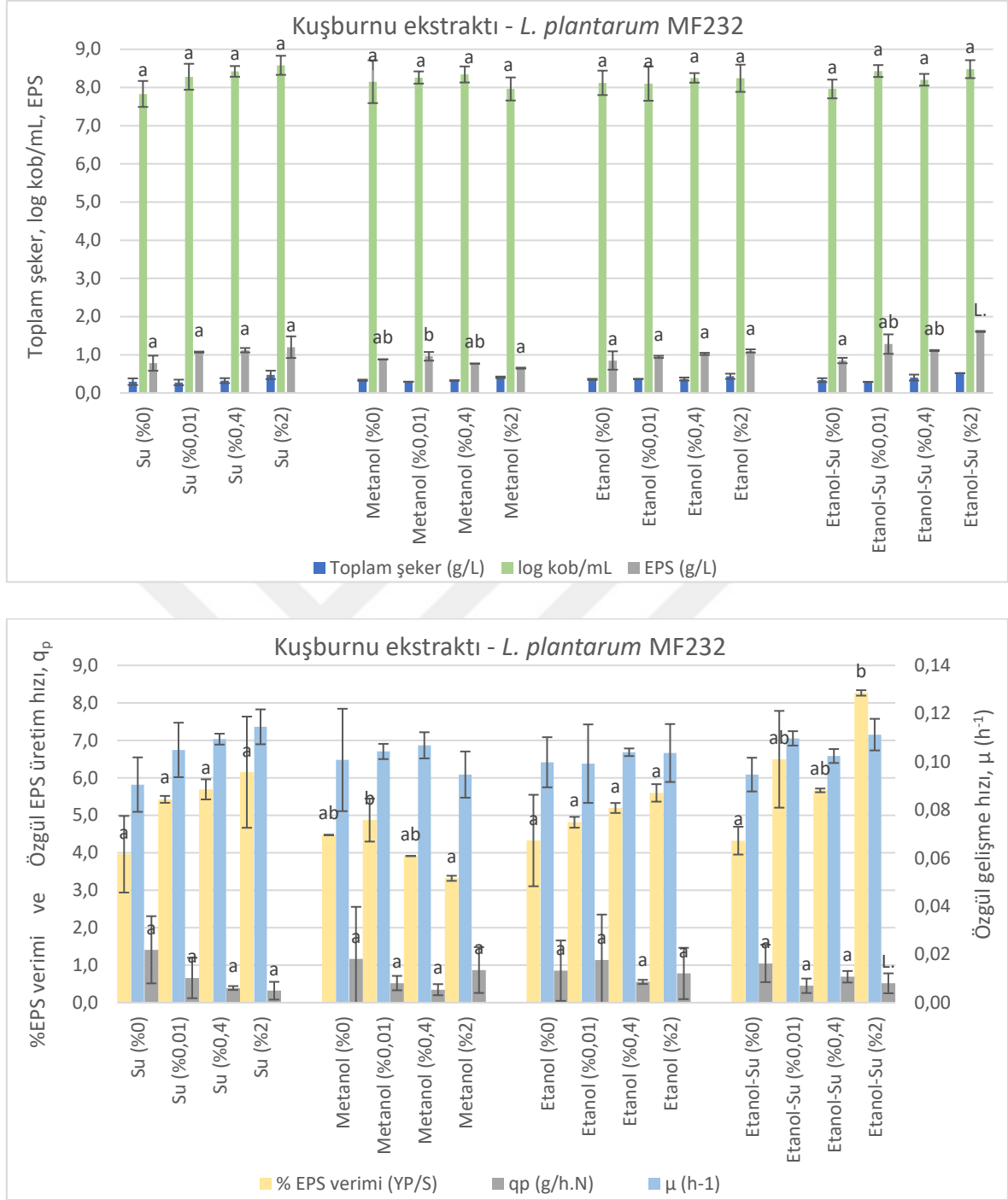
Kuşburnu, zerdeçal, tarçın ve mahlep örneklerine ait su, etanol, metanol, etanol (%50) ekstraktları, peynir suyu ekstraktı ve gallik asit çözeltisi (5mg/mL) 3 farklı oranda (%0,01, %0,4 ve %2) ilave edilerek *Lactobacillus plantarum* MF159, *Lactobacillus plantarum* MF232, *Lactobacillus brevis* MF87, *Lactobacillus namurensis* MF210 EPS fermantasyonuna QS ve QQ etkileri incelenmiştir.

Kuşburnu ekstraktlarının (su, metanol, etanol, etanol-su) *L. plantarum* MF232 EPS fermantasyonu sonunda hücre sayısı, üretilen EPS miktarları ve besiyeri kalan şeker içerikleri Şekil 4.12’de verilmiştir. Şekil incelendiğinde kuşburnu su ekstraktının %0,4 ve %2 konsantrasyonda kontrol grubuna göre canlı hücre sayılarında (7,83 log kob/mL) bir miktar artış gözlemlendiği ve hücre sayısının 8,58 log kob/mL değerine arttığı belirlenmiştir. Benzer şekilde canlı hücre sayısındaki artışa paralel olarak EPS miktarları da artış eğiliminde olmakta ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Kuşburnu su ekstraktları ile gerçekleştirilen EPS fermantasyon verilerinden hesaplanan kinetik parametreler incelenecek olursa (Şekil 4.12), hücre birim başına düşen özgül EPS üretim hızı (q_{EPS}) artan konsantrasyon ile azalarak 0,12 g/N.h değeri elde edilmiştir. Kuşburnu su ekstraktlarında EPS verimi ise %3,96-%6,15 hesaplanmış ve EPS miktarındaki artışa bağlı olarak verim de artmıştır. EPS verimi (Y_p/s), fermantasyonlarda hücrenin birim substrat başına oluşturduğu ürünlerin miktarı olarak tanımlanmaktadır. Substratların ne kadarının EPS veya metabolitlere dönüştürüldüğünün önemli bir göstergesidir. Tür farklılıkları, substrat farklılıkları veya koşullardaki değişimler bu verimi etkileyebilmektedir. *L. plantarum* MF232 kuşburnu metanol ekstraktlarında tüm konsantrasyonlarda belirlenen canlı hücre sayısı benzer ($p>0,05$) bulunmuş olup %0,4 ve %2 metanol konsantrasyonlarında EPS miktarında kontrol grubuna kıyasla (0,88 g/L) minimal bir azalma meydana gelerek sırası ile 0,77 ve 0,65 g/L EPS bulunmuştur.

Metanol ekstraktlarının kinetik parametreleri incelenecek olursa özgül EPS üretim hızlarında anlamlı bir değişimin meydana gelmediği görülmektedir ($p>0,05$). EPS verimleri ise %3,32-%4,87 aralığında hesaplanmış olup artan metanol konsantrasyonu ile birlikte EPS miktarındaki azalmaya bağlı olarak düşmüştür. Etanol ekstraktlarında da canlı hücre sayıları sabit kalmış ve EPS sentez miktarları benzer bulunmuştur ($p>0,05$). Etanol ekstraktlarında

öztöl EPS üretim hızlarında anlamlı bir değışim olmazken EPS verimlerinin %4,33 (%0 etanol) değerinden %5,62 (%2 etanol) değerine arttığı belirlenmiştir. Etanol-su ekstraktlarında ise özellikle %4 konsantrasyonda EPS miktarının 1,61 g/L değerine ulaştığı ve bu değerin kontrol grubuna (0,85 g/L) göre yaklaşık iki kat daha yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Ancak; öztöl EPS üretim hızı ise kontrol gurubuna göre benzer hesaplanmıştır ($p>0,05$). %2 etanol-su ekstraktlarından elde edilen EPS verimi %8,26 olarak en yüksek değerde gerçekleşmiştir ($p<0,05$).





Şekil 4.12. Kuşburnu ekstraktlarının *L. plantarum* MF232 EPS fermentasyonuna etkisi

L. plantarum MF159 EPS fermentasyonu sonunda hücre sayısı, üretilen EPS miktarları, besiyeri kalan şeker içerikleri ve fermentasyon kinetik parametreleri Şekil 4.13'te verilmiştir. Şekil incelendiğinde kuşburnu tüm ekstraktlarının canlı hücre sayılarında anlamlı bir değişim yapmadığı ve benzer şekilde üretilen EPS miktarlarının da aynı kaldığı

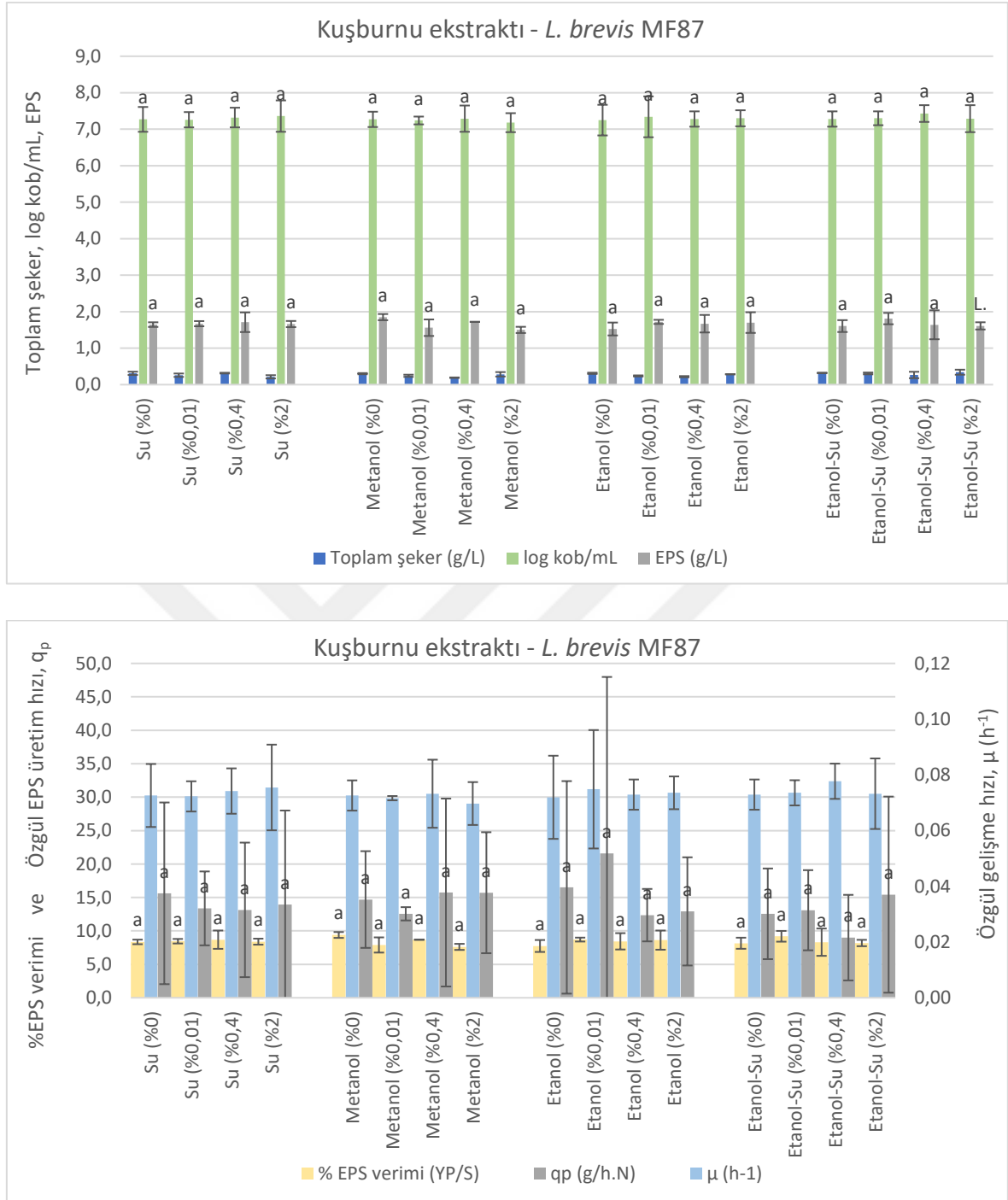
görülmüştür ($p>0,05$). Sadece %0,4 metanol ekstraktında EPS miktarında minimal bir azalma belirlenmiş ancak istatistiksel olarak benzer bulunmuştur ($p>0,05$).



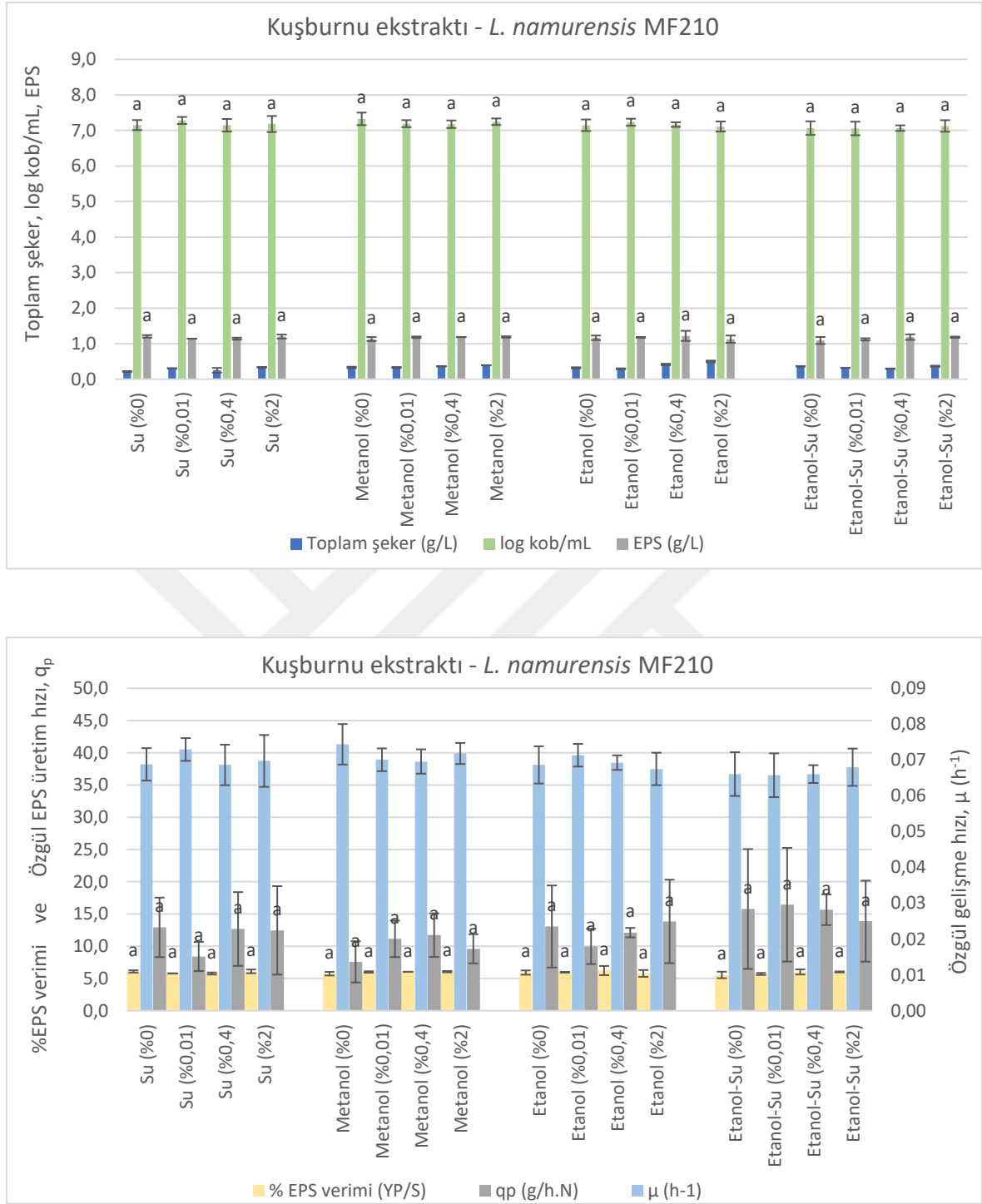
Şekil 4.13. Kuşburnu ekstraktlarının *L. plantarum* MF159 EPS fermentasyonuna etkisi

Kuşburnu ekstraktlarının (su, metanol, etanol, etanol-su) *L. brevis* MF87 EPS fermantasyonu sonunda hücre sayısı, üretilen EPS miktarları, besiyeri kalan şeker içerikleri ve fermantasyon kinetik parametreleri Şekil 4.14'te verilmiştir. Kuşburnu su, metanol, etanol, etanol-su ekstraktlarında canlı hücre sayıları tüm konsantrasyonlarda benzer bulunmuştur ($p>0,05$). EPS miktarları ise su, etanol ve etanol-su ekstraktlarının tüm konsantrasyonlarında yakın değerlerde (1,85 g/L) belirlenirken, %2 metanol konsantrasyonunda ölçülen EPS miktarı (1,50 g/L) kontrol grubunda ölçülen değere göre daha düşük ancak benzer bulunmuştur ($p>0,05$). Kinetik parametreler açısından tüm ekstraktlarda hesaplanan EPS verimleri benzer bulunmuştur ($p>0,05$).

L. namurensis MF210 suşunda kuşburnu ekstraktlarının EPS fermantasyonuna etkileri ve fermantasyon kinetik parametreleri Şekil 4.15'te verilmiştir. Tüm ekstraktların konsantrasyonlarında kontrol gruplarına kıyasla canlı hücre sayılarında anlamlı bir değişim meydana gelmemiştir ($p>0,05$). Benzer şekilde EPS üretim miktarlarında da anlamlı bir artış veya azalış gözlemlenmemiştir. Farklı çözenler ile gerçekleştirilen fermantasyonlarda hesaplanan kinetik parametreler incelendiğinde EPS verimleri (Y_p/s) tüm örneklerde birbirine yakın değerler bulunurken, özgül EPS üretim hızlarında farklılıklar görülmekle birlikte yüksek standart sapmalardan dolayı anlamlı bir değişim belirlenmemiştir ($p>0,05$).



Şekil 4.14. Kuşburnu ekstraktlarının *L. brevis* MF87 EPS fermantasyonuna etkisi



Şekil 4.15. Kuşburnu ekstraktlarının *L. namurensis* MF210 EPS fermantasyonuna etkisi

4.3.2. Tarçın ekstraktlarının etkisi

Su, metanol, etanol ve etanol-su ile hazırlanan tarçın ekstraktlarının *L. plantarum* MF232 EPS fermantasyonu sonunda hücre sayısı, üretilen EPS miktarları ve besiyeri kalan şeker içerikleri Şekil 4.16'da verilmiştir. *L. plantarum* MF232 tarçın su ekstraktlarında canlı hücre sayılarında tüm konsantrasyonlarda benzer değerler bulunmuş olup etkilememiştir. EPS miktarlarında ise artan konsantrasyonla birlikte bir azalma gözlenmekle birlikte bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Kontrol grubunda 0,78 g/L olarak ölçülen değer, %2 su ekstraktında 0,68 g/L olarak ölçülmüştür. Tarçın su ekstraktlarının fermantasyon kinetik parametrelerine olan etkisi incelendiğinde ise; EPS verimlerinin ve özgül EPS üretim hızlarının kontrol grubuna kıyasla benzer olduğu belirlenmiştir. Tarçın metanol ekstraktlarının *L. plantarum* MF232 suşunda hücre sayılarında herhangi bir değişim meydana getirmediği kontrol grubunda 8,03 log kob/mL olarak belirlenen değer, %0,01 metanol ekstraktında 8,45 log kob/mL, %0,4 metanol ekstraktında 8,24 log kob/mL, %2 metanol ekstraktında 8,35 log kob/mL olarak belirlendiği görülmektedir. Hücre sayılarındaki artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Ancak tarçın metanol ekstraktlarının EPS fermantasyonuna etki ettiği ve özellikle %0,4 ve %2 ekstrakt konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla sırası ile 0,52 g/L EPS, 0,39 g/L EPS olarak daha düşük miktarlar belirlenmiştir ($p<0,05$). Tarçın metanol ekstraktlarında *L. plantarum* MF232 suşu kontrol grubunda %4,48 olarak hesaplanan EPS verimi, %0,4 ve %2 metanol ekstraktlarında sırası ile %2,64 ve %1,96 olarak daha düşük hesaplanmıştır ($p<0,05$). EPS verimi %0,01 metanol ekstraktında ise kontrol grubu ile benzer sonuç vermiştir. Tarçın metanol ekstraktlarının *L. plantarum* MF232 suşu %0,4 ve %2 konsantrasyonlarda EPS üretimini azalttığı ancak özgül EPS üretim hızlarında herhangi bir değişime sebep olmadığı bulgulanmıştır. Tarçın etanol ekstraktlarının *L. plantarum* MF232 suşunun kontrol grubunda (%0) canlı hücre sayısı 8,12 log kob/mL olarak belirlenmiş ve artan etanol ekstrakt konsantrasyonu ile birlikte canlı hücre sayılarında da bir miktar artış gözlemlenerek %2 etanol konsantrasyonunda canlı hücre sayısı 8,46 log kob/mL değerine ulaşmıştır. Ancak canlı hücre sayısındaki bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Benzer şekilde tarçın etanol ekstraktları *L. plantarum* MF232 EPS miktarlarında da azalmaya sebep olmuş ancak EPS miktarları (0,71-0,57 g/L EPS) tüm ekstrakt konsantrasyonlarında kontrol grubu (0,75 g/L EPS) ile benzer bulunmuştur ($p>0,05$). Tarçın etanol ekstraktlarının EPS fermantasyon kinetiklerine etkisi incelendiğinde ise EPS verimi EPS üretim miktarı ile benzer seyretmiştir. Özgül EPS üretim hızları da artan etanol ekstraktı konsantrasyonları ile

düşüş eğilimi göstermiş ancak hesaplanan değerler kontrol grubu ile benzer bulunmuştur ($p>0,05$). Tarçın etanol-su ekstraktları *L. plantarum* MF232 fermantasyonunda canlı hücre sayılarına herhangi bir etkide bulunmadığı ve tüm konsantrasyonlarında kontrol grubu (%0) ile benzer canlı sayılarına sahip olduğu belirlenmiştir. Canlı hücre sayılarında değişim meydana gelmez iken kültür tarafından üretilen EPS miktarı ise özellikle %2 etanol-su ekstraktında azalarak 0,55 g/L EPS değeri elde edilmiştir ($p<0,05$). Kinetik parametreler açısından tarçın etanol-su ekstraktlarının ilavesi ile *L. plantarum* MF232 EPS verimi %2 konsantrasyonda %2,80 olarak en düşük değerde hesaplanmıştır. EPS üretiminde ve veriminde belirlenen bu düşüş özgül EPS üretim hızında ise gerçekleşmemiş ve tüm konsantrasyondaki değerler kontrol grubu ile benzer bulunmuştur ($p>0,05$).

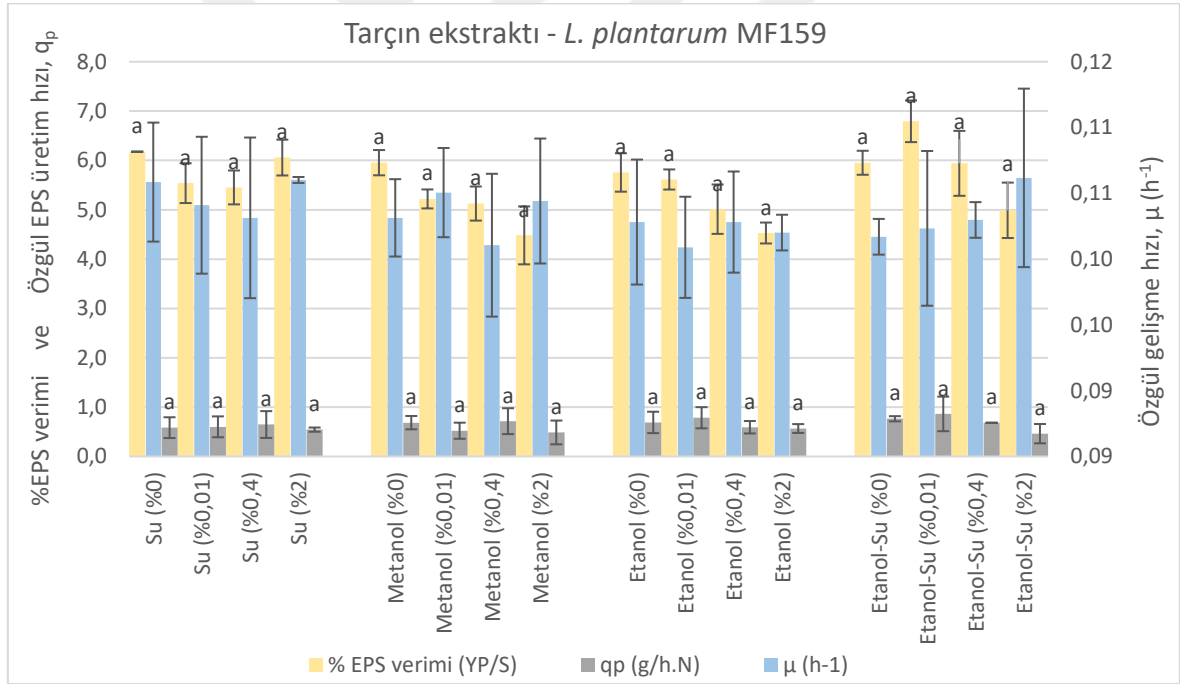
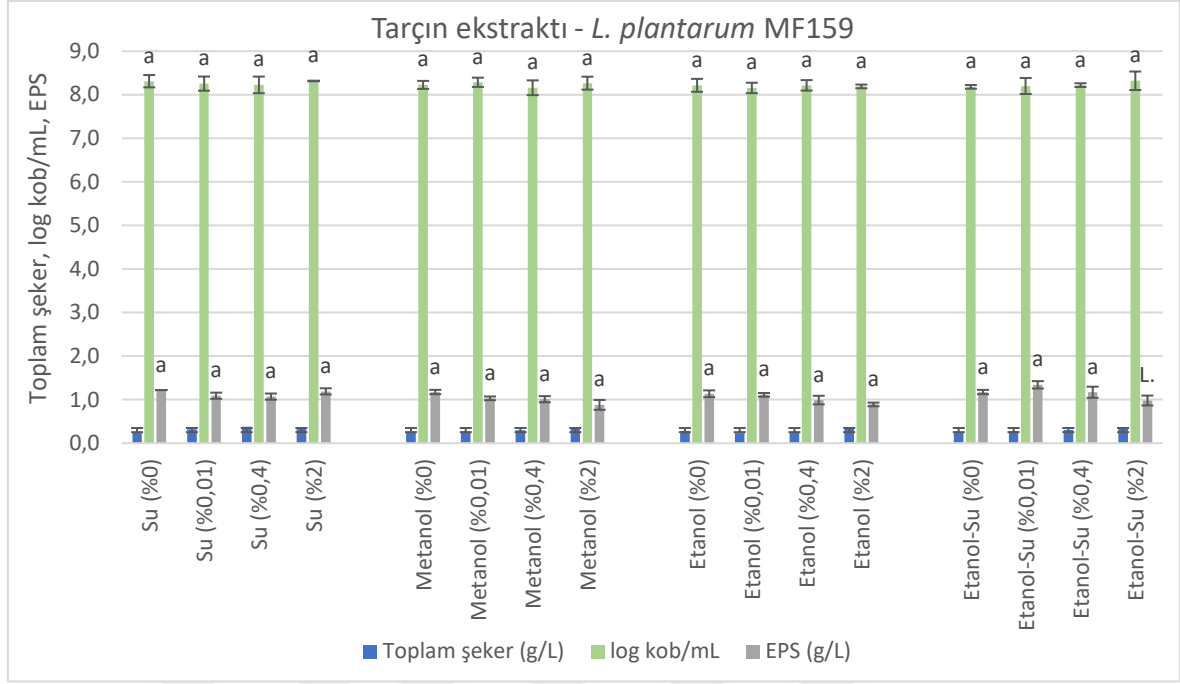




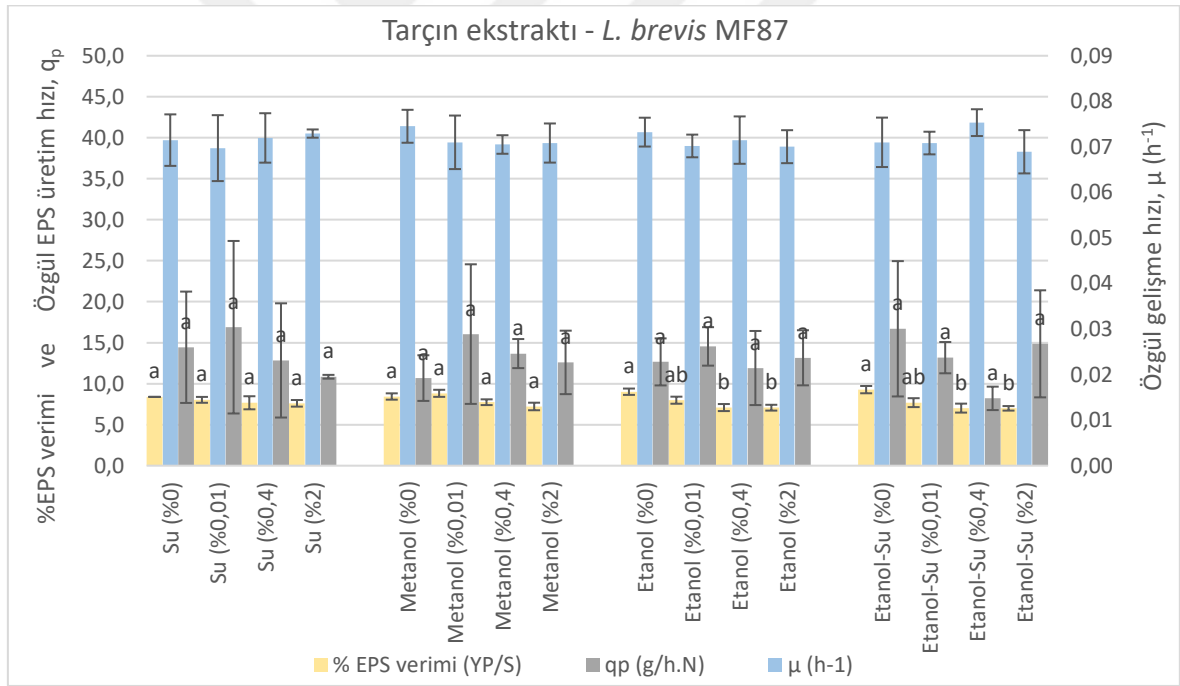
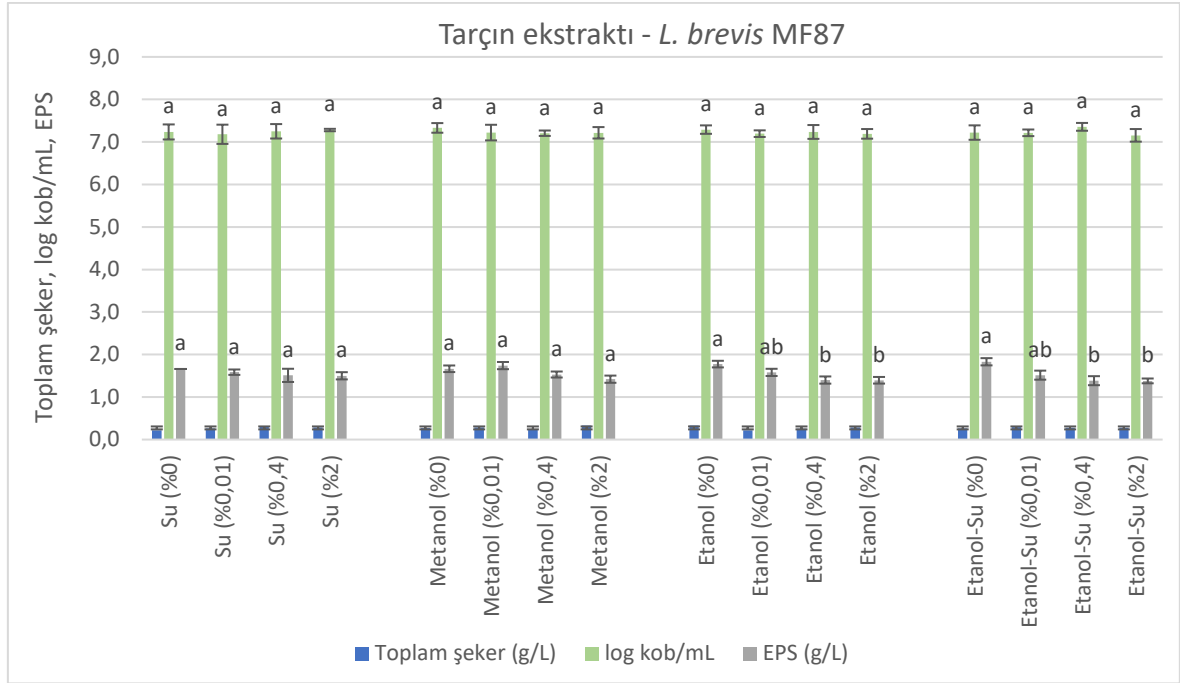
Şekil 4.16. Tarçin ekstraktlarının *L. plantarum* MF232 EPS fermentasyonuna etkisi

L. plantarum MF159 EPS fermantasyonunda tarçın su, metanol, etanol, etanol-su ekstraktlarının hücre sayısı, EPS miktarları, besiyeri kalan şeker içerikleri ve fermantasyon kinetik parametre değerleri Şekil 4.17’de verilmiştir. Şekil incelendiğinde tarçın su ekstraktının canlı hücre sayıları ve EPS miktarları kontrol grubunda ölçülen değerler ile benzer bulunmuştur. Aynı şekilde tarçın su ekstraktlarının tüm konsantrasyonlarında fermantasyon kinetik parametrelerinin de kontrol grubu ile aynı değerlerde hesaplandığı belirlenmiştir ($p>0,05$). Tarçın metanol, etanol ve etanol-su ekstraktlarında ise *L. plantarum* MF159 kültür ortamında belirlenen canlı hücre sayıları kendi kontrol gurupları ile benzer olup tüm ekstraktların artan konsantrasyonu ile EPS miktarlarının giderek azaldığı ancak bu farklılığın istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir. Metanol ve etanol ekstraktlarının kontrol gruplarında yaklaşık 1,18 g/L ölçülen EPS miktarları, %2’lik çözgen konsantrasyonlarında 0,88 g/L olarak ölçülmüştür. Bu örneklerin kinetik parametreleri incelendiğinde ise, artan konsantrasyon ile EPS verimlerinde bir miktar azalmanın gerçekleştiği ancak istatistiksel olarak önemli bir farklılığın olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$)

Tarçın ekstraktlarının *L. brevis* MF87 EPS fermantasyonuna etkileri Şekil 4.18’de gösterilmiştir. Tarçın su, metanol, etanol ve etanol-su ekstraktlarında canlı hücre sayıları kontrol grupları ile benzer bulunmuştur. Tarçın su ve metanol ekstraktlarında tüm konsantrasyonlarda ölçülen EPS miktarları kontrol gruplarına kıyasla benzer bulunurken, %0,4 ve %2 konsantrasyonlardaki etanol, etanol-su ekstraktlarında ise kontrol gruplarından daha düşük olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Etanol kontrol grubunda 1,78 g/L olarak ölçülen EPS miktarları %0,4 ve % 2 ekstraktlarında sırası ile 1,40 ve 1,40 g/L; etanol-su kontrol grubunda 1,83 g/L olarak ölçülen EPS miktarları ise %0,4 ve % 2 ekstraktlarında sırası ile 1,39 ve 1,38 g/L olarak daha düşük belirlenmiştir. Tarçın su, metanol, etanol ve etanol-su ekstraktlarına ait kinetik parametreler incelendiğinde ise özgül EPS üretim hızlarının tüm konsantrasyonlarda kontrol grupları ile benzer olduğu görülmektedir. Tarçın su ve metanol ekstraktlarında EPS verimleri kontrol grupları ile benzer bulunurken, etanol ve etanol-su ekstraktlarının %0,4 ve %2 konsantrasyonlarında hesaplanan değerler kontrol gruplarına kıyasla daha düşük bulunmuştur. Etanol kontrol grubunda EPS verimi %9,02 değerinden %7,09 ve %7,07 değerine, etanol-su kontrol grubunda EPS verimi %9,27 değerinden %7,02 ve 7,00 değerine düşmüştür ($p<0,05$).



Şekil 4.17. Tarçin ekstraktlarının *L. plantarum* MF159 EPS fermentasyonuna etkisi



Şekil 4.18. Tarçın ekstraktlarının *L. brevis* MF87 EPS fermentasyonuna etkisi

L. namurensis MF210 EPS fermantasyonuna tarçın ekstraktlarının (su, metanol, etanol, etanol-su) etkisi Şekil 4.19'da görülmektedir. Tarçın su ekstraktlarının *L. namurensis* MF210 kültür ortamındaki canlı hücre sayılarında, EPS miktarlarında ve fermantasyon kinetik parametrelerinde kontrol grubuna göre herhangi bir farklılık oluşturmadığı belirlenmiştir. Metanol ekstraktlarında elde edilen EPS miktarları ise kontrol grubunda 1,13 g/L, %0,01 ekstraktında 0,82 g/L, %0,4 ekstraktında 0,49 g/L, %2 ekstraktında 0,16 g/L olarak belirlenmiş olup kontrol grubuna kıyasla EPS miktarları önemli düzeyde azalmıştır ($p<0,05$). Metanol ekstraktlarında EPS verimleri de benzer şekilde tüm konsantrasyonlarda düşmüştür. Tüm metanol konsantrasyonlarında EPS miktarlarındaki azalmaya zıt olarak özgül EPS üretim hızları kontrol grubu ile benzer bulunmuştur. Etanol ekstraktlarında belirlenen canlı hücre sayıları birbirine yakın değerlerde olup artan konsantrasyon ile sayının bir miktar azaldığı ve %2 etanol konsantrasyonunda 6,91 log kob/mL olarak gerçekleştiği görülmektedir. Hücre sayılarında önemli bir değişiklik olmazken EPS üretim miktarları istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış ve kontrol grubunda ölçülen değerden (1,22 g/L EPS) daha düşük bulunmuştur ($p<0,05$). En düşük EPS miktarı %2 etanol ekstraktında 0,13 g/L olarak belirlenmiştir. Tüm etanol ekstraktlarında EPS verimleri de kontrol grubuna göre daha düşük değerlerde hesaplanmış olup, %2 etanol konsantrasyonunda hesaplanan özgül EPS üretim hızı (2,65 g/h.N) kontrol grubuna kıyasla daha düşük bulunmuştur. Sonuç olarak %2 etanol ekstraktında hücre sayısında değişim olmadan *L. namurensis* MF210 EPS miktarında ve özgül üretim hızında önemli düzeyde azalma sağlanabilmiştir. Tarçın etanol-su ekstraktları *L. namurensis* MF210 suşunda en yüksek düzeyde EPS miktarında azalma meydana getirmiş olup %2 etanol-su ekstraktında ölçülen EPS miktarı 0,10 g/L olarak en düşük değerde ölçülmüştür. Kontrol grubunda 1,15 g/L olarak belirlenen EPS miktarı etanol-su ekstraktlarında atan konsantrasyon ile azalma eğilimi göstermiştir. EPS miktarlarındaki bu düşüşe paralel olarak EPS verimlerinde de benzer eğilim gözlemlenmektedir. Etanol-su ekstraktlarının *L. namurensis* MF210 suşunun özgül EPS üretim hızına etkisi incelendiğinde ise, %0,4 ve %2 konsantrasyonlarda kontrol grubuna kıyasla sırası ile 2,82 ve 1,99 olarak daha düşük hesaplanmıştır. %0,4 ve %2 etanol-su ekstraktlarında hücre sayısında değişim olmadan *L. namurensis* MF210 EPS miktarında ve özgül üretim hızında önemli düzeyde azalma sağlanmıştır.



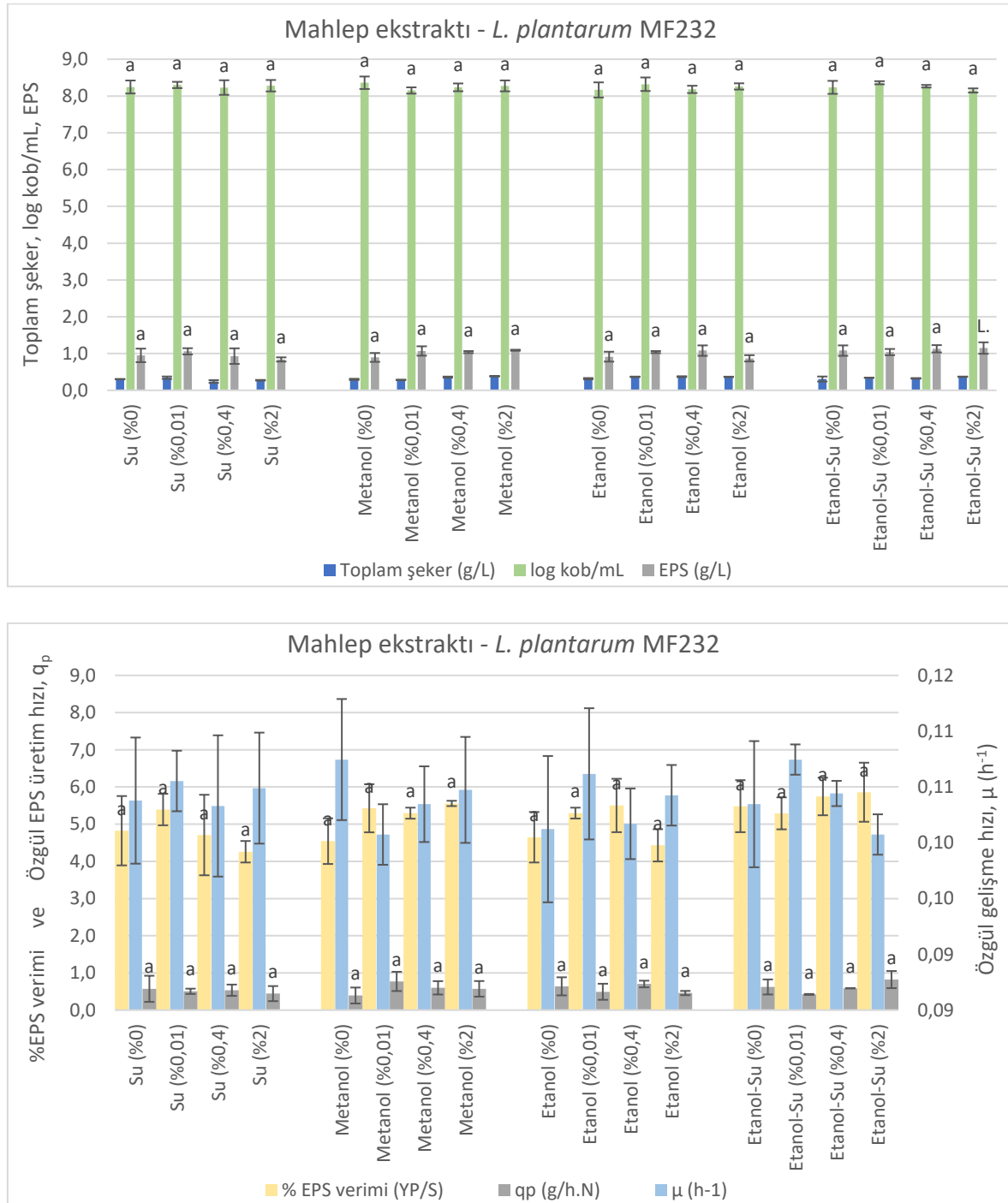
Şekil 4.19. Tarçın ekstraktlarının *L. namurensis* MF210 EPS fermantasyonuna etkisi

4.3.3. Mahlep ekstraktlarının etkisi

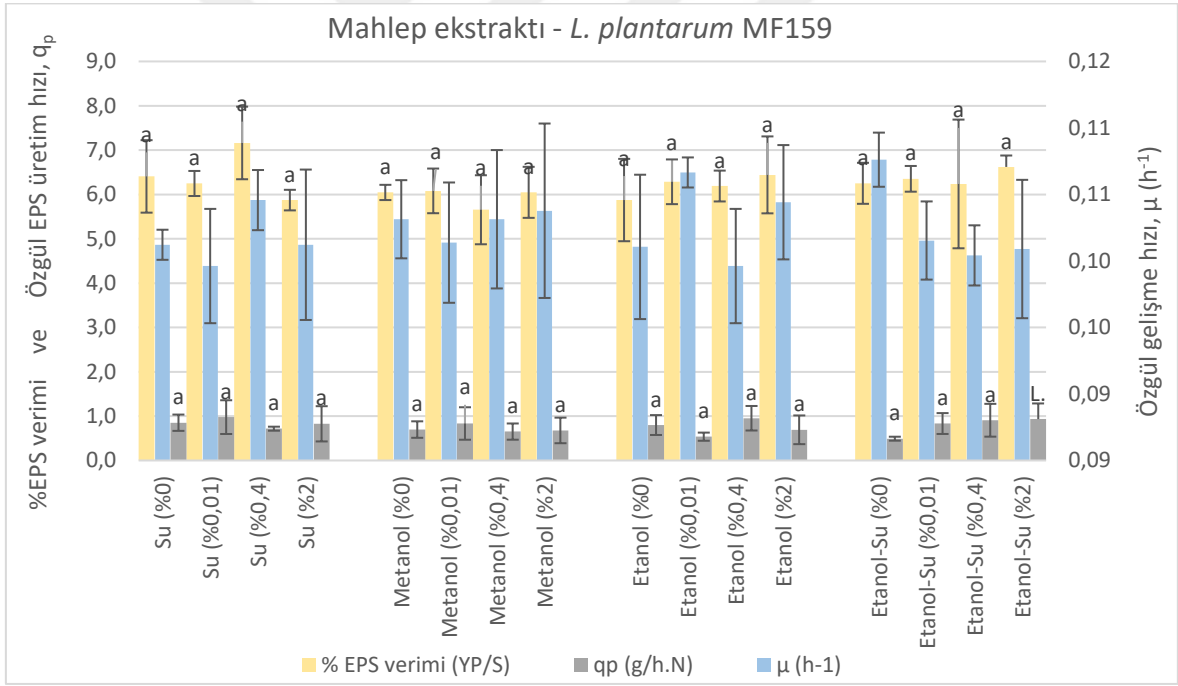
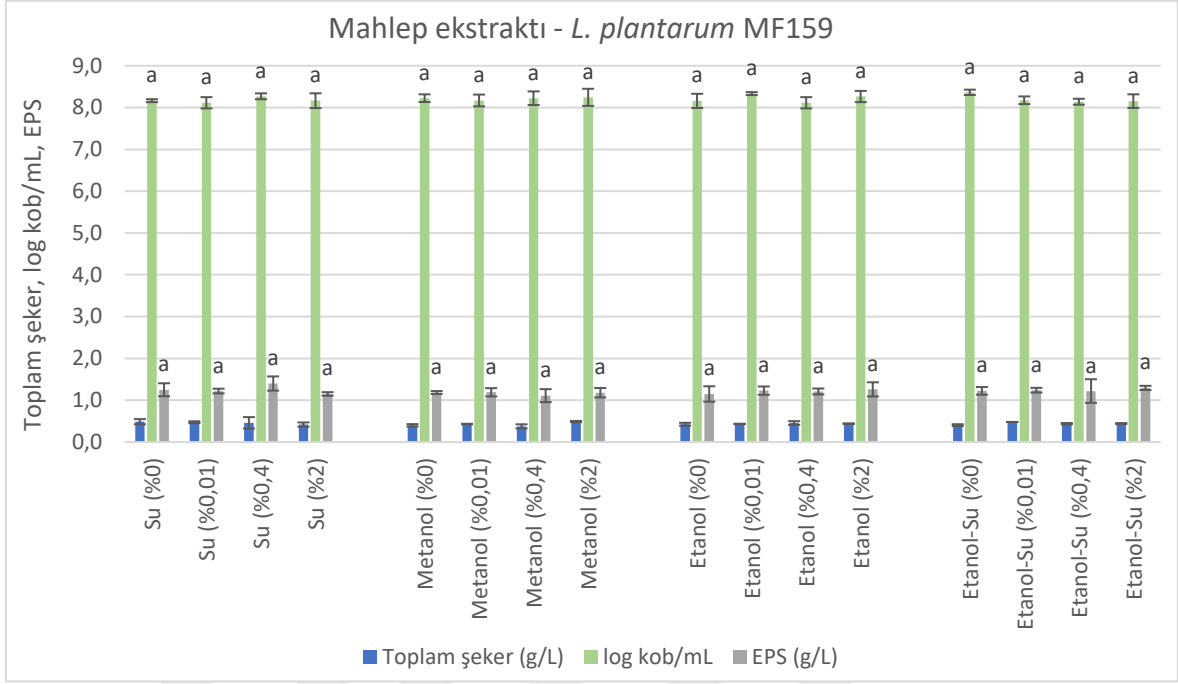
Farklı çözümler ile hazırlanan mahlep ekstraktlarının *L. plantarum* MF232 EPS fermentasyonunda belirlenen canlı hücre sayıları, EPS miktarları, besiyeri şekeri içerikleri ve fermentasyon kinetik parametreleri (EPS verimi, özgül gelişme hızı, özgül EPS üretim hızı) Şekil 4.20’de verilmiştir. Mahlep su ekstraktları kontrol grubunda canlı hücre sayısı 8,25 log kob/mL, metanol kontrol grubunda 8,36 log kob/mL, etanol kontrol grubunda 8,17 log kob/mL, etanol-su kontrol grubunda ise 8,24 log kob/mL olarak belirlenmiştir. Tüm mahlep ekstraktlarında *L. plantarum* MF232 suşu canlı hücre sayıları kontrol grupları ile benzer sonuçlar vermiştir ($p>0,05$). Mahlep %0,01 metanol ve %2 etanol-su ekstraktında belirlenen canlı hücre sayıları (8,15 log kob/mL) kontrol gruplarına kıyasla daha düşük bulunmuş olup bu fark önemsizdir. Örneklerin EPS üretim miktarlarında da tüm ekstraktlarda belirlenen değerler kontrol grupları ile benzer bulunmuştur ($p>0,05$). Mahlep su ekstraktlarında en düşük EPS miktarı %2 konsantrasyonda 0,84 g/L, en yüksek EPS miktarı %0,01 konsantrasyonda 1,06 g/L olarak; mahlep metanol ekstraktlarında en düşük %0,4 konsantrasyonda 1,04 g/L, en yüksek %2 konsantrasyonda 1,09 g/L olarak; mahlep etanol ekstraktlarında en düşük %2 konsantrasyonda 0,87 g/L, en yüksek %0,4 konsantrasyonda 1,08 g/L olarak; mahlep etanol-su ekstraktlarında en düşük %0,01 konsantrasyonda 1,04 g/L, en yüksek %2 konsantrasyonda 1,15 g/L olarak belirlenmiştir. Mahlep ekstraktlarının *L. plantarum* MF232 EPS fermentasyonlarından hesap edilen kinetik parametreleri incelendiğinde EPS verimlerinin ve özgül EPS üretim hızlarının kontrol grupları ile kıyaslandığında benzer sonuçlar olduğu görülmektedir. Etanol-su ve metanol ekstraktlarında artan konsantrasyon ile EPS verimlerinde de artış olduğu ancak bu farklılıkların istatistiksel olarak önemsiz olduğu görülmektedir.

Mahlep ekstraktlarının *L. plantarum* MF159 suşu EPS fermentasyonuna etkileri Şekil 4.21’de verilmiştir. Şekil incelendiğinde mahlep su ekstraktlarının canlı hücre sayısında herhangi bir farklılık yaratmadığı ve kontrol grubu ile benzer olduğu görülmektedir. Su ekstraktlarının EPS üretim miktarı üzerindeki etkisi de benzer şekilde gerçekleşmiştir. % 2 su ekstraktında belirlenen EPS miktarı 1,15 g/L olup bu değer kontrol grubuna (1,25 g/L) göre biraz düşük düzeyde kalmıştır. %0,4 su ekstraktında ise 1,40 g/L olarak ölçülen EPS miktarı kontrol grubuna göre daha yüksek düzeyde belirlenmiştir. Bu farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$). Mahlep metanol ve etanol ekstraktlarının tüm konsantrasyonlarında canlı hücre sayıları, EPS miktarları, EPS verimleri ve özgül EPS

üretim hızları kontrol gruplarına göre benzer bulunmuş olup bu değerlerde herhangi bir farklılık meydana gelmemiştir. Mahlep etanol-su ekstraktında da benzer sonuçlar elde edilmiş olup artan konsantrasyon ile kontrol grubuna kıyasla canlı hücre sayılarında bir miktar düşme, özgül EPS üretim hızlarında ise bir miktar artış gözlemlenmiştir. Buradaki farklılıklarda istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$).

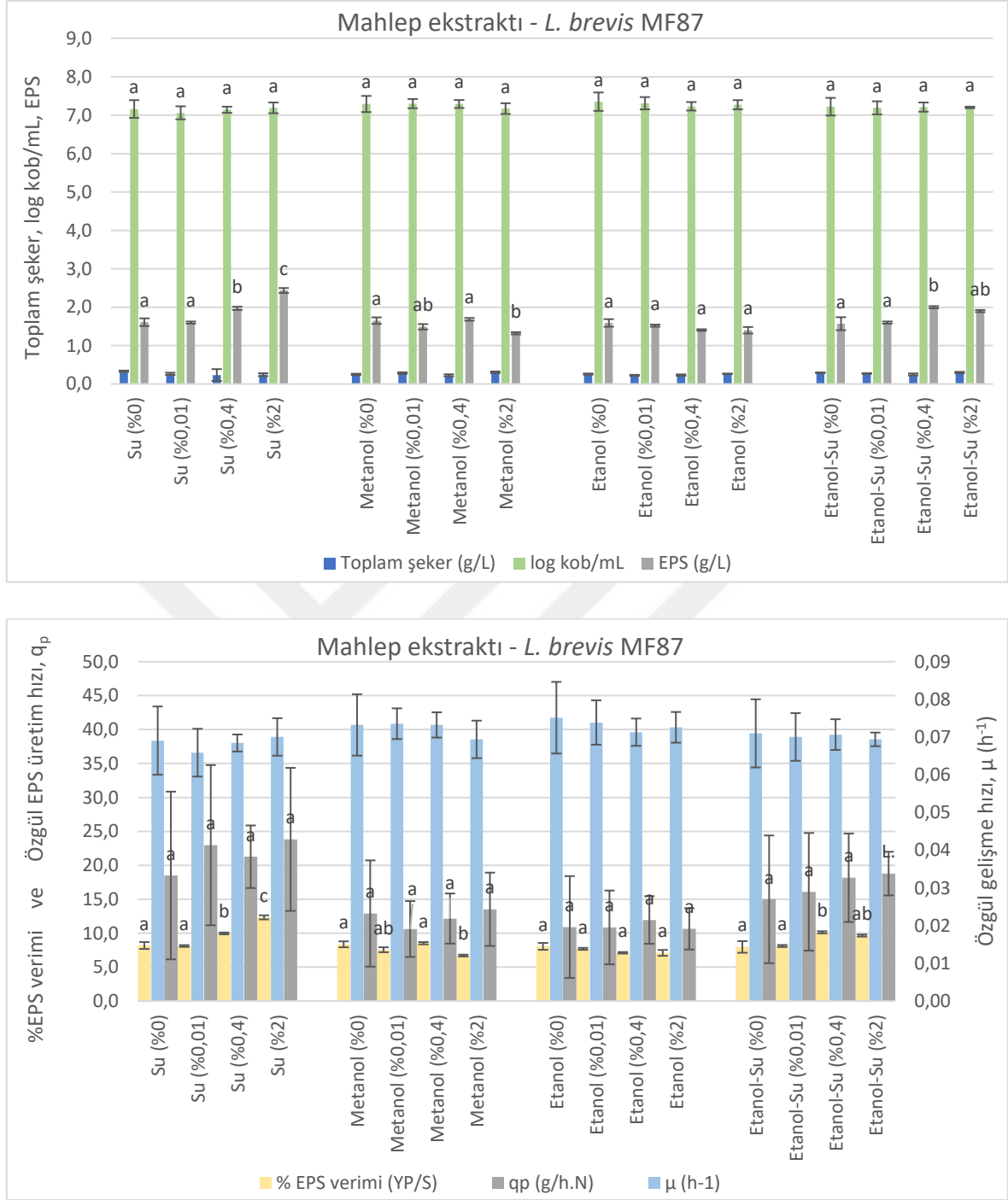


Şekil 4.20. Mahlep ekstraktlarının *L. plantarum* MF232 EPS fermentasyonuna etkisi



Şekil 4.21. Mahlep ekstraktlarının *L. plantarum* MF159 EPS fermentasyonuna etkisi

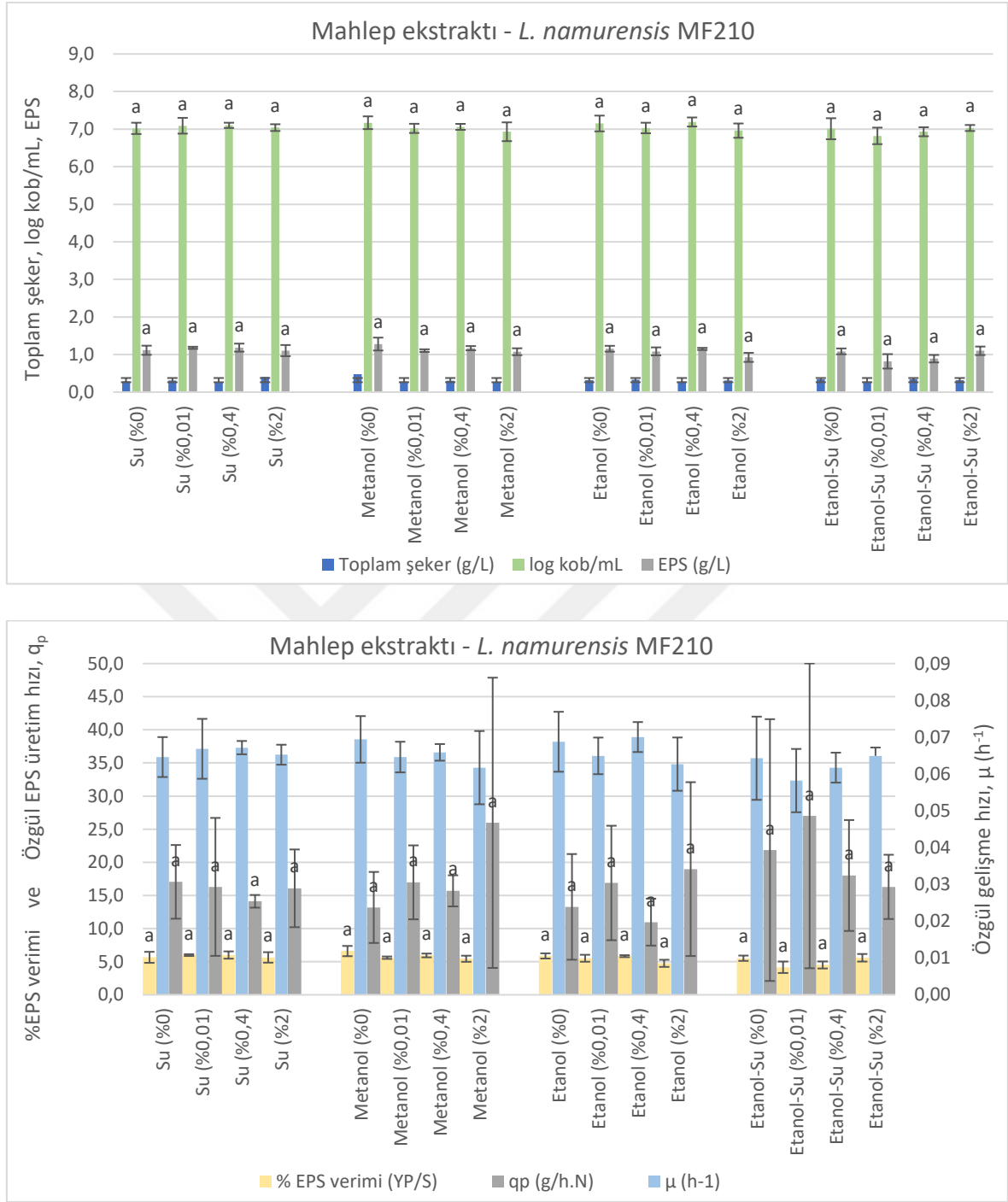
Mahlep ekstraktları *L. brevis* MF87 suşunda EPS üretimine önemli düzeyde etkilerinin olduğu belirlenmiş ve fermentasyonlara ait veriler Şekil 4.22’de gösterilmiştir. Mahlep su ekstraktları *L. brevis* MF87 canlı hücre sayılarında kontrol grubuna kıyasla herhangi bir farklılık oluşturmazken EPS üretim miktarları özellikle %0,4 ve %2 su ekstraktlarında artış göstererek sırası ile 1,97 g/L ve 2,44 g/L seviyelerine yükselmiştir. Kontrol grubunda 1,61 g/L olarak ölçülen EPS miktarının üzerinde bir değere ulaşılmıştır ($p<0,05$). %0,01 su ekstraktında ise kontrol grubu ile benzer EPS miktarları ölçülmüştür ($p>0,05$). Mahlep su ekstraktları EPS verimi üzerinde de benzer artışa sebebiyet vererek kontrol grubunda %8,19 olarak hesaplanan verim %0,4 ve %2 su ekstraktlarında %9,97 ve %12,32 olarak gerçekleşmiştir. EPS üretimindeki bu artışa rağmen özgül EPS üretim hızlarında da artış olmakla birlikte farklılığın önemsiz olduğu bulgulanmıştır. Mahlep metanol ekstraktlarında canlı hücre sayıları benzer değerlerde bulunmuş ve EPS miktarı açısından %2 metanol ekstraktında belirlenen değer (1,32 g/L) kontrol grubunda belirlenen değere (1,65 g/L) göre biraz daha düşük bulunmuştur ($p<0,05$). %2 metanol ekstraktı EPS miktarında azalmaya sebebiyet vermiştir. Benzer azalma EPS veriminde de gerçekleşmiştir. Mahlep etanol ekstraktlarında ise tüm konsantrasyonlarda belirlenen canlı hücre sayıları, EPS miktarları, EPS verimleri ve özgül EPS üretim hızları kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak benzer bulunmuş olup ekstraktların fermentasyona etkisi gözlemlenmemiştir ($p>0,05$). Etanol ekstraktlarında belirlenen EPS miktarlarının artan konsantrasyon ile düşüş eğiliminde olduğu görülmekte ancak bu azalmanın istatistiksel olarak önemsiz olduğu bulgulanmıştır. Mahlep etanol-su ekstraktlarının fermentasyona etkileri incelenecek olursa canlı hücre sayılarının kontrol grubuna kıyasla değişmediği, EPS miktarının ise özellikle %0,4 konsantrasyonda artarak 2,00 g/L değerine ulaştığı görülmektedir ($p<0,05$). Kontrol grubunda 1,57 g/L olarak belirlenen EPS miktarı %2 konsantrasyonda da artarak 1,90 g/L değerine ulaştığı ancak bu farklılığın kontrol grubuna karşı önemsiz olduğu belirlenmiştir ($p>0,05$). Etanol-su ekstraktında EPS verimlerinde de benzer artış hesaplanmıştır.



Şekil 4.22. Mahlep ekstraktlarının *L. brevis* MF87 EPS fermantasyonuna etkisi

Mahlep ekstraktlarının *L. namurensis* MF210 canlı hücre sayıları, EPS miktarları ve fermantasyon kinetik parametreleri Şekil 4.23'te verilmiştir. Mahlep su, metanol, etanol ve etanol-su ekstraktlarının canlı hücre sayılarında önemli bir farklılık meydana getirmediği ve benzer şekilde EPS miktarlarının da kontrol grupları ile aynı değerlerde belirlendiği görülmüştür. Metanol ekstraktında artan konsantrasyonlar ile EPS miktarlarında canlı hücre sayısındaki azalmaya paralel olarak düşüşün meydana geldiği, ancak bu farklılığın istatistiksel olarak önemsiz olduğu görülmektedir. Benzer durum etanol ekstraktında da gözlemlenmiş olup %2 etanol ekstraktında EPS miktarı 0,93 g/L olarak ölçülmüştür. Etanol-su ekstraktlarında ise %0,01 ve %0,4 konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemsiz bir azalma meydana gelmiştir.





Şekil 4.23. Mahlep ekstraktlarının *L. namurensis* MF210 EPS fermantasyonuna etkisi

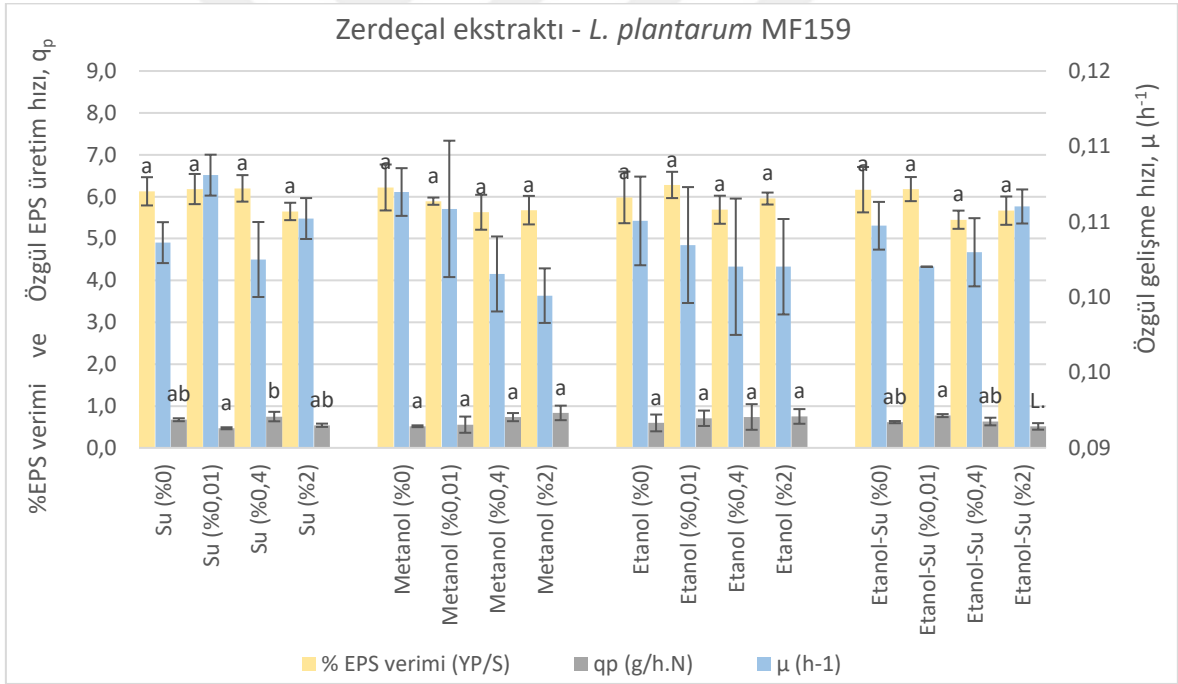
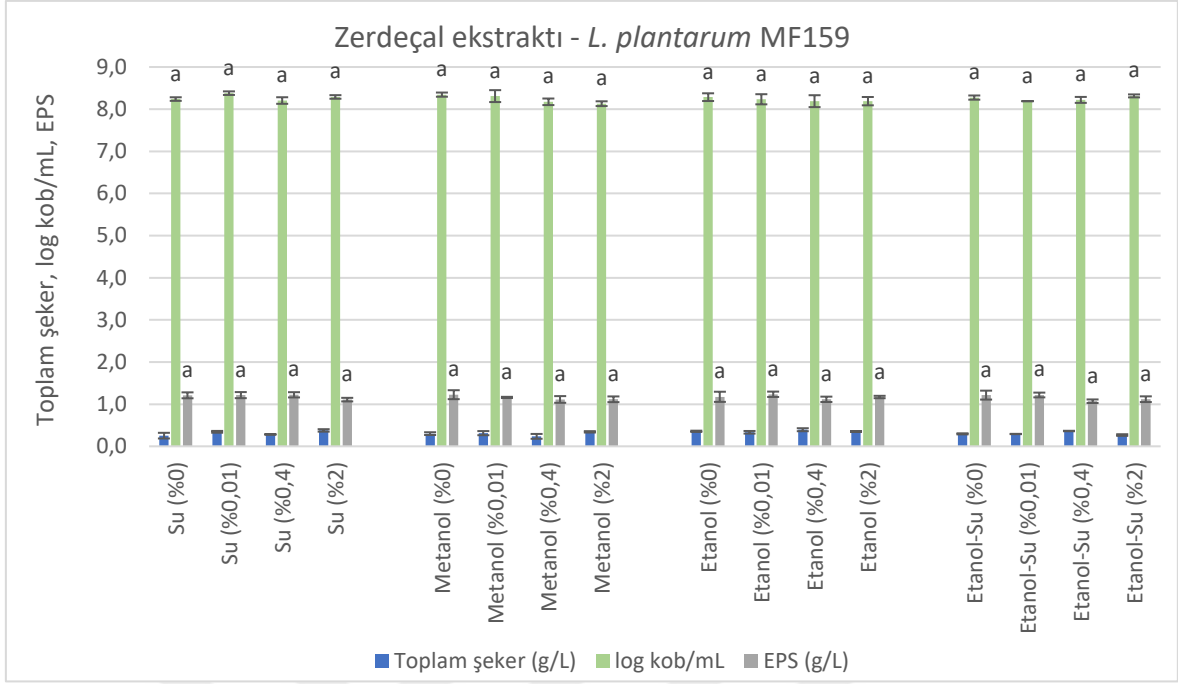
4.3.4. Zerdeçal ekstraktlarının etkisi

Zerdeçal ekstraktlarının LAB suşlarının EPS fermantasyonlarına etkileri Şekil 4.24-4.27’de verilmiştir. Zerdeçal ekstraktlarının *L. plantarum* MF232 hücre sayısı, EPS miktarı, EPS verimi ve özgül EPS üretim hızlarına etkisi Şekil 4.24’te yer almaktadır. *L. plantarum* MF232 suşunun zerdeçal su ekstraktında kontrol grubuna göre hücre sayısında %0,4 konsantrasyonda bir miktar artış meydana gelirken EPS üretim miktarında ise herhangi bir değişim meydana gelmemiştir. Zerdeçal su ekstraktlarının EPS veriminde artan konsantrasyon ile arttığı ancak bu artışın önemli olmadığı görülmektedir ($p>0,05$). Zerdeçal metanol, etanol ve etanol su ekstraktlarında ise canlı hücre sayıları kontrol grupları ile benzer sonuçlar verirken, EPS üretimlerinde de farklılık belirlenmemiştir. Etanol-su ekstraktında EPS miktarları ve EPS verimleri artan konsantrasyon ile azalma göstermekte ise de bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

L. plantarum MF159 suşunda zerdeçal su, metanol, etanol ve etanol-su ekstraktlarının EPS fermantasyonuna etkileri Şekil 4.25’te incelendiğinde, diğer *L. plantarum* suşunda olduğu gibi EPS sentezine ve hücre sayılarına etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Kontrol grupları ile benzer EPS miktarı, hücre sayısı, EPS verimi ve özgül EPS üretim hızları ölçülmüştür.



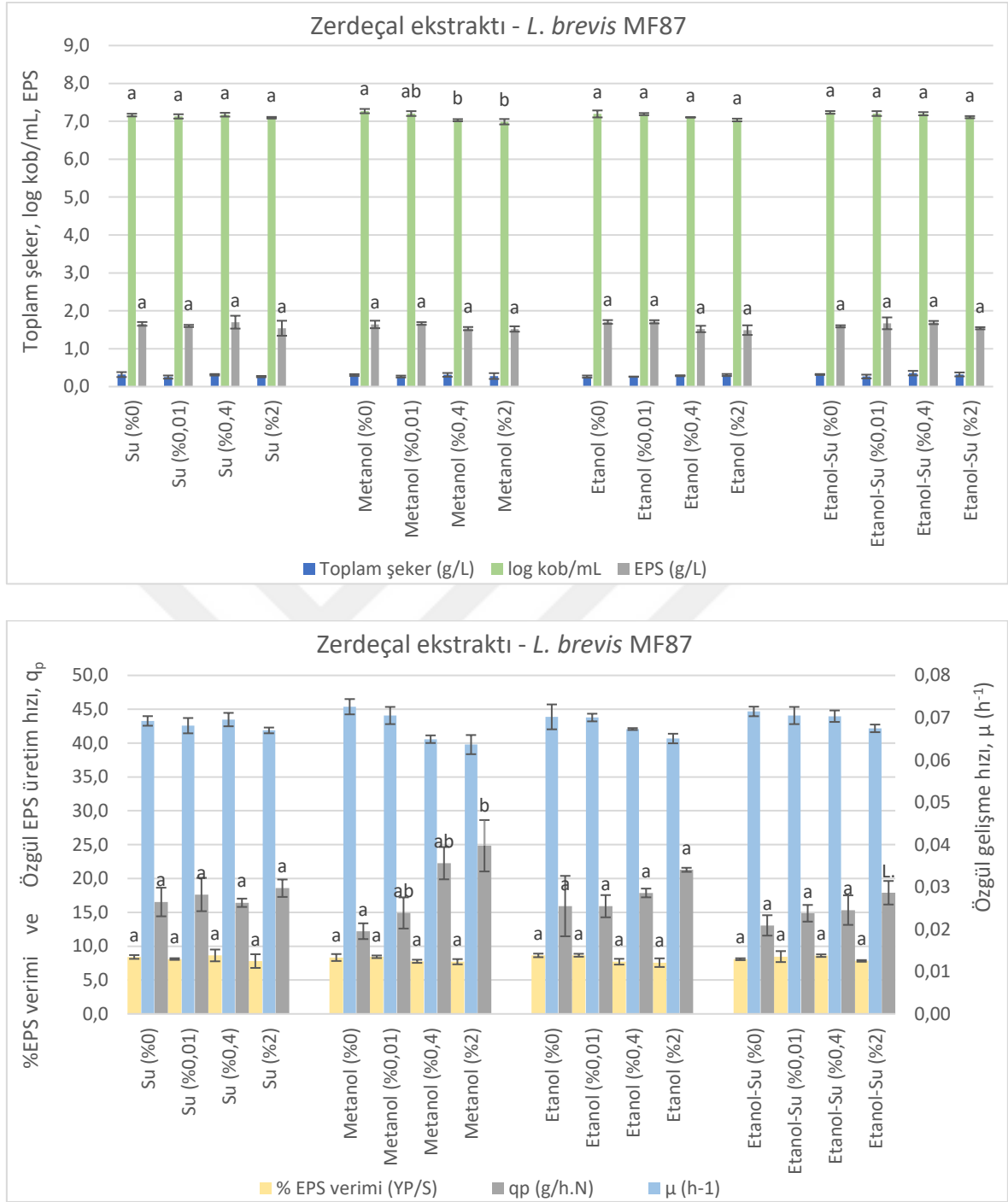
Şekil 4.24. Zerdeçal ekstraktlarının *L. plantarum* MF232 EPS fermentasyonuna etkisi



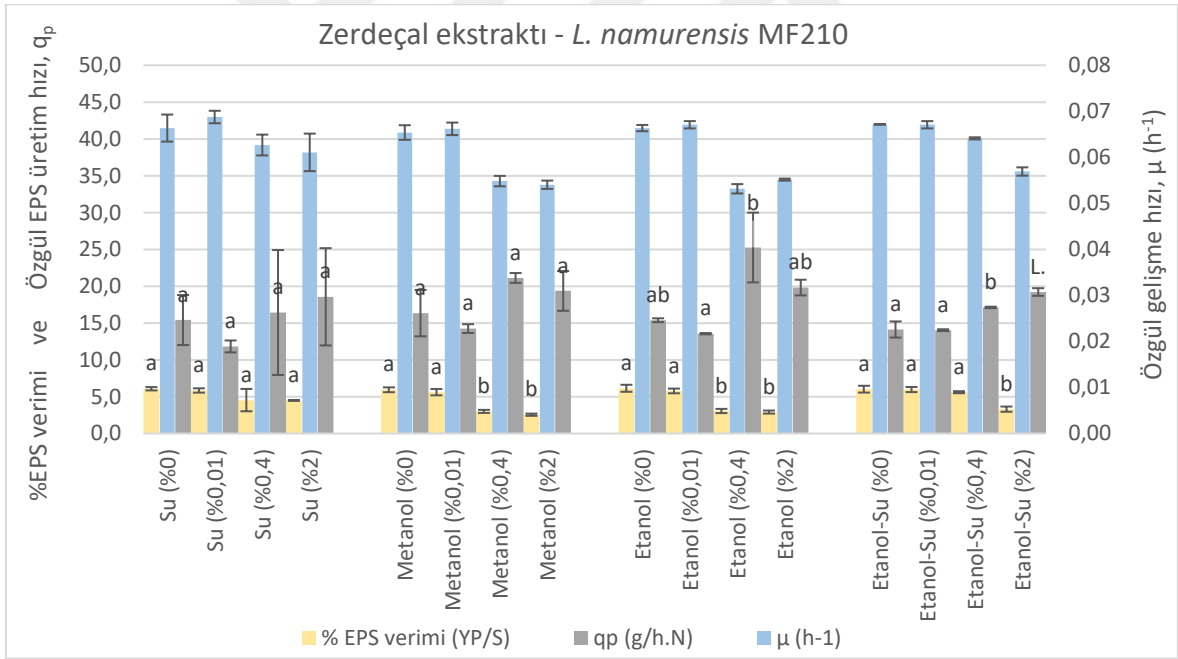
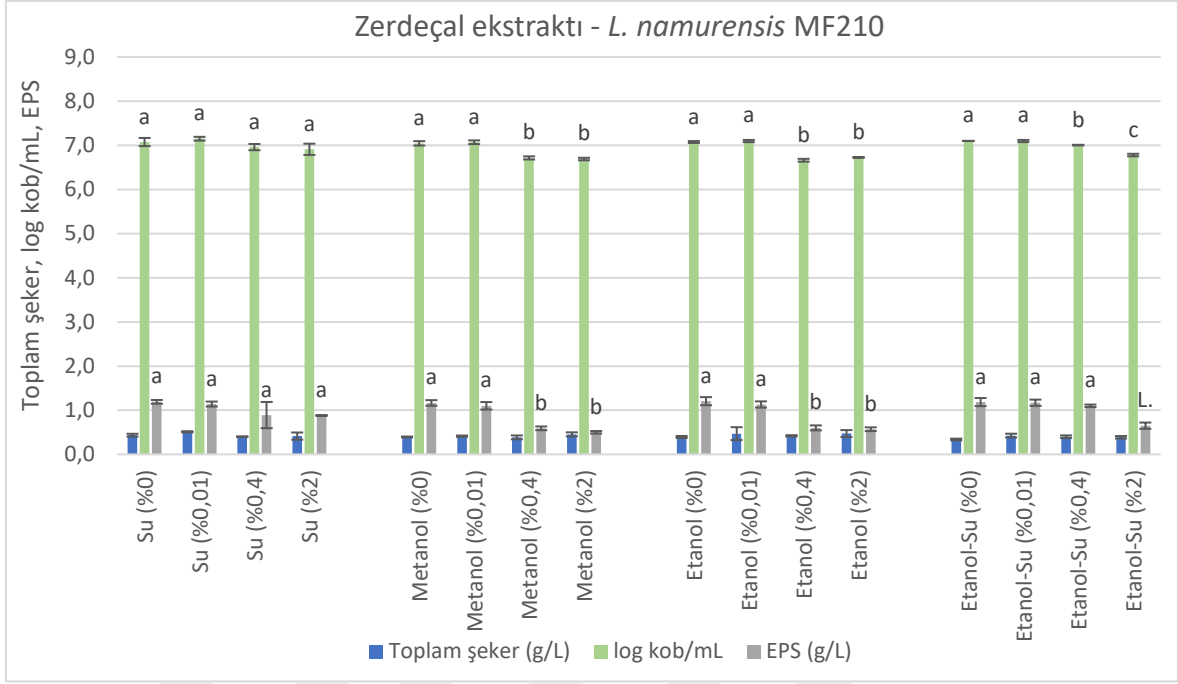
Şekil 4.25. Zerdeçal ekstraktlarının *L. plantarum* MF159 EPS fermentasyonuna etkisi

Zerdeçal su ekstraktlarının *L. brevis* MF87 EPS fermantasyon parametrelerinde anlamlı bir farklılık oluşturmadığı gözlemlenmiştir ($p>0,05$). Diğer taraftan metanol ekstraktlarında ise özellikle hücre sayılarında anlamlı bir azalmanın meydana gelerek kontrol grubunda 7,27 log kob/mL olarak belirlenen değerin %0,4 ve %2 metanol ekstraktlarında sırası ile 7,03 log kob/mL ve 6,99 log kob/mL olarak belirlenmiştir ($p<0,05$). Hücre sayısındaki bu azalma zerdeçal metanol ekstraktının *L. brevis* MF87 suşunda antimikrobiyal etki göstermesi olarak yorumlanmıştır. Hücre sayısındaki bu azalmaya rağmen %0,4 ve %2 metanol ekstraktlarında elde edilen EPS miktarları ise kontrol grubu ile benzer bulunmuştur. %2 metanol ekstraktlarında özgül EPS üretim hızının ise arttığı gözlemlenmektedir. Zerdeçal etanol ve etanol-su ekstraktlarında ise fermantasyonda canlı hücre sayılarındaki azalmanın önemsiz olduğu görülmekte ve diğer parametrelerinde kontrol grupları ile benzer olduğu görülmektedir.

Şekil 4.27’de zerdeçal ekstraktlarının *L. namurensis* MF210 EPS fermantasyonuna etkisi görülmektedir. Ekstraktların canlı hücre sayılarına etkileri incelendiğinde, %0,4 ve %2 metanol ve etanol ekstraktlarında, %2 etanol-su ekstraktlarında hücre sayılarında istatistiksel olarak önemli bir azalmanın meydana geldiği belirlenmiştir ($p<0,05$). Hücre sayılarındaki azalmaya paralel olarak belirtilen konsantrasyonlarda EPS miktarlarının da kontrol gruplarına kıyasla daha düşük bulunduğu görülmektedir. Zerdeçal metanol, etanol ve etanol-su ekstraktları yüksek konsantrasyonlarda *L. namurensis* MF210 suşu üzerinde antimikrobiyal etki göstermiştir. Metanol %0,4 ve %2 ekstraktlarında üretilen EPS miktarı sırası ile 0,59 g/L ve 0,50 g/L değerinde kontrol grubundan (1,17 g/L) daha düşük düzeyde bulunmuştur. Etanol %0,4 ve %2 ekstraktlarında üretilen EPS miktarı ise sırası ile 0,60 g/L ve 0,57 g/L değerinde kontrol grubundan (1,21 g/L) daha düşük düzeyde bulunmuştur. Etanol-su ekstraktında ise sadece %2 konsantrasyonda belirlenen EPS miktarı (0,65 g/L) kontrol grubuna (1,19 g/L) kıyasla düşük bulunmuştur. Zerdeçal su, metanol ve etanol ekstraktlarının *L. namurensis* MF210 özgül EPS üretim hızına etki etmediği ve kontrol grupları ile benzer değerde olduğu, %0,4 ve %2 etanol-su ekstraktının ise kontrol grubundan daha yüksek değerde olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.26. Zerdeçal ekstraktlarının *L. brevis* MF87 EPS fermentasyonuna etkisi

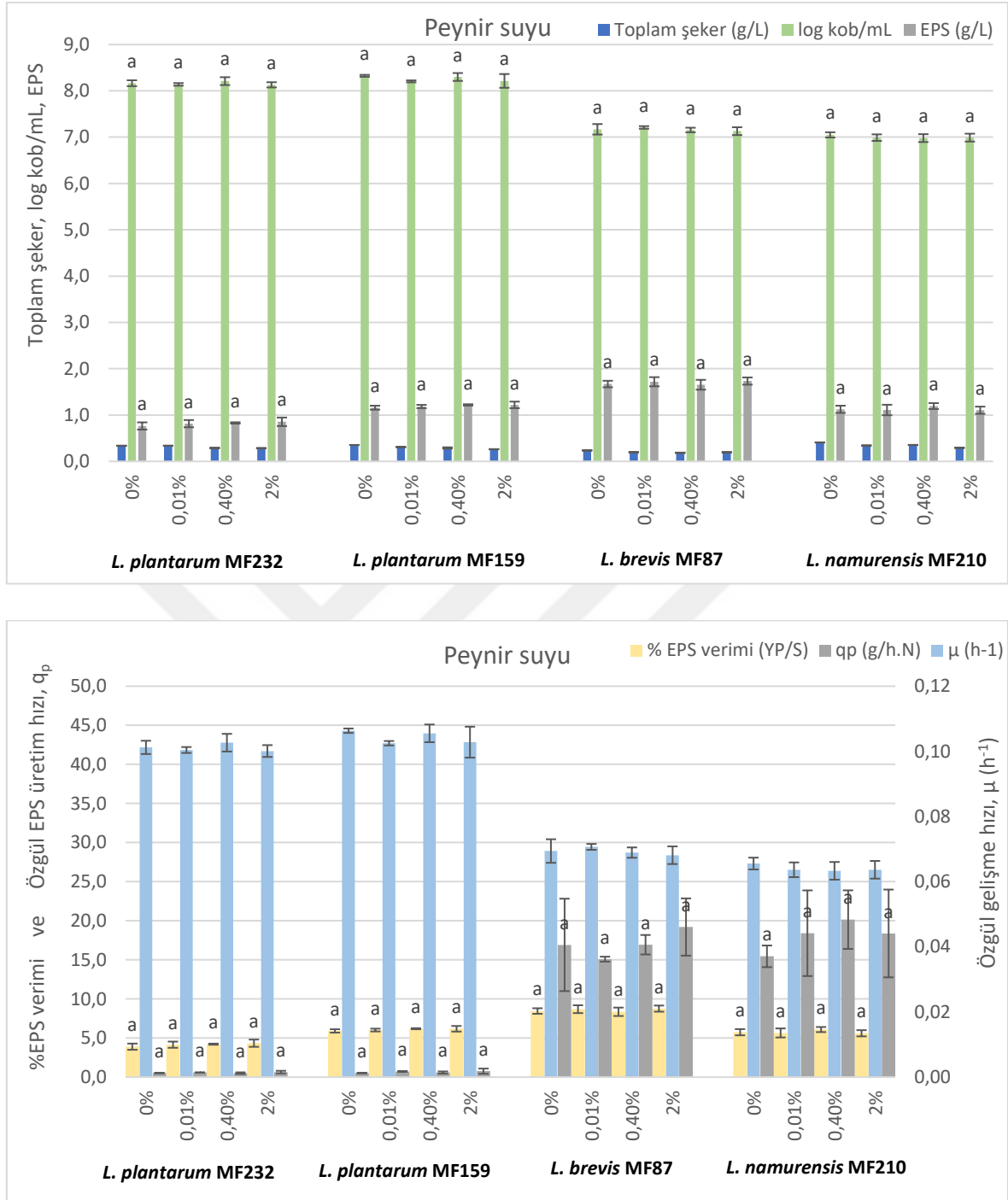


Şekil 4.27. Zerdeçal ekstraktlarının *L. namurensis* MF210 EPS fermantasyonuna etkisi

4.3.5. Peynir suyunun etkisi

Kültür ortamına farklı konsantrasyonlarda peynir suyu ilavesinin *L. plantarum* MF232, *L. plantarum* MF15,9 *L. brevis* MF87 ve *L. namurensis* MF210 EPS fermentasyon verilerine etkileri Şekil 4.28’de verilmiştir. QS aktif peptitlere sahip olma ihtimalinden dolayı LAB suşları üzerindeki etkisi denenen peynir suyunun canlı hücre sayılarında ve EPS miktarlarında kontrol gruplarına kıyasla herhangi bir değişim yapmadığı gözlemlenmiştir. Peynir suyunun çok düşük kurumadde ve protein içeriğine sahip olması LAB EPS fermentasyonlarında önemli bir etki göstermemesine sebep olmuştur.

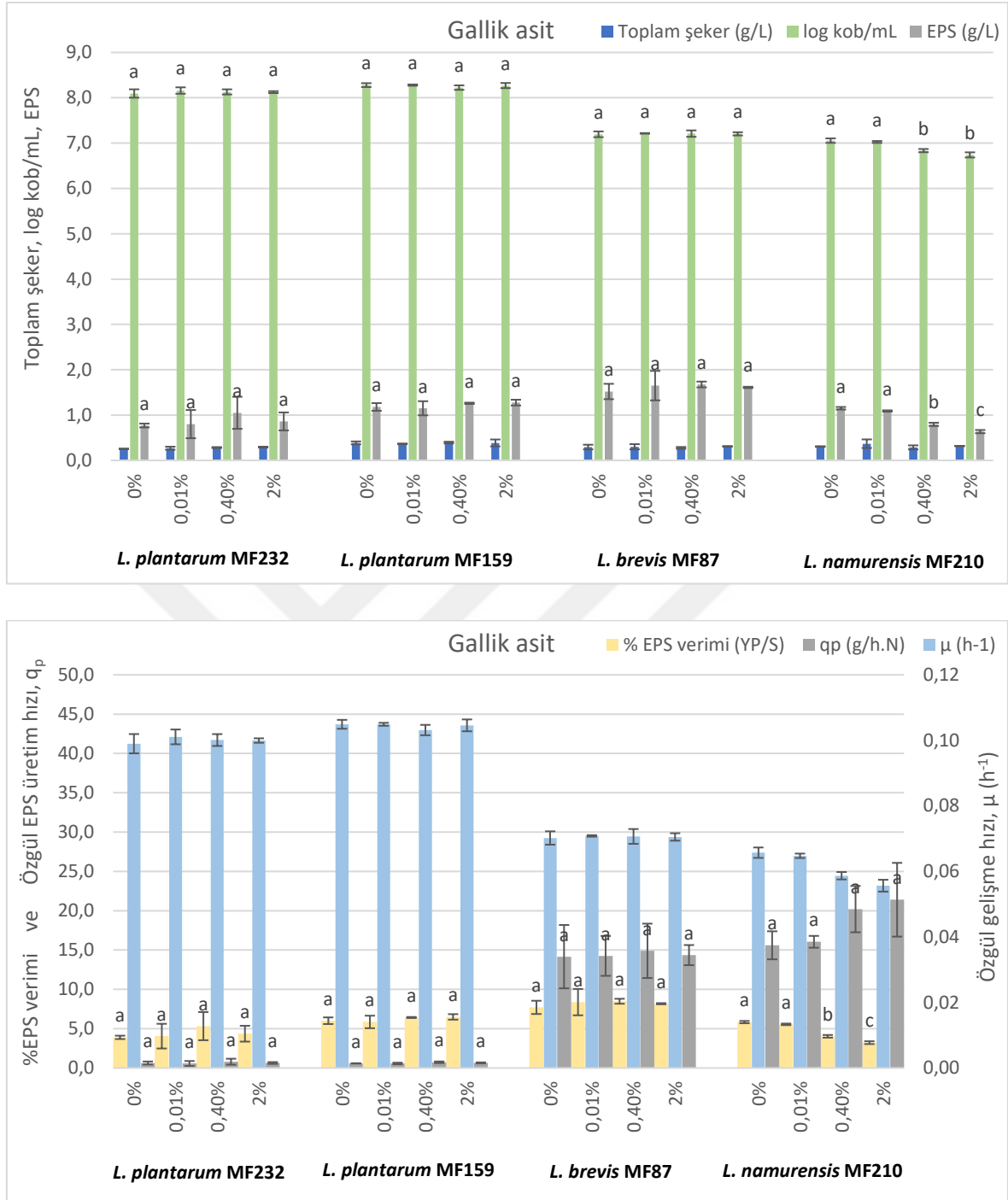




Şekil 4.28. Peynir suyunun LAB suşlarının EPS fermantasyonuna etkisi

4.3.6. Gallik asidin etkisi

Gallik asit çözeltisinin (5mg/mL) artan konsantrasyonlarda LAB suşlarının EPS fermantasyona etkilerine ait veriler Şekil 4.29’da görülmektedir. Gallik asit çözeltisi *L. plantarum* MF232, *L. plantarum* MF159 ve *L. brevis* MF87 suşlarının hücre sayılarında kontrol gruplarına kıyasla herhangi bir değişim meydana getirmezken %0,4 ve %2 gallik asit konsantrasyonlarında ölçülen EPS miktarlarında ise istatistiksel olarak önemsiz bir artış sağlamıştır. Diğer taraftan *L. namurensis* MF210 suşunda ise %0,4 ve %2 gallik asit kontrol grubuna (7,06 log kob/mL) göre hücre sayılarının azalmasına sebep olarak EPS miktarlarında da düşüş sağlamıştır. Gallik asidin yüksek konsantrasyonları *L. namurensis* MF210 suşunda antimikrobiyal etki göstermiştir. Hücre sayılarındaki ve EPS miktarındaki bu azalma EPS verimlerinde de azalma sağlarken özgül EPS üretim hızlarında ise herhangi bir farklılık oluşturmamıştır.



Şekil 4.29. Gallik asidin LAB suşlarının EPS fermantasyonuna etkisi

Özellikle bitkisel ekstraktlar ve biyoaktif bileşikler ile gerçekleştirilen birçok QS-QQ çalışması bulunmaktadır. Mangoudehi ve ark. (2020) kurkuminin *A. hydrophila* hücrelerinin biyofilm oluşumu, hareketlilik, proteolitik aktivite ve hemolitik aktivite dahil olmak üzere QS ile ilişkili bazı özellikler üzerindeki etkisini incelemiştir. Sonuçlara göre, 32 $\mu\text{g/mL}$

konsantrasyondaki kurkuminin, bakteri suşları arasında genlerin ekspresyonunu sırasıyla %64,2 ve %91,0'a kadar önemli ölçüde azaltmıştır. Ayrıca, kurkumin bakteriyel biyofilm oluşumunu, hareketliliği etkili bir şekilde inhibe etmiştir. Bakteriyel proteolitik aktivite biraz azalırken, hemolitik aktivite etkilenmemiştir. Bu çalışma, *A. hydrophila*'da fenotipleri zayıflatmak için kurkumin kullanımının uygun olduğunu göstermiştir. Packiavathy ve ark. (2014), zerdeçaldan elde edilen bir anti-quorum sensing (anti-QS) ajanı olan kurkuminin muhtemelen QS sistemlerine müdahale ederek *E. coli*, *P. aeruginosa* PAO1, *Proteus mirabilis* ve *Serratia marcescens* gibi üropatojenlerin biyofilm oluşumunu engellediğinin bildirmiştir. Ding ve ark. (2018), gıda kaynaklı patojenik bakteriler olan *Aeromonas hydrophila* ve *Serratia grimesii*'nin QS sistemlerine karşı biyoyararlanımını artırmak için film dispersiyon yöntemiyle hazırlanan kurkumin lipozomları üzerinde çalışmışlardır. Ayrıca partikül boyutu, zeta-potansiyel hapsolma oranı ve ilaç yükleme oranı gibi fizikokimyasal özellikleri de ölçülmüştür. Bu arada, kurkumin lipozomlarının biyofilm oluşumu, hücre dışı proteaz üretimi, hareketlilik gibi QS fenomeni üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Kurkuminin lipozomları iki patojenin QS sistemlerini önemli ölçüde inhibe edebilmiş ve biyolojik kullanılabilirliği artırılmıştır. Kalia ve ark. (2015) tarçının geleneksel olarak sindirim sorunlarını ve çeşitli bulaşıcı hastalıkları tedavi etmek için kullanılan bir diyet fitokimyası olduğunu bildirmiştir. Bu da tarçının QS sürecini engelleyebilecek kimyasallar içerebileceğini düşündürmektedir. Bu hipotezi test etmek için, tarçın yağının *P. aeruginosa*'ya karşı QS karşıtı aktivitesi, biyofilm oluşumunun QS ile ilişkili diğer olayların inhibisyonu ölçülerek test edilmiştir. Tarçın yağının *P. aeruginosa* PAO1 biyofilmlerini ve bunlara eşlik eden hücre dışı polimerik maddeleri inhibe etme yeteneğini ortaya koymuştur. Bu çalışma, tarçın yağının biyofilm oluşumu da dahil olmak üzere *P. aeruginosa* PAO1'deki çeşitli QS tabanlı olayları etkileyebileceğini gösteren ilk çalışmadır. Lade ve ark. (2014), sinnamaldehit ve türevlerinin vibriosis tedavisi için potansiyel olarak yararlı anti-patojenik bileşikler olduğunu ve LuxR'nin hedef promotör dizisine bağlanma yeteneğini azaltarak AI-2 tabanlı QS'ye müdahale ettiğini bildirmiştir. Krishnan ve ark. (2012), karanfilin (*Syzygium aromaticum*) hekzan, kloroform ve metanol özütleri üzerinde çalışmış ve anti-QS aktivitesini göstermiştir. Karanfilin hekzan ve metanol özütleri, *C. violaceum* CV026'nın violacein üretimini önlemiştir. Karanfilin kloroform ve metanol özütleri, *E. coli* tarafından biyoluminesans üretimini önemli ölçüde azaltmıştır. Bu çalışma, karanfil özütlerinde anti-QS aktivitesi sergileyen doğal bileşiklerin varlığının, ilaçların öncüsü olarak faydalı olabileceğini göstermektedir.

4.4 *Pseudomonas aeruginosa* spp. Biyofilm Oluşumuna Ekstraktların QS ve QQ Etkisi

Ekstraktların ve peynir suyunun QS-QQ aktivitelerinin doğrulanmasında *Pseudomonas aeruginosa* spp. suşu kullanılmıştır. Doğrulama testlerinde spektrofotometrik olarak ölçülen biyofilm miktarları hassas bir şekilde tespit edilememiş ve örnekler arasında standart sapmalar yüksek hesaplanmıştır. Bu sebep ile test sonuçları güvenilir bulunmamıştır. Kuşburnu, tarçın, mahlep, zerdeçal, peynir suyu ve gallik asidin *P. aeruginosa* spp. suşu biyofilm oluşum miktarına etkisine ait sonuçlar Tablo 4.3’de verilmiştir.

Tablo 4.3. *P. aeruginosa* spp. biyofilm üretim miktarları (A_{595} nm)

Çözgen	Kontrol	Kuşburnu	Tarçın	Zerdeçal	Mahlep	Peynir suyu	Gallik asit
Su	0,496±0,11 ^a	0,428±0,15 ^a	0,637±0,11 ^a	0,554±0,18 ^a	0,397±0,11 ^a	0,470±0,07 ^a	0,606±0,09 ^a
Metanol	0,418±0,08 ^a	0,367±0,31 ^a	0,385±0,04 ^a	0,423±0,15 ^a	0,712±0,13 ^a		
Etanol	0,507±0,04 ^a	0,585±0,18 ^a	0,622±0,15 ^a	0,671±0,07 ^a	0,366±0,04 ^a		
<u>Etanol</u> Su	0,586±0,11 ^a	0,409±0,09 ^a	0,487±0,11 ^a	0,637±0,18 ^a	0,545±0,10 ^a		

*Biyofilm miktarları için 595 nm absorbans ölçüm değerleri verilmiştir.

**a,b satırlarda yer alan veriler arasındaki istatistiksel benzerlik

5. SONUÇ

Yapılan çalışmalar ile patojen mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkinin spor oluşumu, antibiyotik sentezi, virülans faktörlerin indüksiyonu, hücresel farklılaşma ve besin akışının QS mekanizmalar ile kontrol edilerek patogenezi engellediği bilinmektedir. QS sistemleri hücrelerde ayrıca hareketlilik, biyofilm oluşumu ve virülans faktörlerin salgılanması gibi mekanizmaları da uyararak etki edebilmektedir. Birçok araştırma bitkisel ekstraktların ve fitokimyasalların türler içi ve türler arasında QS sistemlerine etki etme kapasitesine sahip olduğunu bildirmektedir. Aslında bitkisel ekstraktların QS sistemlerini bloke etme yetenekleri bakteriyel enfeksiyonlara karşı savunma mekanizmasının bir parçası olmaktadır. QS sistemlerini etkileyen bu moleküllerin gıdalarda hücresel mekanizmaları değiştirmede kullanımları açısından önemli olmakta ancak bunların diğer hücrelerdeki etkilerinin bilinmesini gerektirmektedir. Ekstraktlarda bulunan QS ve QQ aktif moleküllerin kimyasal yapılarının sinyal moleküllerine benzerliği veya sinyal reseptörlerini bloke etmeleri ile sayesinde bu etkiler oluşmaktadır.

Tez çalışması kapsamında EPS üretme yeteneğine sahip *L. plantarum* MF232, *L. plantarum* MF159, *L. brevis* MF87 ve *L. namurensis* MF210 suşlarının EPS üretim miktarlarının bitkisel ekstraktlar ve peynir suyu kullanılarak kültür ortamında QS ve QQ etkisi ile değiştirilmesi planlanmıştır.

Çalışmada ilk olarak bitkisel ekstraktların elde edilmesinde kullanılacak uygun çözümler belirlenmiş olup etanol, metanol ve kloroformun LAB suşları üzerindeki antimikrobiyal etkinin başladığı konsantrasyonlar ortaya konmuştur. Yapılan çalışmalar ile kloroformun suşlar üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiş olup ekstraktların üretiminde etanol ve metanolün en yüksek %2'lik konsantrasyonlarına karar verilmiştir. Daha sonra artan konsantrasyonlarda (%0,4-%2) metanol ve etanolün LAB suşlarında hücresel gelişimi belirgin bir şekilde arttırıcı veya azaltıcı bir etkisinin olmadığı ortaya konmuştur.

Bitkisel ekstrakt üretimleri etanol, metanol, su ve etanol-su ile, peynir ekstraktı ise sadece su ile gerçekleştirilmiştir. En yüksek kurumadde içerikleri mahlep su ekstraktında 530,388 mg olarak; en yüksek toplam şeker içeriğinin kuşburnu su ekstraktında 63,10 mg olarak; en yüksek protein miktarları mahlep su ekstraktında 411,29 mg olarak; en yüksek fenolik madde tarçın etanol (%50) ekstraktında 2,54 mg olarak bulunmuştur.

Ekstraktların üretiminden sonra bitkisel ekstraktların, peynir suyunun ve gallik asit çözeltisinin doğrudan hücresel gelişimi inhibe edici veya aktivite edici etkilerinin olup olmadığı optik yoğunluk ölçülerek test edilmiştir. Zerdeçal ekstraktları en belirgin hücre aktivitesindeki değişimler *L. namurensis* MF210 suşunda meydana gelmiştir. Bu suş üzerinde zerdeçal ekstraktının tüm çeşitleri hücre konsantrasyonunda belirgin bir artışa veya azalmaya sebep olduğu görülmektedir. Zerdeçal ekstraktlarının %0,01 ve %0,02 konsantrasyonlarda *L. namurensis* MF210 suşunun hücre gelişiminde kontrol gruplarına kıyasla belirgin bir artış sağladığı belirlenmiştir. Diğer taraftan bazı zerdeçal ekstraktının ise *L. namurensis* MF210 suşunun gelişimini inhibe ederek inkübasyon sonunda kontrol örneklerine göre daha düşük düzeyde OD₆₀₀ değeri ölçülmesine sebep olmuştur

Kuşburnu, zerdeçal, tarçın ve mahlep örneklerine ait su, etanol, metanol, etanol-su ekstraktları, peynir suyu ekstraktı ve gallik asit çözeltisinin *L. plantarum* MF159, *L. plantarum* MF232, *L. brevis* MF87, *L. namurensis* MF210 EPS fermantasyonuna QS ve QQ etkileri incelenmiştir. Kuşburnu %4 etanol-su ekstraktında *L. plantarum* MF232 EPS miktarının 1,61 g/L değerine ulaştığı ve bu değer kontrol grubuna (0,85 g/L) göre yüksek olduğu bulunmuştur. Tarçın metanol ekstraktlarının *L. plantarum* MF232 EPS fermantasyonuna etki ettiği ve %0,4 ve %2 konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla sırası ile 0,52 g/L EPS, 0,39 g/L EPS olarak daha düşük miktarlar belirlenmiştir. Tarçın %2 etanol-su ekstraktında ise canlı hücre sayılarında değişim meydana gelmez iken *L. plantarum* MF232 tarafından üretilen EPS miktarı ise azalarak 0,55 g/L EPS değeri elde edilmiştir. *L. brevis* MF87 suşunda EPS miktarları tarçın %0,4 ve %2 konsantrasyonlardaki etanol, etanol-su ekstraktlarında kontrol gruplarından daha düşük olduğu bulunmuştur. *L. namurensis* MF210 suşunda tarçın metanol ekstraktlarında elde edilen EPS miktarları ise kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde azalmıştır. Tarçın ekstraktlarında *L. namurensis* MF210 hücre sayılarında önemli bir değişiklik olmazken EPS üretim miktarları önemli ölçüde azalmış ve kontrol grubunda ölçülen değerden (1,22 g/L EPS) daha düşük bulunmuştur. En düşük EPS miktarı %2 etanol ekstraktında 0,13 g/L olarak belirlenmiştir. %2 etanol konsantrasyonunda hesaplanan özgül EPS üretim hızı kontrol grubuna kıyasla daha düşük bulunmuştur. Sonuç olarak tarçın %2 etanol ekstraktında hücre sayısında değişim olmadan *L. namurensis* MF210 EPS miktarında ve özgül üretim hızında önemli düzeyde azalma gerçekleşmiştir. Mahlep su ekstraktları *L. brevis* MF87 hücre sayılarında kontrol grubuna kıyasla herhangi bir farklılık oluşturmazken EPS üretim miktarları %0,4 ve %2 su ekstraktlarında artış göstererek sırası ile 1,97 g/L ve 2,44 g/L seviyelerine

yükselmiştir. Zerdeçal ekstraktlarında ise %0,4 ve %2 metanol ve etanol ekstraktlarında, %2 etanol-su ekstraktlarında *L. namurensis* MF210 hücre sayılarında istatistiksel olarak önemli bir azalmanın meydana geldiği belirlenmiştir. Zerdeçal metanol, etanol ve etanol-su ekstraktları yüksek konsantrasyonlarda *L. namurensis* MF210 suşu üzerinde antimikrobiyal etki göstermiştir. Çalışmada kullanılan peynir suyunun ve gallik asit çözeltisinin ise EPS fermentasyonunda anlamlı bir etki göstermediği belirlenmiştir.

Yapılan çalışma ile özellikle tarçın ekstraktlarının QQ yolu ile LAB EPS üretim miktarını ve özgül EPS üretim hızlarını önemli düzeyde düşürdüğü, mahlep ekstraktının ise QS yolu ile MF87 suşunda EPS üretimini arttırdığı belirlenmiştir. Bu ekstraktların LAB EPS sentezlerini hücre sayılarını değiştirmeden azaltarak veya arttırarak fermente gıda ürünlerinde başlatıcı kültürlerin EPS sentezlerinin kontrol edilmesine olanak sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Al-Haidari, R.A., Shaaban, M.I., Ibrahim, S.R., ve Mohamed, G.A. 2016. Anti-quorum sensing activity of some medicinal plants, *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 13(5), 67-71.
- Amara N., Krom B. P., Kaufmann G. F., Meijler M. M., 2011. Macromolecular inhibition of quorum sensing: enzymes, antibodies, and beyond. *Chem. Rev*, 111,195–208.
- AOAC, 1997. Official Methods of Analysis of AOAC International (16th. Pub). Arlington, VA, USA.
- Ayşe GÜNEŞ BAYIR . Mehmet Gültekin BİLGİN . 2019. The Effect of Cinnamon on Microbiological, Chemical and Sensory Analyses of Probiotic Yogurt . *Bezmialem Science*;7(4):311-316.
- Bacha, K., Tariku, Y., Gebreyesus, F., Zerihun, S., Mohammed, A., Weiland-Bräuer, N., Mulat, M., 2016. Antimicrobial and anti-Quorum Sensing activities of selected medicinal plants of Ethiopia: Implication for development of potent antimicrobial agents, *BMC microbiology*, 16(1), 1-9.
- Badel, S., Bernardi, T., ve Michaud, P., 2011. New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides, *Biotechnology Advances*, 29(1); 54-66.
- Bağder Elmacı, S., Tokatlı, M., Dursun, D., Özçelik, F., Şanlıbaba, P., 2015. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from traditional pickles of the Çubuk region in Turkey, *Folia Microbiol*, 60, 241-251.
- Bali, E.B., Türkmen, K.E., Erdönmez, D., ve Sağlam, N., 2019. Comparative study of inhibitory potential of dietary phytochemicals against quorum sensing activity of and biofilm formation by *Chromobacterium violaceum* 12472, and swimming and swarming behaviour of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Food Technology and Biotechnology*, 57(2), 212-219.
- Bassler BL, Wright M, Showalter RE, Silverman MR.,1993. Intercellular signaling in *Vibrio harveyi*: Sequence and function of genes regulating the expression of luminescence, *Mol. Microbiol*, 9,773–786.
- Bassler BL, Wright M, Silverman MR., 1994. Multiple signaling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: Sequence and function of genes encoding a second sensory pathway, *Mol Microbiol* 13, 273–286.
- Boedicker, J.Q., Vincent, M.E, Ismagilov, R.F., 2009. Microfluidic confinement of single cells of bacteria in small volumes initiates high-density behavior of quorum sensing and growth and reveals its variability, *Angew Chem Int Ed Engl*, 48,5908–5911.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Camara, M., Williams, P., Hardman, A., 2002. Controlling infection by tuning in and turning down volume of bacterial small-talk, *Lancet Infect Dis*, 2,667–76.

- Carnes EC, Lopez DM, Donegan NP, Cheung A, Gresham H, Timmins GS, Brinker CJ (2009) Confinement-induced quorum sensing of individual *Staphylococcus aureus* bacteria. *Nat Chem Biol* 6,41–45.
- Celik, f., kazankaya, a., dogan, a., gundogdu, m. And cangi, r. 2015. Some pomological and biochemical properties of rose hip (*rosa* spp.) Germplasm. *Acta hortic.* 1089, 287-292.
- Cha, C., Gao, P., Chen, Y.C., Shaw, P.D., Farrand, S.K., 1998. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria, *Mol. Plant Microbe. Interact*, 11,1119-1129.
- Clifford, M.N., 1999. Chlorogenic acids and other cinnamates–nature, occurrence and dietary burden, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(3); 362-372.
- Daels-Rakotoarison, D.A.; Gressier, B.; Trotin, F.; Brunet, C.; Luyckx, M.; Dine, T.;Bailleul, F.; Cazin, M.; Cazin, J.C.2002, Effects of *Rosa canina* fruit extract on neutrophil respiratory burst. *Phytother. Res*, 16, 157–16.
- De Vuyst, L., ve Degeest, B., 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 153–177.
- Dettweiler, M., Lyles, J. T., Nelson, K., Dale, B., Reddinger, R. M., Zurawski, D. V., ve Quave, C.L., 2019. American Civil War plant medicines inhibit growth, biofilm formation, and quorum sensing by multidrug-resistant bacteria, *Scientific Reports*, 9(1); 1-12.
- Dong, Y.H., Zhang, L.H., 2005. Quorum sensing and quorum quenching enzymes, *The Journal of Microbiology*, 43, 101-109.
- Entani, E. ve Tsukamoto, Y., 2000. Microbial control of vinegar production, *J. Brew. Soc. Jpn.*, 95, 39–45.
- Erdönmez, D., Kenar, N., ve Türkmen, K.E., 2018. Screening for anti-quorum sensing and anti-biofilm activity in *Viscum album* L. extracts and its biochemical composition, *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 19(2); 175-186.
- Ereifej, K.I., Feng, H., Rababah, T.M., Tashtoush, S.H., Al-U'datt, M.H., Gammoh, S. and Al-Rabadi, G.J. 2016 Effect of Extractant and Temperature on Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Selected Spices. *Food and Nutrition Sciences*, 7, 362-370.
- Farag, Mohamed A., Amira R. Khattab, Samir Shamma, and Sherif M. Afifi. 2021. "Profiling of Primary Metabolites and Volatile Determinants in Mahlab Cherry (*Prunus mahaleb* L.) Seeds in the Context of Its Different Varieties and Roasting as Analyzed Using Chemometric Tools" *Foods* 10, no. 4: 728.
- Forsen, R., Heiska, E., Herva, E., ve Arvilommi, H., 1987. Immunobiological effects of *Streptococcus cremoris* from cultured milk “viili”; application of human lymphocyte culture techniques, *International Journal of Food Microbiology*, 5, 41–47.
- Fuqua, C., Winans, S.C., 1996. Conserved cis-acting promoter elements are required for density-dependent transcription of *Agrobacterium tumefaciens* conjugal transfer genes, *J. Bacteriol.* 178, 435 – 440.

- George Dunstall, Michael T Rowe, G Brian Wisdom, David Kilpatrick, 2005, Effect of quorum sensing agents on the growth kinetics of *Pseudomonas* spp. of raw milk origin, *Journal of Dairy Research*, 7, 276–280.
- Girennavar, B., Cepeda, M., Soni, K., Vikram, A., Jesudhasan, P., Jayaprakasha, G., 2008. Grapefruit juice and its furocoumarins inhibit autoinducer signaling and biofilm formation in bacteria. *Int J Food Microbiol*, 125(2), 204–208.
- Givskov, M., de Nys, R., Manefield, M., Gram, L., Maximilien, R., Eberl, L., Molin, S., Steinberg, P.D., Kjelleberg, S., 1996. Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signaling. *J. Bacteriol*, 178, 6618 – 6622.
- Greenberg, E.P., 2003. Bacterial communication and group behavior, *J Clin Investig*, 112, 1288–90.
- Gul P, Bakht J., 2015. Antimicrobial activity of turmeric extract and its potential use in food industry. *J Food Sci Technol*. 52(4):2272-9.
- Hassan, A.N., Frank, J.F., Schmidt, K.A., ve Shalabi, S.I., 1996. Textural properties of yogurt made with encapsulated nonropy lactic cultures, *Journal Dairy Science*, 79, 2098–2103.
- Henke JM, Bassler BL., 2004. Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*, *J Bacteriol*, 186, 6902–6914.
- Hess, S.J., Roberts, R.F., ve Ziegler, G.R., 1997. Rheological properties of nonfat yogurt stabilized using *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* producing exopolysaccharides or using commercial stabilizer systems, *Journal of Dairy Science*, 80, 252–263.
- Higgins DA, Pomianek ME, Kraml CM, Taylor RK, Semmelhack MF, Bassler BL., 2007. The major *Vibrio cholerae* autoinducer and its role in virulence factor production, *Nature* 450, 883–886.
- Hiroimi, K., Shouko, S., Nobuhiko, Nomura., Hajime, T., Hiroo, U., 2008. Biofilm Formation by Lactic Acid Bacteria and Resistance to Environmental Stress, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106, 4, 381–386.
- Hoffman, L.R., D'Argenio, D.A., MacCoss, M.J., Zhang, Z., Jones, R.A. ve Miller, S.I., 2005. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation, *Nature*, 436(7054), 1171-1175.
- Husain, F.M.I., Ahmad, F.I., Khan, et al., 2018. Seed extract of *Psoralea corylifolia* and its constituent bakuchiol impairs AHL based quorum sensing and biofilm formation in food- and human-related pathogens, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(351), 1-16
- Ismet Ozturk ,Safa Karaman , Mehmet Baslar ,Mustafa Cam , Oznur Caliskan , Osman Sagdic , Hasan Yalcin., 2014. Aroma, Sugar and Anthocyanin Profile of Fruit and Seed of Mahlab (*Prunus mahaleb* L.): Optimization of Bioactive Compounds Extraction by Simplex Lattice Mixture Design, *Food Anal. Methods* 7, 761–773.

- Jamuna, B., ve Ravishankar R., 2011. Bacterial quorum sensing and food industry, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 10,184-194.
- Joint, I., Tait, K., Wheeler, G., 2007. Cross-kingdom signalling, exploitation of bacterial quorum sensing molecules by the green seaweed *Ulva*, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 362,1223–1233.
- J.M. Hornby, E.C. Jensen, A.D. Lisec, J.J. Tasto, B. Jahnke, R. Shoemaker, P. Dussault, K.W. Nickerson,. 2001. Quorum Sensing in the Dimorphic Fungus *Candida albicans* Is Mediated by Farnesol, Appl. Environ. Microbiol, 67, 2982-2992.
- Junli Zhu, Aifei Zhao, Lifang Feng, Haichun Gao,. 2016. Quorum sensing signals affect spoilage of refrigerated large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) by *Shewanella baltica*, International Journal of Food Microbiology, 217,146-155.
- Kalia,V.C., Purohit, H.J., 2011. Quenching the quorum sensing system, potential antibacterial drug targets, Crit Rev Microbiol, 37,121–40.
- Kalia M, Yadav VK, Singh PK, Sharma D, Pandey H, Narvi SS, Agarwal V., 2015. Effect of Cinnamon Oil on Quorum Sensing-Controlled Virulence Factors and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS One,11,10(8), 1-18.
- Kaushik S., ve Rajesh K.D., 2019. A review on Quorum sensing inhibitors, Sarkar and Das, IJPSR, 10(12), 5224-5233.
- Kaya, M., Sargin, I. ve Erdonmez, D., 2016. Microbial biofilm activity and physicochemical characterization of biodegradable and edible cups obtained from abdominal exoskeleton of an insect, Innovative Food Science & Emerging Technologies, 36, 68-74.
- Kitazawa, H., Harata, T., Uemura, J., Daito, T., Kaneko, T., ve Itoh, T., 1998. Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, International Journal of Food Microbiology, 40, 169–175.
- Krishnan T, Yin WF, Chan KG., 2012, Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by Ayurveda spice clove (*Syzygium aromaticum*) bud extract. Sensors (Basel), 12(4), 4016-4030.
- Lade H, Paul D, Kweon JH., 2014. N-Acyl homoserine lactone mediated quorum sensing with special reference to use of quorum quenching bacteria in membrane biofouling control. Biomed Res Int.2014,1-24.
- Lequette, Y., Lee, J., Ledgham, F., 2006. A Distinct QscR Regulon in the *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Circuit, J. Bacteriol,188, 3365–3370.
- Llamas I, Keshavan N, Gonzalez JE.,2004. Use of *Sinorhizobium meliloti* as an indicator for specific detection of long-chain N-acyl homoserine lactones, Appl Environ Microb, 70, 3715–3723.
- Lindum PW, Anthoni U, Christophersen C, Eberl L, Molin S, Givskov M.,1998. N-Acyl-L-homoserine lactone autoinducers control the production of an extracellular lipopeptide

- biosurfactant required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1, J Bacteriol. 180, 6384–6388.
- Looijesteijn, P.J., Trapet, L., de Vries, E., Abee, T., ve Hugenholtz, J., 2001. Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*, International Journal of Food Microbiology, 64,71–80.
- Lynch, K.M., Coffey, A., ve Arendt, E.K., 2018. Exopolysaccharide producing lactic acid bacteria, Their techno-functional role and potential application in gluten-free bread products, Food research international, 110, 52-61.
- Lyon GJ, Muir TW, 2003. Chemical signaling among bacteria and its inhibition. Chemistry & Biology, 10(11), 1007-1021.
- Mariod, A.A., Ibrahim, R.M., Ismail, M. and N.Ismail, 2010. Antioxidant Activities of Phenolic Rich Fractions (Prfs) Obtained from Black Mahlab (*Monechma ciliatum*) and White Mahlab (*Prunus mahaleb*) Seedcakes. Food Chem, 118, 120-127.
- Melih GÜZEL, 2011. Mahlep çekirdeği içinden üretilen protein konsantresinin bazı kimyasal ve fonksiyonel özellikleri, Yüksek Lisans tezi, Gaziosmanpaşa üniversitesi.
- McClean KH, Winson MK, Fish L., 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*, ex violacein production and inhibition for the detection of N-acyl-homoserine lactones, Microbiology, 143, 3703–3711.
- McDougald D, Rice SA, Kjelleberg S., 2007. Bacterial quorum sensing and interference by naturally occurring biomimetics, Anal Bioanal Chem, 387, 445–53.
- Mıdık, F., Tokatlı, M., Bağder Elmacı, S., ve Özçelik, F., 2020. Influence of different culture conditions on exopolysaccharide production by indigenous lactic acid bacteria isolated from pickles. Archives of Microbiology, 202(4), 875-885.
- Miller, G., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry, 31, 426-428.
- Miller, M. B., Bassler, B. L., 2001. Quorum sensing in bacteria. Annual Review of Microbiology, 55, 165-199.
- Mohammad RI, Rubina A, Obaidur R, Mohammad A, Akbar MA, Al- Amin M, Alam KD, Lyzu F., 2010, In vitro antimicrobial activities of four medicinally important plants in Bangladesh. Eur J Sci Res , 39, 199–206.
- Moure, A., Rua, M., Sineiro, J., Dominguez, H., 2001. Extraction and Functionality of Membrane-Concentrated Protein from Defatted *Rosa rubiginosa* Seeds. Food Chemistry, 74, 327-339.
- M.M. Marketon, J.E. Gonzalez., 2002. Identification of two quorum-sensing systems in *Sinorhizobium meliloti*, J. Bacteriol, 184, 3466-3475.
- Nakajima, H., Toba, T., & Toyoda, S. 1995. Enhancement of antigen specific antibody production by extracellular slime products from slime-forming *Lactococcus lactis*

- subsp. *cremoris* SBT 0495 in mice. *International Journal of Food Microbiology*, 25, 153–158.
- Nilgün Güneri., 2021. A review on turmeric (*Curcuma longa* L.) and usage in seafood, *Mar. Sci. Tech. Bull.* 10(1), 71-84.
- Nishimura-Uemura J., Kitazawa, H., Kawai, Y., 2003. Functional alteration of murine macrophages stimulated with extracellular polysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1, *Food Microbiol* , 20, 267-273.
- Novick, R.P., 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence, *Mol Microbiol*, 48,1429–1449.
- O'Toole, G., Kaplan, H.D., Kolter, R., 2000. Biofilm formation as microbial development, *Annu Rev Microbiol*, 54, 81–127.
- Oggioni, M.R., Trappetti, C., Kadioglu, A., Cassone, M., Iannelli, F., Ricci, S., Andrew, P.W., Pozzi, G., 2006. Switch from planktonic to sessile life, a major event in pneumococcal pathogenesis, *Mol Microbiol*, 61, 1196– 1210.
- O'Toole, G.A., 2011. Microtiter dish biofilm formation assay, *Journal of Visualized Experiments*, 47, 2437-2437.
- Özer, C.O. (2017). Fermente et model sistemi içerisinde kuflburnu (*Rosa canina* L.) meyvesi kullanımı. *Gıda* , 42(4), 372-38.
- Packiavathy IA, Priya S, Pandian SK, Ravi AV., 2014, Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin - an anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa*. *Food Chem*, 1(148),453-60.
- Patricia, G., Aranzazu, M., Antonio, S., Alberto, F., 2010. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples, *Molecules*, 15, 8813-8826.
- Patricia, R., Jeroen, H., Pieterneel, Z., 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, *International Dairy Journal*, 12,163–171.
- Pilar Truchado, Francisco A. Tomás-Barberán, Mar Larrosa, Ana Allende., 2012. Food phytochemicals act as Quorum Sensing inhibitors reducing production and/or degrading autoinducers of *Yersinia enterocolitica* and *Erwinia carotovora*, *Food Control*, 24: 78- 85.
- Rasmussen TB, Bjarnsholt T, Skindersoe ME, Hentzer M,Kristoffersen P, Kote M, Nielsen J, Eberl L, Givskov M.,2005. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector,n*J Bacteriol*, 187(1), 799–814.
- Rasmussen.TB, Givskov.M., 2006. Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects, review, *Microbiology*; 152, 895-904.
- Riedel K., Ohnesorg T., Krogfelt K. A., Hansen T. S., Omori K., Givskov M., 2001. N-acyl-L-homoserine lactone-mediated regulation of the lip secretion system in *Serratia liquefaciens* MG1, *J. Bacteriol*, 183,1805–1809.

- Salazar, N., Prieto, A., Leal, J.A., Mayo, B., Bada-Gancedo, J. C., de Los Reyes-Gavilán, C. G., ve Ruas-Madiedo, P., 2009. Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains of human origin, and metabolic activity of the producing bacteria in milk, *Journal of dairy science*, 92(9), 4158-4168.
- Salazar, N., Ruas-Madiedo, P., Kolida, S., 2009. Exopoly - saccharides produced by *Bifidobacterium longum* IPLA E44 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IPLA R1 modify the composition and metabolic activity of human faecal microbiota in pH-controlled batch cultures, *Int J Food Microbiol*, 135, 260-267.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.C., Cummings, J., Frank, A., Gibson, G., Isolauri, E., Moreau, M.C., Roberfroid, M., ve Rowland, I., 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function, *British Journal of Nutrition*, 80, 147–171.
- Singleton, V.L., ve Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Shaw PD, Ping G, Daly SL, Cha C, Cronan JE Jr, Rinehart KL, Farrand SK.,1997. Detecting and characterizing *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 6036–604.
- Shen, Yue.; Cui, F.; Wang, D.;Li, T.; Li, J.,2021. Quorum Quenching Enzyme (PF-1240) Capable to Degrade AHLs as a Candidate for Inhibiting Quorum Sensing in Food Spoilage Bacterium *Hafnia alvei*, *Foods*, 10(2700), 1-14.
- Someya N, Morohoshi T, Okano N, Otsu E, Usuki K, Sayama M, Sekiguchi H, Ikeda T & Ishida S., 2009. Distribution of *N*-acyl homoserine lactone-producing fluorescent pseudomonads in the phyllosphere and rhizosphere of potato (*Solanum tuberosum* L.), *Microbes Environ*, 24, 305–314.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B. ve Švabić- Vlahović, M., 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation, *Journal of microbiological methods*, 40(2), 175-179.
- Steidle, A., Sigl, K., Schuegger, R., Ihring, A., Schmid, M., Gantner, S.,Stoffels, M., Riedel, K., Givskov, M., Hartmann, A., Langebartels, C.,Eberl, L., 2001. Visualization of *N*-acyl homoserine lactone-mediated cell-cell communication between bacteria colonizing the tomato rhizosphere, *Appl. Environ. Microbiol*, 67,5761-5770.
- Swati, C., ve Claudia, S.D., 2010. Applications of quorum sensing in biotechnology, *Appl Microbiol Biotechnol*, 86,1267–1279.
- Swift S, Karlyshev AV, Fish L, Durant EL, Winson MK, Chhabra SR, Williams P, Macintyre S, Stewart GS.,1997. Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*, identification of the LuxRI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules, *J Bacteriol*, 179(17), 5271-5281.
- Tanzeela Nisar, Muneeb Iqbal, Ahmad Raza, Madiha Safdar, Fatima Iftikhar, Marwa Waheed., 2015. Estimation of Total Phenolics and Free Radical Scavenging of

- Turmeric (*Curcuma longa*), *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci*, 15(7), 1272-1277.
- Teplitski, M., Robinson, J.B., Bauer, W.D., 2000. Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria, *Mol. Plant Microbe. Interact*, 13, 637-648.
- Tokatlı, M., Elmacı, S.B., İşleyen, N.A., Özçelik, F., 2017. Technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditional pickles, *The Journal of Food*, 42(6), 693-707.
- Tokatlı, M., Gülgör, G., Bağder Elmacı, S., Arslankoz İşleyen, N., Özçelik, F., 2015. In vitro properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles, *Biomed Res. Int*, 2015, 1-8.
- Tortosa, P., Logsdon, L., Kraigher, B., Itoh, Y., Mandic-Mulec, I., and Dubnau, D., 2001. Specificity and genetic polymorphism of the *Bacillus* competence quorum-sensing system, *J Bacteriol*, 183, 451–460.
- Ting Ding, Tingting Li, Jianrong Li., 2018, Impact of curcumin liposomes with anti-quorum sensing properties against foodborne pathogens *Aeromonas hydrophila* and *Serratia grimesii*, *Microbial Pathogenesis*, 122, 137-143.
- Tran, L.-S.P., Nagai, T., and Itoh, Y., 2000. Divergent structure of the ComQXPA quorum sensing components, the molecular basis of strain-specific communication mechanism in *Bacillus subtilis*, *Mol Microbiol*, 37, 1159–1171.
- Van Houdt R, Aertsen A, Moons P, Vanoirbeek K, Michiels CW., 2006. N-acyl-L-homoserine lactone signal interception by *Escherichia coli*, *FEMS Microbiol Lett*, 256, 83–89.
- Vasantha Packiavathy, I.A.S., Agilandewari, P., Musthafa, K.S., Pandian, S.K., ve Ravi, A.V., 2012. Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of *Cuminum cyminum* and its secondary metabolite methyl eugenol against Gram-negative bacterial pathogens, *Food Research International*, 45(1), 85–92.
- Verbeke, F., De Craemer, S., Debunne, N., Janssens, Y., Wynendaele, E., Van de Wiele, C., ve De Spiegeleer, B., 2017. Peptides as quorum sensing molecules, measurement techniques and obtained levels in vitro and in vivo, *Frontiers in Neuroscience*, 11(183), 1-18.
- Venturi, V., 2006. Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*, *FEMS Microbiol. Rev*, 30, 274-291.
- Vipin C. Kalia., 2013. Quorum sensing inhibitors, An overview, *Biotechnology Advances*, 31, 224–245.
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R.J., Ivanova, E.P., 2009. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation, *Molecules*, 14, 2535-2554.
- Yarwood, J.M., Schlievert, P.M., 2003. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections, *J Clin Invest*, 112, 1620–1625.

- Yüksekdağ, Z.N., ve Aslim, B., 2008. Influence of different carbon sources on exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (B3, G12) and *Streptococcus thermophilus*, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 51(3), 581-585.
- Waters, Christopher M, Bonnie L.Bassler., 2005. Quorum sensing, cell-to-cell communication in bacteria, *Annual review of cell and developmental biology*, 21:319 - 346.
- Winson MK, Swift S, Fish L, Throup JP, Jørgensen F, Chhabra SR, Bycroft BW, Williams P, Stewart GSAB., 1998. Construction and analysis of luxCDABE-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing, *FEMS Microbiol Lett*, 163,85–192.
- Wijewardhana U.S, Gunathilaka U.G.S.A, and Navaratne S.B., 2019. Determination of Total Phenolic Content, Radical Scavenging Activity and Total Antioxidant Capacity of Cinnamon Bark, Black Cumin Seeds and Garlic, *International Research Journal of Advanced Engineering and Science*, 4(2), 55-57.
- Wood DW, Gong F, Daykin MM, Williams P & Pierson LS.,1997. N-acyl-homoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere, *J Bacteriol*, 179, 7663–7670.
- Wojdylo, A., J. Oszmianski and R. Czemerys., 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.*, 105, 940-949.
- Zannini, E., Waters, D. M., Coffey, A., ve Arendt, E.K., 2016. Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3), 1121-1135.
- Zeynep İlbay , Selin Şahin ,Ş. İsmail Kırbaşlar., 2013. Investigation of Polyphenolic Content of Rose Hip (*Rosa canina* L.) Tea Extracts: A Comparative Stud, *Foods*, 2, 43-52.
- Zhang, J., Rui, X., Wang, L., Guan, Y., Sun, X., ve Dong, M., 2014. Polyphenolic extract from *Rosa rugosa* tea inhibits bacterial quorum sensing and biofilm formation, *Food Control*, 42, 125-131.
- Zubillaga, M., Weill, R., Postaire, E., Goldman, C., Caro, R., ve Boccio, J., 2001. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases, *Nutrition Research*, 21, 569–579.