

**LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNDEN
EKZOPOLİSAKKARİT İZOLASYONU VE
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN
BELİRLENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Aygün MUSTAFAZADE

Eskişehir 2023

**LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNDEN EKZOPOLİSAKKARİT İZOLASYONU
VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

Aygün MUSTAFAZADE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Zerrin CANTÜRK

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Aralık 2023**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Aygün Mustafazade'nın "Laktik Asit Bakterilerinden Ekzopolisakkarit İzolasyonu ve Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi başlıklı tezi 01/12/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Zerrin Cantürk
Üye	: Prof. Dr. Miriş Dikmen
Üye	: Doç. Dr. Volkan Kılıç
		..

Enstitü Müdürü

ÖZET

LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNDEN EKZOPOLİSAKKARİT İZOLASYONU VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Aygun MUSTAFAZADE

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aralık,

2023

Danışman: Prof. Dr. Zerrin CANTÜRK

Bu tez çalışmasında kolostrumdan izole edilen laktik asit bakterilerinden ekzopolisakkarit ekstraksiyonu yapılmıştır. Ekzopolisakkaritler bağışıklık sistemini geliştirici, kolesterolü düşürücü, antiülser ve antitümör gibi bir çok etkiye sahiptirler. İzole edilen laktik asit bakterilerinin laktik asit üretimi, hemolitik aktiviteleri, pH, safra tuzu ve asit dirençleri, klasik ve moleküler yöntemlerle tanımlanması, otoagregasyon, koagregasyon, biyofilm oluşturma yetenekleri, antibiyotik duyarlılıkları ve antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. İzole edilen ekzopolisakkaritler liyofilize edilerek HepG-2 hücre hattı üzerinde MTT yöntemi ile sitotoksik, Anneksin V-PI yöntemi ile apoptotik etkileri araştırılmıştır. Hücre içi ve hücre dışı sitokin seviyeleride akış hücremetrede belirlenmiştir. Moleküler tanımlama sonuçlarına göre tüm suşların *L. rhamnosus* olduğu belirlenmiştir. IC₅₀ değerleri 3.02-6.5 mg/mL arasında bulunmuştur. Akış sitometri sonuçlarına göre; liyofilize EPS örneklerinin erken apoptoza neden olduğu tespit edilmiştir. Sitokin sonuçlarına göre ise, TNF- α , IL-1 β ve IL-6 sitokinlerde kontrole göre liyofilize EPS örneği uygulanmış hücrelerde azalma, IL-10 sitokininde ise artış olduğu belirlenmiştir. Laktobasillerden izole edilen ekzopolisakkaritlerin hem immünite hem de sitotoksik aktivite açısından önemli potansiyelleri bulunmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Akış sitometri, Ekzopolisakkarit, HepG-2, Sitokinler

ABSTRACT

ISOLATION OF EXOPOLYSACCHARIDE FROM LACTIC ACID BACTERIA AND DETERMINATION OF THEIR BIOLOGICAL ACTIVITIES

Aygun MUSTAFAZADE

Department of Pharmaceutical Microbiology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, December, 2023

Supervisor: Prof. Dr. Zerrin CANTÜRK

In this thesis study, exopolysaccharide extraction was performed from lactic acid bacteria isolated from colostrum. Exopolysaccharides have many effects such as improving the immune system, lowering cholesterol, antiulcer and antitumor. Lactic acid production, hemolytic activity, pH, bile salt and acid resistance, identification by classical and molecular methods, autoaggregation, coaggregation, biofilm formation abilities, antibiotic susceptibility and antimicrobial activity of the isolated lactic acid bacteria were determined. The isolated exopolysaccharides were lyophilized and their cytotoxic effects were investigated using the MTT method and apoptotic effects were investigated using the Annexin V-PI method on the HepG-2 cell line. Intracellular and extracellular cytokine levels were also determined on a flow cytometer. According to the molecular identification results, all strains were determined to be *L. rhamnosus*. IC₅₀ values were found between 3.02 and 6.5 mg/mL. According to flow cytometry results, it was found that lyophilized EPS samples caused early apoptosis. According to the cytokine results, it was determined that there was a decrease in TNF- α , IL-1 β and IL-6 cytokines in the cells treated with lyophilized EPS sample compared to the control, and an increase in the IL-10 cytokine. Exopolysaccharides isolated from lactobacilli have important potential in terms of both immunity and cytotoxic activity.

Keywords: Flow cytometry, Exopolysaccharide, HepG-2, Cytokine

TEŞEKKÜR

Tezim süresince her an yanımda olan, sevgisini, desteğini, bilgi birikimini benden esirgemeyen sayın danışman hocam Prof. Dr. Zerrin CANTÜRK'e,

Fikir ve görüşlerine önem verdiğim, tecrübelerini, bilgi birikimini benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Miriş DİKMEN'e,

Laboratuvar çalışmalarımnda bana destek olan, yardımlarını esirgemeyen sevgili hocam Arş. Gör. Mustafa Güçlü ÖZARDA, arkadaşlarım Hacer AKDAĞ, İrem Nur ÖZKAN, Melis HACIOĞLU ve Tuğçe KOLAÇ'a

Uzakta olmalarına rağmen maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, her zaman bana güvendikleri için canım annem Xumar MUSTAFAYEVA ve canım babam Binnet MUSTAFAYEV'e,

Her daim yanımda olan, maddi manevi desteğini benden esirgemeyen, enerjisi ve sonsuz inancı için canım ablam Aytac MUSTAFAZADE'ye

Sevgisi, ilgisi ve anlayışı ile her zaman yanımda olan canım sevgilim Söhrab AFANDİYEV'a sonsuz teşekkür ederim.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI	
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Laktik Asit Bakterileri	3
2.1.1. <i>Laktobacillus</i>	4
2.2. Probiyotikler	4
2.2.1. Probiyotiklerin özellikleri.....	5
2.3. Ekzopolisakkaritler	6
2.3.1. Ekzopolisakkaritlerin yapıları	8
2.3.1.1. Dekstran	9
2.3.1.2. Mutan	9
2.3.1.3. Reuteran.....	9
2.3.1.4. Alternan	9

2.3.1.5. Levan	9
2.3.1.6. β -D-glukan	10
2.3.1.7. Kefiran	10
2.3.2. EPS'leri etkileyen faktörler	10
2.3.3. Ekzopolisakkarit izolasyonu	11
2.3.4. Ekzopolisakkaritlerin sağlıkta potansiyeli	11
2.3.5. Antimikrobiyal aktivite	11
2.3.6. Anti-inflamatuar aktivite	12
2.3.7. Antikanser aktivite	13
2.3.8. Kolesterol düşürücü aktivite	13
2.3.9. Antioksidan aktivite	14
2.3.10. İlaç Taşıyıcı Sistemler	15
2.4. Kanser	15
2.4.1. Karaciğer kanseri	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM	18
3.1. MİKROBİYOLOJİK ÇALIŞMALAR	18
3.1.1. Besi ortamları ve kimyasallar	18
3.1.1.1. MRS agar	18
3.1.1.2. MRS broth	18
3.1.1.3. Nutrient agar	19
3.1.1.4. Nutrient broth	19
3.1.1.5. Mueller hinton agar	19
3.1.1.6. Mueller hinton broth	20
3.1.1.7. Kanlı agar	20

3.1.1.8. TSI Agar	20
3.1.1.9. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan besiyerleri	20
3.1.2. Kullanılan çözeltiler	21
3.1.2.1. Fizyolojik tuzlu su içeriği	21
3.1.2.2. Hidrojen peroksit tespiti için standart çözelti	21
3.1.2.3. Sodyum hidroksit çözeltisi	21
3.1.2.4. MTT çözeltisi	21
3.1.2.5. Kristal viyole çözeltisi (% 0.1)	21
3.1.2.6. Trikloro asetik asit çözeltisi	22
3.1.2.7. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) çözeltisi	22
3.1.2.8. BHT (butilhidroksitoluen) çözeltisi	22
3.2.1. Kolostrum örneğinin temini	22
3.2.2. Laktobasil izolasyonu	22
3.2.3. Laktik asit bakterilerinin muhafazası	23
3.2.4. İzole edilen mikroorganizmaların tanımlanmaları	23
3.2.4.1. Gram boyama	23
3.2.4.2. Katalaz testi	24
3.2.4.3. Hidrojen sülfür oluşumu	24
3.2.4.4. Hemolitik aktivite tayini	24
3.2.4.5. Biyofilm oluşumu tayini	24
3.2.5. LAB izolatlarının probiyotik özelliklerinin belirlenmesi	25
3.2.5.1. % Otoagregasyon özelliklerinin belirlenmesi	25
3.2.5.2. % Koagregasyon özelliklerinin belirlenmesi	26
3.2.5.3. Asit direncinin belirlenmesi	26

3.2.5.4. Safra tuzu direncinin belirlenmesi	27
3.2.5.5. Ekzopolisakkarit izolasyonu.....	27
3.2.5.6. Antibakteriyal aktivite tayini	27
3.2.5.6.1. Agar kuyucuk difüzyon yöntemi	27
3.2.5.6.2. Mikrobrot dilüsyon yöntemi.....	28
3.2.5.7. Antioksidan aktivitesinin belirlenmesi.....	28
3.2.5.8. Antibiyotik direnç testi	29
3.2.5.9. Laktik asit üretiminin tayini	29
3.2.6. 16S rRNA dizi analizi ile genotipik karakterizasyonların belirlenmesi...30	
3.3. HÜCRE KÜLTÜRÜ DENEYLERİ	32
3.3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Laboratuvar Gereçleri	32
3.3.2. Kullanılan Laboratuvar Cihazları	33
3.3.3. Kullanılan Malzemelerin Steril Edilmesi.....	34
3.3.4. Kullanılan Maddelerin Hazırlanması	34
3.3.4.1. Ekzopolisakkarit.....	34
3.3.4.2. Lipopolisakkarit	34
3.3.4.3. Doksorubisin	34
3.3.5. Hücre Kültürü Çalışmaları	35
3.3.5.1. Stoktan hücre çıkarma.....	35
3.3.5.2. HepG-2 hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması ve deneylere hazırlık	36
3.3.5.3. THP-1 hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması ve deneylere hazırlık	36
3.3.5.4. Hücrelerin stoklanması.....	36

3.3.5.5. HepG-2 hücrelerinin sayımı	37
3.3.5.6. THP-1 hücrelerinin sayımı	37
3.3.5.7. MTT yöntemi ile sitotoksisitenin belirlenmesi	37
3.3.5.8. Akış sitometride Annexin V-PI yöntemi ile apoptotik etkinin belirlenmesi	39
3.3.5.9. Kokültür deneyi.....	40
3.3.5.10. Akış sitometride interlökin 1 beta (IL-1 β) seviyelerinin belirlenmesi	41
3.3.5.11. Akış sitometride TNF- α ve IL-10, IL-6, sitokin seviyelerinin belirlenmesi	41
3.3.5.12. Sitotoksisite yöntemlerinin istatistiksel analizi	42
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	43
4.1. Kolostrumdan Laktobasil İzolasyonu	43
4.2. İzolatların Tanımlanması.....	43
4.2.1. Gram Boyama sonuçları.....	43
4.2.2. Katalaz Testi sonuçları	44
4.3. İzole edilen mikroorganizmaların biyokimyasal aktivite sonuçları	46
4.3.1. Hidrojen sülfür oluşumunun değerlendirilmesi	46
4.3.2. İzolatların hemolitik aktivite sonuçları.....	46
4.4. LAB İzolatlarının Probiyotik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi.....	47
4.4.1. Bakteri Suşlarının % Koagregasyon Değerleri	47
4.4.2. Bakteri Suşlarının % Otoagregasyon Değerleri.....	49
4.4.3. Asit direncinin belirlenmesi.....	49
4.4.4. Safra tuzu direncinin belirlenmesi.....	52

4.4.5. LAB'lardan Ekzopolisakkarit Üretimi	54
4.4.6. Antibakteriyal aktivite tayini	55
4.4.6.1. Agar kuyucuk difüzyon yöntemi	55
4.4.6.2. Mikrobrot h dilüsyon yöntemi	57
4.4.7. Bakteri Suşlarının Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	58
4.4.8. Laktik asit üretim miktarının belirlenmesi	59
4.4.9. Biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi	60
4.4.10. Antibiyotik direnç testi	61
4.5. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	62
4.5.1. HepG-2 hücrelerinde ekzopolisakkaritlerin sitotoksik etkilerinin MTT yöntemi ile belirlenmesi.	62
4.5.2. Annexin V-PI yöntemi ile apoptotik etkinin Akış sitometride değerlendirilmesi	64
4.5.3. Sitokinlerin (IL-1β, IL-6,IL-10, TNF) seviyelerinin Akış sitometride değerlendirilmesi.....	67
4.5.4. 16S rRNA Dizi Analizi ile Genotipik Karakterizasyonların Belirlenmesi.....	75
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	76
KAYNAKÇA	79
ÖZGEÇMİŞ	

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2. 1. Probiyotik olarak kullanılan bakteriler	4
Çizelge 2.2. Ekzopolisakkaritlerin sınıflandırılması	8
Çizelge 2. 3. Homopolisakkaritlerin ve heteropolisakkaritlerin genel özellikleri	8
Çizelge 3. 1. MRS Agar besiyerinin içeriği	18
Çizelge 3.2. MRS Broth besiyerinin içeriği	18
Çizelge 3. 3. Nutrient agar besiyerinin içeriği.	19
Çizelge 3. 4. Nutrient Broth besiyerinin içeriği.	19
Çizelge 3. 5. Mueller hinton agar besiyerinin içeriği.	19
Çizelge 3. 6. Mueller hinton broth besiyerinin içeriği.	20
Çizelge 3. 7. TSI besiyerinin içeriği.....	20
Çizelge 3. 8. HepG-2 hücre hattı besiyerinin içeriği	20
Çizelge 3. 9. THP-1 hücre hattı besiyerinin içeriği	21
Çizelge 3.10. HepG-2 Hücre hattı özellikleri	35
Çizelge 4. 1. Elde edilen izolatların kodları ve özellikleri	44
Çizelge 4. 2. Bakteri suşlarının <i>E.coli</i> ATTC 35298 ile % koagregasyon değerleri.....	47
Çizelge 4. 3. Bakteri suşlarının <i>S.aureus</i> ATTC 25923 ile % koagregasyon değerleri...	48
Çizelge 4. 4. Bakteri suşlarının %otoagregasyon değerleri.....	49
Çizelge 4. 5. LAB liyofilize ekzopolisakkaritlerinin üzerinde oluşturduğu zon çapları.	56
Çizelge 4. 6. LAB izolatlarının patojen bakterileri üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi	57

Çizelge 4. 7. LAB izolatlarının % antioksidan aktivitesi	58
Çizelge 4. 8. LAB izolatlarının % Laktik asit üretimi.....	59
Çizelge 4.9. LAB izolatları ve <i>E. faecalis</i> 51299 suşlarının biyofilm oluşturma yetenekleri.....	61
Çizelge 4. 10. LAB izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları	62
Çizelge 4. 11. Liyofilize ekzopolisakkaritlerin IC ₅₀ değerleri	64
Çizelge 4. 12. Liyofilize ekzopolisakkaritlerin HepG-2 hücre hattındaki apoptotik etkisinin belirlenmesi	65
Çizelge 4. 13. HepG-2 hücre hattında IL-1 β seviyesinin sonuçları	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2. 1. Ekzopolisakkarit örnekleri	9
Şekil 2. 2. Laktik asit bakterileri ve bifidobakterilerden elde edilen ekzopolisakkaritlerin terapötik uygulamalar.....	15
Şekil 3. 1. HepG-2 hücre hattının mikroskop altındaki görüntüsü.	35
Şekil 3. 2. MTT boyasının kimyasal yapısı.....	38
Şekil 3. 3. MTT yönteminin uygulanması.....	39
Şekil 3. 4. Kokültür modeli için kullanılan 24 kuyucuklu plaka (Sol) ve 0.4 µm por	41
Şekil 4. 1. Kolostrumdan izole edilen LAB örnekleri	43
Şekil 4. 2. Saf izolatların Gram boyama örnekleri	44
Şekil 4. 3. Katalaz pozitif (+) ve negatif (-) sonucu	44
Şekil 4. 4. TSI agarda üreme, hareketlilik ve H ₂ S oluşumu	46
Şekil 4. 5. LAB izolatlarının hemolitik aktivite γ-hemolitik izolatların petri görüntüsü.....	47
Şekil 4. 6. pH:2, pH:3 MRS broth asit ortamında ve kontrol ortamı olan pH: 7 MRS broth ortamında 4 saat inkübe edilen LAB izolatlarının 0., 1., 2., 4. saatlerde MRS Agarda gelişimleri.....	51
Şekil 4. 7. %0.1, %0.0.3 safra tuzu içeren MRS broth ortamında LAB izolatlarının gelişimi.....	52
Şekil 4. 8. Kontrol ortamı normal MRS broth ortamı ve %0.1, %0.0.3 safra tuzu içeren MRS broth ortamında 4 saat inkübe edilen LAB izolatlarının 0., 1., 2., 4. saatlerde MRS Agarda gelişimleri.....	54

Şekil 4. 9. Saf izolatlardan elde edilen ekzopolisakkarit örnekleri	55
Şekil 4. 10. LAB liyofilize ekzopolisakkaritlerinin <i>S.aureus</i> (A) ve <i>E.coli</i> (B) test bakterileri üzerinde antibakteriyel etkisi	56
Şekil 4. 11. LAB liyofilize ekzopolisakkaritlerinin <i>E.fecalis</i> (A) ve <i>M.luteus</i> (B) test bakterileri üzerinde antibakteriyel etkisi	56
Şekil 4. 12. LAB liyofilize ekzopolisakkaritlerinin mikrobroth dilüsyon metodu ile <i>S.epidermidis</i> (A) ve <i>E.fecalis</i> (B) test bakterileri üzerinde antibakteriyel etkisi.....	57
Şekil 4. 13. LAB liyofilize ekzopolisakkaritlerinin mikrobroth dilüsyon metodu ile <i>S.aureus</i> (A) ve <i>M.luteus</i> (B) test bakterileri üzerinde antibakteriyel etkisi..	58
Şekil 4. 14. LAB liyofilize ekzopolisakkaritlerinin mikrobroth dilüsyon metodu ile <i>E.coli</i> üzerinde antibakteriyel etkisi	58
Şekil 4. 15. Laktik asit tayini deneyi titrasyon sonucu renk oluşumu	60
Şekil 4. 16. 96'lı kuyucuklu plakada biyofilm görüntüsü	61
Şekil 4. 17. Antibiyotik duyarlılıkları	62
Şekil 4. 18. Liyofilize EPS'lerin ve doksorubisinin HepG-2 hücre hattı üzerindeki % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi	63
Şekil 4. 19. Liyofilize LAB EPS'lerinin HepG-2 hücre hattındaki apoptotik etkisinin Annexin-V – PI yöntemi ile akış sitometride değerlendirmesi	65
Şekil 4. 20. Liyofilize LAB EPS'lerinin HepG-2 hücre hattındaki IL-6 sitokin miktarının akış sitometride değerlendirmesi.....	71
Şekil 4. 21. Liyofilize LAB EPS'lerinin HepG-2 hücre hattındaki IL-10 sitokin miktarının akış sitometride değerlendirmesi.....	73
Şekil 4. 22. Liyofilize LAB EPS'lerinin HepG-2 hücre hattındaki IL-1 β sitokin miktarının akış sitometride değerlendirmesi.....	75

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Alfa
β	: Beta
μ l	: Mikrolitre
μ g	: Mikrogram
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ANOVA	: Varyans Analizi
ATCC	: American Type Culture Collection
BHT	: Butilhidroksitoluen
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	: Enzim Bağlı İmmünoresonans Deneyi
EPS	: Ekzopolisakkaritler
FBS	: Fötal sığır serumu
FITC	: Floresein izotiyosiyanat
g/L	: Gram/ Litre
GRAS	: Genel olarak güvenli

HoPs	: Homopolisakkarit
HePs	: Heteropolisakkarit
HCC	: Hepatosellüler karsinom
ICC	:İntrahepatik kolanjiokarsinom
IC50	: Medyan inhibitör konsantrasyon
IL-1 β	: İnterlökin 1 Beta
IL-6	: İnterlökin-6
IL-8	: İnterlökin-8
IL10	: İnterlökin-10
LAB	: Laktik asit bakterileri
LGG	: <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
LPS	: Lipopolisakkarit
L	: Litre
mg	: Miligram
MHB	: Mueller Hinton Broth
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
MRS	: Lactobacillus Agar acc. to De Man, Rogosa and Sharpe
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
NB	: Nutrient Broth
PBS	: Fosfat tamponlu salin solüsyonu
PI	: Propidyum iyodid
Pen-Strep	: Penisilin-Streptomisin
PS	: Fosfatidilserin

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Dünya çapında kanser ölümlerinin en sık nedeni olan karaciğer kanseri; ölümcül beş kanser arasında olan tek kanserdir. 2020 yılında yapılan araştırmaya göre; karaciğer kanseri, 46 ülkede kanserden ölümlerin ilk üç nedeni arasında, 90 ülkede ise kanserden ölümlerin ilk beş nedeni arasında yer almıştır (Rumgay vd., 2022). 2020 ile 2040 arasında yeni karaciğer kanseri vakalarının sayısının %55 artacağı ve 2040 yılında yaklaşık 1,4 milyon kişiye teşhis konulacağı tahmin edilmektedir. Yüksek riskli ülkelerde karaciğer kanseri 20 yaşından önce ortaya çıkabilirken, düşük riskli ülkelerde karaciğer kanseri 50 yaşından önce nadiren görülmektedir (Xavier vd., 2013).

Risk faktörleri arasında hepatit B virüsü, hepatit C virüsü, yağlı karaciğer hastalığı, alkole bağlı siroz, sigara, obezite, diyabet, aşırı demir yükü ve çeşitli diyet maruziyetleri yer almaktadır (Siegel vd., 2019).

Kanser tedavilerinde kemoterapi, cerrahi operasyonlar ve radyasyon temel tedavi yöntemlerindedir. Kemoterapi en yaygın yöntem olsa bile, birçok hastada toksik etkilere sebep olmaktadır. Bunlara hemotolojik, gastrointestinal, alopesi, organ toksisitesi de dahildir. Kullanılan kemoterapötik ilaçların konusunda hala şüpheler söz konusudur. Çünkü bu ilaçlar sadece kanser hücrelerini öldürmekle kalmaz, aynı zamanda sağlıklı hücrelerde zarar vermektedir. Bu nedenlerden dolayı bilim insanları kanser tedavisinde yüksek verimlilikte etki eden ve minimum toksisiteye sahip olan yöntemleri araştırmaktadırlar (Maroof, vd., 2012).

Probiyotikler, kemoterapiye bağlı toksisite riskini ve yan etkilerini azalttığından dolayı antikanser tedavilerinde önemli bir yer bulmuştur (Klastersky, 1989).

Probiyotikler standart ilaçlara göre daha güvenilir, uygun maliyetli ve uzun kullanımlı olarak değerlendirilmektedir. Antikarsinojenik aktivitede laktik asit bakterileri en önemli bakterilerdir (Zhong vd., 2014). Laktik asit bakterilerinin antikanser etkileri suşa, metabolik özelliklere ve salgılanan bileşiklere bağlıdır (Liu, vd., 2011). Bu bileşiklerden biri de ekzopolisakkaritlerdir.

Ekzopolisakkaritler (EPS) zorlu çevre koşullarıyla başa çıkmak için bakteriler tarafından salgılanan yüksek moleküllü biyolojik polimerlerdir.

EPS'lerin antikoagülan, antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral, kolesterol düşürücü ve antikanser aktivitesi gibi insan sağlığına önemli katkıları vardır (Vurmaz vd., 2019).

Bu tez kapsamında; kolostrumdan laktik asit bakterilerinin izolasyonu, klasik ve moleküler yöntemlerle tanımlanması, antibiyotik duyarlılıkları, antimikrobiyal aktivite testleri, laktik asit üretimi, hemolitik aktiviteleri, pH, tuz, safra tuzu ve asit dirençleri, otoagregasyon ve koagregasyon yetenekleri, biyofilm oluşturma yetenekleri, ekzopolisakkarit izolasyonu ve HepG-2 hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri, hücre içi ve hücre dışı sitokin seviyeleri araştırılmıştır. İzole edilen suşlar arasından probiyotik özellikli laktobasiller seçilmiş ve ekzopolisakkarit izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen ekzopolisakkaritler liyofilize edilerek biyolojik aktiviteleri belirlenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Laktik Asit Bakterileri.

Laktik asit bakterileri (LAB) gram pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmayan, hareketsiz, pH'ya yüksek toleranslı, sitokromoksidaz enzimleri bulunmayan kok veya çubuk şeklinde olan bakteri grubudur (Mokoena, 2017). LAB bakterileri ilk kez 19. yüzyılın ortalarında Orla-Jensen tarafından morfolojik, fizyolojik, ekolojik ve çoğalma sıcaklıklarına göre sınıflandırılmıştır (Heineman, 1920).

Laktik asit bakterileri aerotolerant anaerob mikroorganizmalar olarak adlandırılırlar. Bunun sebebi ise; diğer bakterilerden farklı olarak oksijene karşı duyarlı olmasalarda, oksijenli ortamlarda da gelişebilmesidir (Zhang ve Cai, 2014). Bunun yanı sıra bazı türleri 5°C'nin altında, bazıları ise 45°C gibi yüksek sıcaklıklarda geliştiği için mezofilik mikroorganizmalar olarak da nitelendirilmektedir. Laktik asit bakterilerinin bu ismi almasının asıl sebebi ise; fermantasyon sonucu ana ürünün laktik asit olmasıdır.

Laktik asit bakterilerinin karbonhidrat mekanizması homofermentatif ve heterofermentatif olarak iki gruba ayrılmaktadır. Homofermantatif LAB'lar Embden-Meyerhof Parnas (glikozis) yolunu kullanarak metabolit ürün olarak laktik asit ve CO₂ gazını oluşturmaktadırlar. Heterofermantatif laktik asit bakterileri ise laktik aside ek olarak, başka yan ürünlerde (etil alkol, asetik asit, diasetil) üretmektedirler (Leroy ve Vuyst, 2004).

Laktik asit bakterileri, süt, et ve sebzeler gibi çok çeşitli ürünün korunmasını, duyuşal özelliklerini ve besin değerini geliştirmek için de kullanılmaktadır. Laktik asit bakterilerinin çok çeşitli gıda ürünlerinde uzun zamanlı kullanım nedeni ile GRAS (Genel olarak güvenli) statüsü almıştır (Wei vd., 2019).

Probiyotik özellikli bu bakteriler endüstriyel ve sağlık açısından oldukça önemlidirler.

Bunların yanı sıra salgıladıkları metabolitler de son dönem fazla dikkat çekmiş ve araştırma konusu olmuştur (Ramachandran vd., 2011).

2.1.1. *Lactobacillus*

Lactobacillus gram pozitif, katalaz negatif, G+C (guanin ve sitozin) oranı %50'den az, spor oluşturmeyen hareketsiz çubuk şeklinde olan bakterilerdendir (Hammes vd., 2009). Bu cins ilk kez 1986.yılında, *Lactobacillus delbrueckii* türü ile Beijerinck tarafından tanımlanmıştır. Bu cins, laktik asit bakterileri arasındaki en büyük ve en çeşitli grubudur. Toplamda doğrulanmış 237'den fazla türü mevcuttur ve hala *Lactobacillus metriopecterae* ve *Lactobacillus timonensis* gibi yeni türleri keşfedilmektedir. *Lactobacillus* türleri şekerin parçalanmasında glikosiz yolunu kullanırlar. Bu işlem sırasında şekerin %85-90'ı laktik aside dönüşmektedir (Hammes vd., 2016; Chiba, 2018).

Laktobasiller su ve toprak haricinde her yerde bulunmaktadır. İnsan vücudunda gastrointestinal sistem, vajina, ağız boşluğunda, bitki, hayvan ve onların atıklarında, süt ve süt ürünlerinde, et ve sebze gibi yiyeceklerde de bulunmaktadır (Klaenhammer, 2008).

Hücre yapıları, hücre duvarı, sitoplazma membranı, ribozomlar ve nükleer elementlerden oluşur. Genellikle bir adet plazmidleri bulunur. Plazmidlerin görevi ise mikrobiyal maddeler üreterek çevresel faktörlerden korumaktır (Brenner, 2005).

2.2. Probiyotikler.

Probiyotik terimi, Yunanca “yaşam için” anlamına gelen, “pro” ve “bios” sözcüklerinin bileşiminden oluşmuştur (Gismondo, 1999). Probiyotiklerle ilgili ilk çalışma 19.yüzyılın sonlarında rus bilim adamı Metchnikoff tarafından yapılmıştı. Metchnikoff, Kafkas köylülerinin uzun ömürlü ve sağlıklı olmalarını, *Lactobacillus acidophilus* suşu içeren yoğurt tüketmeleri ile ilişkilendirmiştir. Probiyotik özellikli bu bakterinin bağırsaktaki zararlı mikroorganizmaları yok ettiğini ileri sürmüştür (Fuller,1989). Probiyotikler insanların yanı sıra, karasal canlılardan sucül türlere kadar hayvanlar üzerinde de büyük etkiye sahiptir. Şu anda kullanılan probiyotiklerin çoğu prokaryot organizmalara aittir. Bakterilerden laktik asit bakterileri, bifidobakteriler ve enterokoklar probiyotik özelliği yaygın bakterilerdendir (Bron, 2013; Tuohy vd., 2003).

Çizelge 2. 2. Probiyotik olarak kullanılan bakteriler (Tobias vd, 2010).

Cinsler	Türler
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. bulgaricus, L. cellebiosis, L. lactis, L. acidophilus, L. reuteri, L. brevis, L. casei, L. curvatus, L. fermentum, L. plantarum, L. johnsonii, L. rhamnosus, L. helveticus, L. salivarius, L. gasseri, L. crispatus</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. adolescentis, B. bifidum, B. breve, B. infantis, B. longum, B. thermophilum</i>
<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis, B. pumilus, B. lentus, B. licheniformis, B. coagulans, B. cereus</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. cerevisiae, P. acidilactici, P. Pentosaceus</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. cremoris, S. thermophilus, S. intermedius, S. lactis, S. diacetylactis</i>

2.2.1. Probiyotiklerin özellikleri.

Probiyotik özellikli suşların bazı kriterlere sahip olması gerekmektedir. Bu kriterler güvenlik, teknolojik, fonksiyonel ve performans olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır:

Güvenlik açısından:

- İnsan için kullanılan suşun (kalın ve ya ince bağırsaktan, insan sütünden elde edilen) insan orijinli, hayvan için kullanılan suşun (çiğ süt veya fermante gıdadan elde edilen) ise hayvan orijinli olması gerekmektedir.
- Taksonomik tanımlanmaları 16S rRNA kodlama yöntemi ile yapılmalıdır.
- Patojen, toksik olmamalıdır (Sylvie vd., 2020).
- Aktarılabilen antibiyotik direnç genlerini taşımamalıdır (Anonim,2001).

Fonksiyonel özellikler:

- Aside ve düşük pH'ya (pH <2.0) dirençli olmalıdır (Dunne vd., 2001).
- Safraya toleranslı olmalıdır (Mourad vd., 2006).
- Patojen bakterilere (*Helicobacter pylori, Salmonella sp., Listeria monocytogenes* ve *Clostridium difficile*) karşı antogonistik etkisi olmalıdır (Dash, 2009).
- Gastrointestinal bölgedeki mukus ve epitelyal hücrelere yapışması ve hayatta kalması en önemli özelliklerdendir (Klaenhammer vd., 1999).

Performans özellikler:

- Sağlığa faydalı olmalıdır. Gastroentrit, inflamatuvar bağırsak hastalığı, ishal, kanser, laktoz intoleransı, bebek alerjileri, karaciğer hastalıkları vs. fayda sağlamalıdır (Masci, 2013).

-Antimikrobiyal maddeler sentezleyebilmelidir.

-Biyoaktif bileşen sentezi yapabilmelidir.

Teknolojik özellikleri:

-Yüksek kalite ve çoklu üretim, stoklama ve depolama işleminde uzun süre kararlık gösterebilmelidir (Ravi vd., 2016).

2.3. Ekzopolisakkaritler

Ekzopolisakkaritler, bakteri, maya, mikroalg ve mantarlar tarafından büyüme ortamında gereğinden fazla karbon kaynağı ve stres nedeniyle sentezlenen karbonhidrat polimerleridir (Vinothkanna vd., 2021). Ekzopolisakkaritler laktik asit bakterilerinden elde edilen en önemli biyomakromoleküllerden olup, süt endüstrisinde koyulaştırıcı ve tekstüre edici madde olarak kullanılan benzersiz fizyolojik ve reolojik özelliklere sahip bileşiklerdir (Landersjö vd., 2002).

Bakteriler tarafından sentezlenen ekzopolisakkaritler proteinler, DNA, fosfolipidler, gliserol, fosfatlar ve süksinatlar gibi farklı bileşiklerden oluşan yüksek moleküler ağırlıklı maddelerdir (Angelin ve Kavitha., 2020). Diğer bakterilerden farklı olarak Lactobacillus, Lactococcus, Bifidobacterium, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, Enterococcus ve Weissella cinsleri en belirgin ekzopolisakkarit üreticileridir (Ruas-Madiedo, 2005). Ekzopolisakkarit üretebilen LAB'lar antikanser, antioksidan, immünomodülatör ve kolesterol düşürücü gibi birçok faydalı biyolojik özelliklere sahiptir (Li vd., 2015).

Ekzopolisakkaritler homopolisakkaritler (HoPs) ve heteropolisakkaritler (HePs) olarak 2 gruba ayrılmaktadır. Homopolisakkaritler tek monosakkaritlerden oluşurken, heteropolisakkaritler 2 veya daha fazla monosakkaritten oluşan monomer birimlerin polimer zincirlerinden oluştuğu bildirilmektedir (Khalil vd., 2022). Homopolisakkaritler dallanmış veya dallanmamış glikoz veya fruktozdan oluşur ve α -D-glukan

(örneğin: dekstran, mutan vb), β -D-glukan, fruktan (örneğin: levan, inülin) ve poligalakton olarak 4 sınıfa ayrılır. Heteropolisakkaritler ise D-glikoz, D-galaktoz ve L-ramnoz, mannoz, arabinoz ve fukoz gibi nadir şekerlerden oluşur. Bazı durumlarda N-asetilglukozamin veya glukuronik asit de oluşabilmektedir. Homopolisakkaritlerin moleküler ağırlığı 10^6 Da iken, heteropolisakkaritlerin ağırlığı 10^4 - 10^6 Da arasında değişebilmektedir (Angelin ve Kavitha, 2022).

Ksantan, sfingan, selüloz gibi ekzopolisakkaritler koruyucu bariyer olarak bakteri hücre yüzeyinde biyofilm oluşumunu destekler (Kodali vd., 2009). Homopolisakkaritler genellikle *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*, *Leu. mesenteroides subsp. dextranicum*, *Streptococcus mutans* ve *Str. sobrinus*, *Pediococcus spp.* ve *Streptococcus spp.*, *Str. salivarius* tarafından üretilmektedir (Soyuçok vd., 2016).

HePs'ler ise genellikle mezofil (*Lactococcus lactis*, *Lactobacillus sakei*, *L. rhamnosus* ve *L. casei*) ve termofil (*L. acidophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* (*L. bulgaricus*), *L. helveticus* ve *Str. salivarius subsp thermophilus* (*Str. thermophilus*) laktik asit bakterilerinde daha fazla gözlemlenmiştir (Vaningelgem vd.,2006). HePS üreten bakteri kolonileri katı besiyerinde parlak görünür.

Çizelge 2. 3. Homopolisakkaritlerin ve heteropolisakkaritlerin genel özellikleri (Lynch vd., 2018)

Homopolisakkarit	Heteropolisakkarit
Yalnız 1 monosakkaritten oluşur.	1'den daha fazla monosakkaritten oluşur.
Moleküler ağırlığı $>10^6$ Da	Moleküler ağırlığı: 10^4 - 10^6 Da
Esas olarak <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> ve <i>Weissella</i> tarafından üretilir.	Esas olarak <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Bifidobacterium</i> ve <i>Streptococcus</i> tarafından üretilir.
Esas monosakkaritler: Glukoz ve fruktoz	Esas monosakkaritler: Glukoz, galaktoz ve ramnoz
Probiyotik ile ilişkilidir, α ve β bağlantıları var,	Bağışıklık modülasyonu ile ilişkilidir. α ve β bağlantıları var.

HePs'lerin üretim hızı ve moleküler özellikleri genelde inkübasyon süresi, ortamda bulunan organik ve inorganik bileşenler, pH ve sıcaklık gibi birçok faktörlerden etkilenebilir (Lynch vd., 2018). Heteropolisakkaritlerin üretim seviyeleri genellikle homopolisakkaritlerden daha düşüktür. Bunun en önemli sebeplerinden biri heteropolisakkaritlerin sentezi ile ilgili çalışmalar ve araştırmaların oldukça az olmasıdır. Homopolisakkarit üretimini daha hızlı taramak için moleküler biyolojide kullanılan dejenere primerler kullanılmıştır, fakat taranan genin varlığı veya

yokluğunun her zaman fenotiple ilişkili olmadığı belirlenmiştir (Meulen vd., 2007).

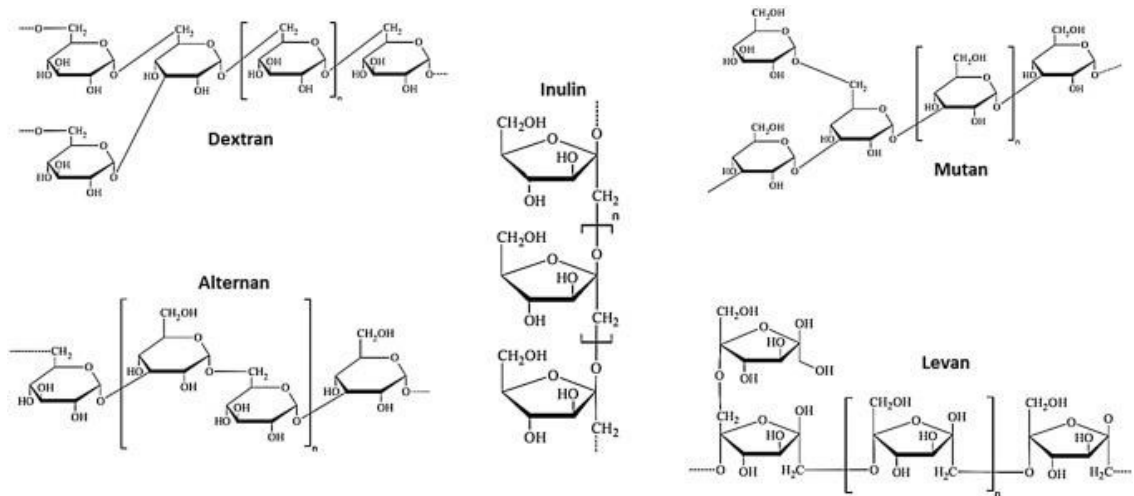
Çizelge 2.2. Ekzopolisakkaritlerin sınıflandırılması



EPS'ler salgılanma mekanizmalarına göre 2 gruba ayrılmaktadır. İlk grup EPS'ler bakterinin yüzeyine salınan hücreye bağlı EPS'ler, ikinci grup ise ortama salınan EPS'ler olarak sınıflandırılmıştır. LAB suşlarının bir çoğunun r-EPS ürettiği bildirilmiştir. Ancak bazı laktik asit bakterileri hem r-EPS (salınan polisakkarit), hem de c-EPS (kapsüler polisakkarit) üretebilmektedir (Li vd., 2015).

LAB bakterilerinden elde edilen r-EPS'ler gıda katkı maddeleri olarak, yeni ilaçların geliştirilmesi amacıyla kaynak olarak kullanılmaya başlamıştır. Özellikle, r-EPS'ler antioksidan ve antikanser özelliklere sahiptir (Li vd., 2014).

2.3.1. Ekzopolisakkaritlerin yapıları.



Şekil 2. 1. Ekzopolisakkarit örnekleri

2.3.1.1. Dekstran

Dekstranlar α -1,6 glikozidik bağlara sahip olan α -glükonlardan oluşan homopolisakkaritlerdendir. *Leuconostoc*, *Streptococcus* ve *Lactobacillus* cinsine ait bazı bakteriler sü krozu hidrolize ederek dekstran elde eder. Dekstranlar gıda, ilaç, kozmetik, klinik ve kimya endüstrilerinde daha sıklıkla kullanılmaktadır.

2.3.1.2. Mutan

Mutan, *Streptococcus mutans* tarafından salgılanan α -1,3 bağlantılı glikoz birimlerinden oluşur. Mutan, α -1,3 glikozidik bağdan kaynaklı olarak suda çözünmeyen polimer bileşiktir.

2.3.1.3. Reuteran

Reuteran, *Lactobacillus reuteri* türü tarafından üretilen α -1,4 ve ayrıca α -1,6 glikozidik bağlardan oluşan, suda çözünen glukandır. Fermente edilmiş süt ürünlerinde bulunmaktadır. Genellikle süt ürünlerinin koyulaştırılmasında ve fırıncılık sektöründe kullanılmaktadır.

2.3.1.4. Alternan

Alternan, α -1,6 ve α -1,3 glikozidik bağlara sahip, yüksek çözünürlüğe sahip olan, dallı glukandır. *Leuconostoc mesenteroides* suşu alternansükraz enzimi yardımı ile alternan üretmektedir. Diğer glukanolardan suda iyi çözünmesi, hidrolize dirençli olması ve düşük vizkositeye sahip olması ile ayrılmaktadır. Alternan, kozmetik ve gıda sektöründe hacim arttırıcı olarak kullanılmaktadır. Bu glukanın parçalanması sonucu oluşan oligosakkaritler probiyotik özelliklere sahiptir.

2.3.1.5. Levan

Levansükroz enzimi yardımı ile fruktozdan β -2,6 bağlantılı ve β -2,1 dallanmalı levan üretir. Ana zinciri β -2,6 bağlantılı olup, yan β -2,1 bağlantılı olan hücre dışı polisakkarittir, suda iyi çözünür, toksik olmama, antitümör, kolesterol düşürme özelliklerine sahiptir. Çevre dostu yapıştırıcılar olarak da kullanılmaktadır. *Streptococcus salivarius*, *S.mutans*, *L. mesenteroides* NRRL B- 512F, *Lactobacillus*

sanfranciscensis LTH2590 ve *L.reuteri* LB121 bakterileri tarafından levan biyosentezi gerçekleştirilmektedir.

2.3.1.6. β -D-glukan

Laktik asit bakterilerinin β -glukan üretiminden glikosiltransferaz enzimleri sorumludur. Son yapılan araştırmalarda *Lactobacillus* spp. G-77 suşunun α -1,3- β -d-glukan salgıladığı rapor edilmiştir. Dallanma derecesi ve zincir uzunluğu α -1,3- β -d-glukanın biyolojik özelliklerinden sorumludur.

2.3.1.7. Kefiran

Kefiran, eşit oranda glikoz ve galaktoz alt birimlerini içeren, suda iyi çözünen heteropolisakkaritlerdendir. Yapılan deneylerde *Lactobacillus kefiranofaciens*, *L. kefiranum*, *L.parakefir* ve *L.delbrueckii subsp. bulgaricus* suşlarının kefiran üretebildiği gözlemlenmiştir. Kefiranın kolestrol ve kan basıncını düşürme, yara iyileştirme, antimikrobiyal etki, antitümör ve bağışıklık artırma gibi birçok faydaları vardır. Süt endüstrisinde koyulaştırıcı olarak da kullanılmaktadır (Zannini, vd., 2016; Patel vd., 2012).

2.3.2. EPS'leri etkileyen faktörler

Her mikroorganizmanın kendine özel bir EPS üretme yeteneği vardır (Oleksy, 2018). Ekzopolisakkarit üretimi bakterilerde özel bir davranıştır ve hücrenin yaşı, besiyeri bileşimi, pH ve sıcaklık gibi faktörlere bağlıdır (Behare vd., 2013). Laktik asit bakterilerinde EPS üretimini hızlandırmak için büyüme faktörleri ve besinlerle zenginleştirilmiş besiyerinin kullanılması en tipik yöntemdir. Örneğin; HoPS'ler için içeriği sukroz, fruktoz veya maltoz gibi bileşiklerle zenginleştirilmiş MRS besiyeri kullanılır. HePS'ler ise direkt olarak bakterinin büyüme ve metabolizması ile ilişkili olduğu için glikoz veya sulandırılmış yağsız sütün kullanılması verimi oldukça arttırmaktadır (Mende vd.,2016). Endüstriyel EPS üretimi sırasında MRS ortamı kullanılmadığı için, araştırmacılar genelde peynir altı suyunda üretimi optimize etmişlerdir (Di vd., 2017).

2.3.3. Ekzopolisakkarit izolasyonu

Ekzopolisakkaritlerin izolasyonunun, saflaştırılmasının ve şeker içeriklerinin belirlenmesinin birçok yöntemi vardır. EPS izolasyonu protokolü, EPS üreten LAB'ların MRS broth ortamında 12-18 saat arası inkübasyonundan sonra, kültür süpernatantının trikloroasetik (TCA) veya etanol ile çöktürülmesi ile deproteinizasyon işlemine maruz bırakılmasını takip etmektedir (Fracchia vd., 2010).

Elde edilmiş ekzopolisakkaritlerin saflaştırılmasını kromatografi yöntemleri ile, fonksiyonel grup karakterizasyonunu ise GC-MS ve FTIR spektroskopisi ile tespit edilebilmektedir (Di vd., 2017).

EPS üretiminin en kolay değerlendirilmesi sümüksü ve ipliksi fenotipler gözlemlenerek sağlanmaktadır. Objektif bir test için süt agarlı petrilere rutenyum kırmızısı ilave edilir ve boyama yapılır. Boyama sonrasında ipliksi olmayan EPS üreticileri kırmızı renge boyanır, ipliksi koloniler ise beyaz olarak kalır (Prete vd., 2021).

2.3.4. Ekzopolisakkaritlerin sağlıkta kullanımı

Probiyotik özellikli bakteriler safra tuzu, düşük pH, mide sıvısında hayatta kalma ve gastrointestinal sistemin epitel tabakasına tutunma veya kolonize olma yeteneğine sahiptirler (Wang vd.,2019). Probiyotik özelliğine sahip EPS'ler otoimmün hastalıklar, enflamatuvar bağırsak hastalıkları, kolon ve karaciğer kanseri, mide ülserleri, obezite ve kardiyovasküler hastalıklarının tedavisinde kullanılabilir. EPS, bundan başka antitrombotik, anti-diyabetik, antioksidan, kan kolestrol düşürücü, antikoagulanlar vb. gibi farmakolojik uygulamalarda da detaylı incelenmiştir (Angelin ve Kavitha, 2020).

2.3.5. Antimikrobiyal aktivite

Yapılan araştırmalar ve deneyler sonrasında LAB'ların diasetil, organik asit, reuterisklin ve antifungal peptidler gibi başka molekülleri kendiliğinde içeren birçok antimikrobiyal bileşik üretebildiği gösterilmiştir. Bu bileşiklerden başka LAB bakterileri tarafından sentezlenen EPS'nin patojen bakterilere karşı antogonistik etki yeteneğinin olduğu da araştırmalarla ortaya konmuştur (Li vd., 2014).

LAB'dan elde edilen EPS'lerin, gram pozitif ve gram negatif patojenlere, özellikle gastrointestinal sistemdeki patojenlere karşı antagonistik etkiler gösterebildiği tespit edilmiştir (Abdalla vd.,2021). Örneğin: insan sütünden izole edilen *Lactobacillus rhamnosus*'dan elde edilen EPS *in vitro* koşullar altında patojen bakteri olan *E.coli* ve *Salmonella typhimurium*'a karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Rajoka vd., 2018).

Diğer bir çalışmada, LAB tarafından türetilen EPS ile birlikte kullanılan gümüş partikülleri patojenik bakterilere karşı kullanılmıştır. Gram negatif bakterilerinden farklı olarak, gram pozitif bakterilerin daha duyarlı olduğu belirlenmiştir (Adebayo-Tayo vd., 2017).

Nagai ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, *Lactobacillus bulgaricus* ile fermente edilmiş yoğurtdan elde edilen EPS, influenze virüsü ile enfekte edilmiş farelere verilmiştir. İmmunoglobulinlerden IgG1 ve IgA'da bir artış olduğu tespit edilmiştir (Nagai vd., 2011).

2.3.6. Anti-inflamatuar aktivite

Probiyotik bakteriler tarafından üretilen EPS'nin bağışıklık hücrelerinin enflamatuar mekanizmasını kontrol ettiği bildirilmiştir. *Lactobacillus LZ-R-17* suşundan elde edilen EPS RAW264.7 makrofaj hücrelerinde makrofaj aktivasyonunu ve fagositozu artırarak NO, TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-10 salgılanmasını teşvik ederek önemli immün-uyarıcı aktivite göstermiştir (You vd., 2020).

Sağlıklı insan vajinasından izole edilen *Lactobacillus sp.* suşundan izole edilen EPS, HeLa hücrelerinde TNF- α ve IL-10 üretiminde azalma ve artma gibi antiinflamatuar aktivite göstermiştir (Sungur vd., 2017). *L.rhamnosus* RW-9595M suşundan elde edilen EPS immünosupresif özellikler göstermiştir. Makrofolarda olan TNF- α ve IL-6 sitokinlerin üretimini uyararak *L.rhamnosus* ATCC9595 suşu ile karşılaştırıldığında, izojenik suş olan RW-9595M TNF- α ve IL-6 seviyelerini etkilemeden anti-inflamatuar belirteç olan IL-10 sitokinini indüklemiştir ve EPS üretimi yükselmiştir (Bleau vd., 2010).

En son araştırmalarda, Toll benzeri reseptör (TLR) negatif düzenleyici olan TLR-4-ün modülasyonunu, LAB EPS'lerin indüklediği ve anti- inflammatuar aktivitesini ortaya çıkaracak mekanizma olduğunu bildirilmiştir (Laino vd., 2016).

2.3.7. Antikanser aktivite

Kanser, belirli proonkogenlerdeki ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlara neden olan ve DNA'da geri dönüşü olmayan bir hasar nedeniyle ortaya çıkan anormal doku büyümesidir. Kemoterapiler, tümör gelişimini etkileyen sitotoksik/immünotoksik tedavilerdir (Saadat vd., 2019). LAB gibi güvenli kaynaklardan elde edilen EPS genellikle düşük sitotoksiteye sahiptir ve yan etkilere neden olmamaktadır (Ismail vd.,2013). EPS'nin içeriğindeki şeker çeşitliliği antiproliferatif etkilerden sorumludur.

EPS'lerin antikanser aktivitesinin mekanizmaları şu şekilde özetlenebilir:

1. Tümör oluşumunun önlenmesi
2. Kanser hücresi apoptozunun uyarılması
3. Bağışıklığın iyileştirilmesi (Zhao vd., 2019).

EPS'nin bazı kimyasal özellikleri; örneğin moleküler bileşimi, zincir bağlantısı ve moleküler ağırlığı da kanser önleyici aktivite de önemli rol oynamaktadır (Wang vd., 2014).

Lactobacillus brevis'ten EPS kullanılarak sentezlenen gümüş nanopartiküller, çeşitli insan kanser hücre hatlarına karşı güçlü anti-proliferatif ajan olarak tıbbi ve biyomedikal alanlarda uygulama alanı bulmuştur (Rajoka vd., 2020).

Lactobacillus suşu SB27 elde edilen asidik EPS, HT29 hücreleri üzerinde kaspaz-3 aktivasyonunda apoptoza neden olmuş, G0/G1 hücre döngüsünde ve anti-proliferatif aktivitede maksimum artış göstermiştir (W. Di vd., 2018).

2.3.8. Kolesterol düşürücü aktivite

İnsanlarda ve hayvanlarda yapılan çalışmalarda LAB'dan elde edilen EPS'nin kolesterol düşürücü etkisinin olduğu gösterilmiştir.

Kanda kolesterol birikimi ve yüksek tansiyon kardiyovasküler hastalıklara neden olan başlıca faktörlerdendir.

LAB'dan elde edilen EPS'nin bağırsakta adsorpsiyon yolu ile serum kolesterol seviyelerini düzenleme yeteneği gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır (Ruas- Madiedo, 2014).*Lactobacillus paracasei* M7 tarafından elde edilen EPS, optimum %0,1 EPS dozu ile kolesterol seviyesinin (25 °C'de 20 dakika boyunca 30 µg) *in vitro* ortamda %70,78'e düştüğü bildirilmiştir (Bhat ve Bajaj, 2019).

2.3.9. Antioksidan aktivite

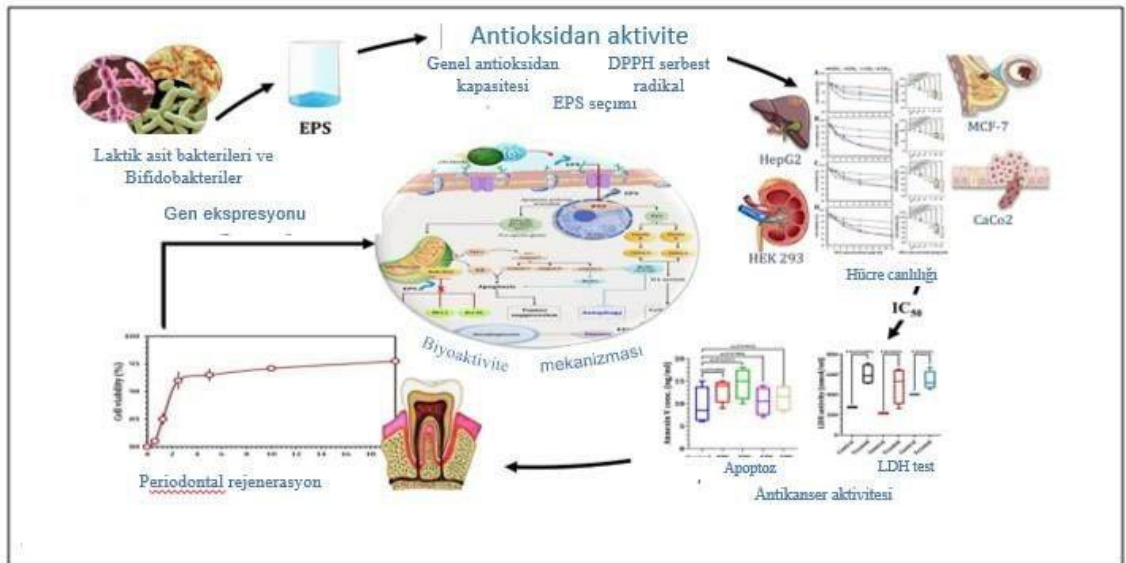
Probiyotik bakterilerden elde edilen EPS'lerin potansiyel antioksidan aktiviteye sahip olması ile ilgili de birçok çalışma bulunmaktadır. LAB, süperoksit dismutaz gibi enzimler salgılayarak doğal hücrel antioksidan savunma yoluyla serbest radikalleri süpürür ve başlıca enzimatik olmayan antioksidan ve serbest radikal temizleyici glutatyonun (GSH) üretimine yardımcı olur. Çeşitli probiyotiklerden ekstrakte edilen ekzopolisakkaritlerin süperoksit anyonu ve hidrojen peroksiti parçalayarak, antioksidan potansiyel yeteneği, gıda takviyesi olarak veya doğrudan ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılması konusunda çalışmalara yol açmıştır (Liu vd., 2010).

Bazı LAB'lardan elde edilen HePS'lerin *in vitro* hidroksil ve süperoksit anyon radikallerini temizleme, *in vivo* antioksidan enzimlerinin artan seviyelerini uyarmak gibi yetenekleri de dahil olmak üzere antioksidan kapasite sergilediği gösterilmiştir.

Fermente süttten elde edilen *Lactobacillus delbrueckii sp. bulgaricus*'dan izole edilen ekzopolisakkarit SRFM-1 antioksidan aktivite konusunda oldukça iyi sonuçlar vermiştir (Tang vd., 2017).

Yerli tavuktan izole edilen *Lactobacillus gasseri* FR4 EPS'nin 4 mg/mL konsantrasyonda DPPH süpürme aktivitesi %75.95, standart olarak kullanılan askorbik asitin ise %92,94 olarak bildirilmiştir (Parveen vd., 2017).

Şekil 2. 2. Laktik asit bakterileri ve bifidobakterilerden elde edilen ekzopolisakkaritlerin terapötik uygulamalar (Khalil vd., 2022).



2.3.10. İlaç Taşıyıcı Sistemler

Bakteriyal EPS'lerin büyüme faktörleri ve antitümör ajanlar gibi değerli ilaçların taşınmasında potansiyel taşıyıcılar olduğu düşünülmektedir. İlaç taşıyıcıları olarak kullanılacak EPS'ler, ilaçların raf ömrünün uzatılmasında, kontrollü salınımını kolaylaştırmak ve vücuttaki etkinliğini artırmak için modifiye edilebilmektedir. Antibiyotikler genellikle bakteriyal EPS'ler tarafından ilaç salınımı için model olarak kullanılmaktadır.

Probiyotik suşlar ve onlardan salgılanan metabolitler mide deki lezyonların tedavisinde de kullanılmaktadır (Saadat vd., 2019). Rodríguez ve arkadaşları kronik gastritin önlenmesinde *Streptococcus thermophilus* CRL1190 ve EPS modelinin koruyucu etkisini göstermiştir (Rodríguez vd., 2009). Wang ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmada ise, kefiran ile kapsüllenen siprofloksasinin mide rahatsızlıklarından koruyabildiği bulunmuştur (Liang vd., 2014).

2.4. Kanser

Kanser, vücuttaki bazı anaplastik hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölündüğü ve vücudun diğer bölgelerine yayıldığı bir hastalıktır. Hücrelerin tipine, kaynağına ve ortaya çıktığı organa göre kanserin çeşitli tipleri vardır. Kanserler esas yapılarına göre karsinom (karsinoma) ve sarkom (sarkoma) olarak iki gruba ayrılmaktadır. Karsinomlar deri meme, solunum ve sindirim yolları, iç salgı bezleri, üreme organları ve boşaltım sisteminin iç yüzünü kaplayan epitelyum dokudan; sarkomlar ise bağ ve yağ dokusu, kan damarları, kemik ve kıkırdak gibi dokulardan köken almaktadır (Bars 2010; Tomasetti, 2017).

Kanser, normal bir hücrenin kromozomal DNA'sındaki bir mutasyondan kaynaklanmaktadır. Kanser, trilyonlarca hücreden oluşan insan vücudunun farklı doku veya organlarında başlayabilir. Hücreler yaşlandıklarında veya herhangi bir hasar gördüklerinde ölür ve yeni hücrelerle değiştirilirler. Bazen bu döngüye iç ve dış faktörler etki eder. İç faktörler immun sistem, hormonlar, metabolik ve kalıtsal mutasyonlardır. Dış faktörler ise radyasyonlar, uyuşturucu, alkol ve kimyasal ajanlar olabilmektedir (Zhang vd., 2012).

Apoptoz ise; kanserde kritik rol oynayan biyolojik bir süreçtir. Apoptoz, birçok sinyal yolu tarafından düzenlenen karmaşık bir olaydır. Genellikle ya kaspaz aracılı dışsal, ya da içsel yollardan başlatılabilir. Hücre prekanseröz yaralanmalara maruz kaldığında, DNA hasarının bir sonucu olarak apoptoz başlatılır ve bu da hasarlı hücreleri ortadan kaldırabilir. Hasarlı hücrelerin uzaklaştırılması, potansiyel olarak tümör büyümesini engelleyecektir. Aksine, bu programlanmış hücre ölümü kesintiye uğradığında, çoklu ilaç direncine ek olarak kontrolsüz hücre büyümesi, kanser başlangıcı ve ilerlemesi gelişmektedir (Johnson vd., 2014; Chen vd., 2013).

2.4.1. Karaciğer kanseri

Karaciğer kanseri, dünya çapında erkeklerde en sık teşhis edilen beşinci kanser türü ve kanser ölümlerinin ikinci en sık nedenidir (Yamashita ve Wang., 2013). Primer karaciğer kanserleri arasında, hepatosellüler karsinom (HCC), primer karaciğer kanseri vakalarının %70-85'ini oluşturan ana histolojik alt tipi temsil eder. İntrahepatik kolanjiokarsinom (ICC), ikinci en sık görülen karaciğer kanseri türüdür ve insidansı giderek artmaktadır.

Hem HCC, hem de ICC, hücresel morfoloji ve klinik sonuç açısından heterojen hastalıklardır (Denisenko vd., 2018).

HepG-2 hücre hattı, 1975'te Arjantin'den hepatosellüler karsinomu olan 15 yaşındaki beyaz bir erkeğin karaciğer dokusundan elde edilen ölümsüz bir hücre dizisidir. “İnsan hepatomundan türetilmiş bir hücre dizisi” olan HepG-2 hücre hattı 1980 yılında Wistar Enstitüsündeki araştırmacılar tarafından ilk kez tescillenmiştir. Bu hücreler morfolojik olarak epitelyaldır, kromozom sayısı 55'tir ve farelerde tümörijenik değildir. HepG-2 hücresi yaklaşık 7.5 pg DNA içerir, bu da normal sağlıklı somatik hücreden %15 daha fazladır (Wiśniewski vd.,2016). Hücreler çeşitli majör plazma proteinlerini, örneğin; albümin ve akut faz proteinleri, fibrinojen, alfa 2-makroglobulin, alfa 1-antitripsin, transferrin ve plazminojen salgırlar. HepG-2 hücresi ortalama 170 pg protein içerir, bu hepatositlerdekenden 3 kat daha azdır (Wiśniewski vd., 2015).

Karaciğer kanserinde aşağıdaki moleküler yollar kullanılmaktadır:

1. Dönüştürücü büyüme faktörü
2. Proto-onkogen Wnt β -katenin
3. Fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)/protein kinaz B

4. c-Jun N-terminal kinaz (JNK)/sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT)
5. Hedgehog ve tümör protein 53 transdüksiyon yolları (Balzarini vd., 2012).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MİKROBİYOLOJİK ÇALIŞMALAR

3.1.1. Besi ortamları ve kimyasallar

3.1.1.1. MRS agar (*Lactobacillus Agar acc. to De Man, Rogosa and Sharpe*)

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH 5,4± 0,2' ye ayarlanmış ve 121° C'de 1,5 atm basınçta 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Çizelge 3. 1. MRS Agar besiyerinin içeriği (Merck)

Maddeler	g/L veya mL/L
Pepton	10 g
Et ekstraktı	10 g
Maya ekstraktı	5 g
Glukoz	20 g
Dipotasyum hidrojen fosfat	2 g
Sodyum asetat	5 g
Amonyum sitrat	2 g
Magnezyum sülfat	0.2 g
Mangan sülfat	0.05 g
Tween 80	1.0 mL
Agar	14 g
Distile su	1 L

3.1.1.2. MRS broth (*Lactobacillus Agar acc. to De Man, Rogosa and Sharpe*)

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH 5,4± 0,2' ye ayarlanmış ve 121°C'de 1,5 atm basınçta 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir .

Çizelge 3. 2. MRS Broth besiyerinin içeriği

Maddeler	g/L veya mL/L
Pepton	10 g
Et ekstraktı	10 g
Maya ekstraktı	5 g
Glukoz	20 g
Dipotasyum hidrojen fosfat	2 g
Sodyum asetat	5 g
Amonyum sitrat	2 g

Çizelge 3. 2. (Devam) MRS Broth besiyerinin içeriği

Magnezyum sülfat	0.2 g
Mangan sülfat	0.05 g
Tween 80	1.0 mL
Distile su	1 L

3.1.1.3. Nutrient agar (LABM, Neogen)

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH $6,8 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmış ve 121°C 'de 1,5 atm basınçta 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Çizelge 3. 3. Nutrient agar besiyerinin içeriği. (Biolife)

Maddeler	g/L veya mL/L
Et ekstraktı	3 g
Pepton	5 g
Agar	15 g
Distile su	1 L

3.1.3.4. Nutrient broth

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH $6,8 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmış ve 121°C 'de 1,5 atm basınçta 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Çizelge 3. 4. Nutrient Broth besiyerinin içeriği.

Maddeler	g/L veya mL/L
Et ekstraktı	3 g
Pepton	5 g
Agar	15 g
Distile su	1 L

3.1.3.5. Mueller hinton agar (Biolife)

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH $6,8 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmış ve 121°C 'de 1,5 atm basınçta 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Çizelge 3. 5. Mueller hinton agar besiyerinin içeriği.

Maddeler	g/L veya mL/L
Sığır eti-kalp ekstraktı	4 g
Kazein hidroliza	17.5 g
Nişasta	1.5 g
Agar	17 g
Distile su	1 L

3.1.1.6. *Mueller hinton broth*

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH $6,8 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmış ve 121°C 'de 1,5 atm basınçta 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Çizelge 3. 6. *Mueller hinton broth besiyerinin içeriği.*

Maddeler	g/L veya mL/L
Sığır eti-kalp ekstraktı	4 g
Kazein hidroliza	17.5 g
Nişasta	1.5 g
Distile su	1 L

3.1.1.7. *Kanlı agar*

Kullanıma hazır olarak petrilere dökülmüş olarak satın alınmıştır. Hemolitik aktivite tayini için kullanılmıştır.

3.1.1.8. *Triple sugar iron (Üç Şekerli- Demir)*

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH $5,4 \pm 0,2$ ' ye ayarlanmış ve 121°C 'de 1,5 atm basınçta 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Çizelge 3. 7. *Triple Sugar Iron besiyerinin içeriği.*

Maddeler	g/L veya mL/L
Et ekstraktı	3 g
Maya ekstraktı	3 g
Pepton	20 g
Laktoz	10 g
Sukroz	10 g
Glukoz	1 g
Sodyum klorür	5 g
Demir-2 sülfat	0.2 g
Sodyum Trifosfat	0.3 g
Fenol red	0.025 g
Agar	12 g

3.1.1.9. *Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan besiyeri*

Çizelge 3. 8. *HepG-2 hücre hattı besiyerinin içeriği*

Maddeler	g/L veya mL/L
Penisilin-streptomisin	1mL
FBS	10mL
DMEM	88mL

Kullanılan malzemeler steril kabinde steril cam şişeye ilave edilip, karıştırıldıktan sonra +4°C’de buzdolabında saklanmıştır.

Çizelge 3. 9. THP-1 hücre hattı besiyerinin içeriği

Maddeler	g/L veya mL/L
Penisilin-streptomisin	1mL
FBS	10mL
RPMI-1640	88mL

Kullanılan malzemeler steril kabinde steril cam şişeye ilave edilip, karıştırıldıktan sonra +4°C’de buzdolabında saklanmıştır.

3.1.2. Kullanılan çözeltiler

3.1.2.1. Fizyolojik tuzlu su içeriği

Serum fizyolojik, mikrobiyolojik ekimlerde dilüsyon sıvısı olarak kullanılmaktadır. %0.85 (w/v)'luk NaCl çözeltisidir. 85 gram NaCl 1000 mL distille su içerisinde çözülerek kullanılmıştır.

3.1.2.2. Hidrojen peroksit standart çözeltisi

0,1 mL saf (% 35) hidrojen peroksit alınıp distile su ilavesi ile 30 mL’ye tamamlanmıştır. Daha sonra bu çözeltiden 1 mL başka bir erlene alınmış ve tekrar distile su ile 30 mL’ye tamamlanmıştır

3.1.2.3. Sodyum hidroksit çözeltisi

4 g sodium hidroksit 100 mL distile su içerisinde çözülerek kullanılmıştır.

3.1.2.4. MTT çözeltisi

0,5 g 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (Sigma) tartılıp steril 100 mL fosfat tamponu (PBS) içinde çözülmüştür. Bu stok çözelti -20°C saklanmıştır. Her çalışmadan önce taze hazırlanmıştır. Sitotoksik aktivite testlerinde kullanılmıştır.

3.1.2.5. Kristal viyole çözeltisi (% 0.1)

0.1 gram kristal viyole tartılıp, 100 mL distile suda çözülmüştür. Çözelti ışık geçirmeyen bir kapda veya alüminyum folyaya sarılıp, +4°C de saklanmıştır.

3.1.2.6. Trikloro asetik asit çözeltisi

80 g TCA tartılıp, 100 mL distile suda çözülmüştür. %80 TCA çözeltisinden 17,5 mL başka bir cam şişeye alınmış ve tekrar 100 mL steril distile su ile tamamlanmıştır. Son konsantrasyonu %14 olacak şekilde TCA elde edilmiştir.

3.1.2.7. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) çözeltisi

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikali (Sigma) 5 mg tartılıp, 250 mL etanolda çözülmüştür. Çalışma sırasında karanlıkta bekletilmiştir. EPS'lerin antioksidan deneyi için kullanılmıştır. Her çalışmadan önce taze hazırlanmıştır.

3.1.2.8. BHT (butilhidroksitoluen) çözeltisi

5 mg BHT (butilhidroksitoluen) 5 mL metanol içerisinde çözülmüştür. Daha sonra bu karışıma 5 mL distile su eklenmiştir. Antioksidan deneyinde kontrol olarak kullanılmıştır.

3.2.1. Kolostrum örneğinin temini

Kolostrum örneği, Afyonkarahisar, Sandıklı Reşadiye Köyü'nden et ve süt verimi için beslenen inekten, doğum sonrası 5-6 saat içerisinde alınmıştır. Alınan örnek Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Araştırma laboratuvarına ulaştırılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Laktobasil izolasyonu

Kolostrum örneği, oda ısısında çözüldükten sonra 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 şeklinde serum fizyolojik ile seri dilüsyon yapılmıştır. Dilüsyon sonrası her bir dilüsyon sıvısından 1 mL alınarak MRS agar ve M-17 besiyerlerine yayma ekim yapılarak ekilmiştir. Petriler 37°C'de 48 saat'lik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası üreme görülen her bir petri gözle incelenmiş, morfolojik olarak farklı görünen her bir örnek tek koloni ekim ile MRS agar ve M-17 besiyerlerine ekilmiştir. Tek koloni ekimin amacı saf kültür elde etmektir. İnkübasyon ardından saf bakteri suşları stoklanarak muhafaza edilmiştir.

3.2.3. Laktik asit bakterilerinin muhafazası

Bakteri suşları MRS broth besiyerinde en az iki kez aktiflenmiştir. Aktif bakteri kültürlerinden 1 mL alınarak, içerisine 2 mL gliserol olan steril kryo tüplere ilave edilip, -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.4. İzole edilen mikroorganizmaların tanımlanmaları

3.2.4.1. Gram boyama

1884 yılında, Danimarkalı doktor olan Hans Christian Gram, bakteri tanımlama ve taksonomik bölünmenin mihenk taşı olan bir diferansiyel boyama tekniği geliştirmiştir. Gram boyama, bakterilerde identifikasyon amacı için kullanılan ilk aşamadır. Bakterilerin hücre duvarının kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre; gram pozitif ve gram negatif olarak sınıflandırılabilen boyama yöntemidir. Gram pozitif bakterilerinin hücre duvarında peptidoglikan tabakası oldukça kalın olup, hücre duvarının %60-90’nı oluşturmaktadır (Rita vd., 2009).

Peptidoglikan tabakasında teikoik asitler bulunur. Gram negatif bakterilerde ise hücre duvarının %10-20’si peptidoglikan tabakadan oluşur. Gram pozitiflerden farklı olarak hücre yüzeylerinde LPS tabakası bulunmaktadır. İlk olarak preparat hazırlanmıştır. Steril lamel üzerine 1 damla distile su konulmuştur. MRS agar besiyerinde üreyen 18-24 saat’lik taze bakterilerden steril öze ile bir miktar bakteri alınır ve distile su ile karıştırılır. Bünzan bek alevinden 2-3 kere geçirilerek kurutulmuştur. Kurutularak bakterilerin fikse edildiği lamel üzerine kristal viyole damlatılıp, 1 dakika bekletildikten sonra distile su ile yıkanmıştır. İkinci aşamada üzerine lugol damlatılıp, 1 dakika bekletilir ve yeniden distile su ile yıkanmıştır. Üçüncü aşamada lamelin üzerine %95’lik alkol dökülüp, dekolorizasyon işlemine geçilmiştir. 25-30 saniye sonrasında preparat distile su ile yıkanıp üzerine bazik fuksin boyası damlatılmıştır ve 1 dakika bekletilmiştir. Sonrasında preparat distile su ile yıkanıp, kurutma kağıdı ile kurutulmuştur. Örnekler ışık mikroskopunda x100’lük objektifte immersiyon yağı kullanılarak incelenmiştir. Gram boyama sonucunda mikroskop altında pembe-kırmızıya boyanan koloniler gram negatif (-), mavi-mor renge boyanan koloniler ise gram pozitif (+) olarak belirlenmiştir (Tamer vd., 1989).

3.2.4.2. Katalaz testi

Genellikle aerob bakterilerde katalaz enziminin varlığının araştırıldığı bir testtir.

Katalaz, hidrojen peroksit yardımı ile su ve moleküler oksijene parçalanmış enzimdir. Bakteriler MRS agarda geliştirildikten sonra öze yardımı ile küçük bir örnek lam yüzeyine alınmış ve üzerine pastör pipeti ile bir-iki damla %3'lük H₂O₂ damlatılmıştır. Pozitif kontrol olarak ise *Staphylococcus aureus* bakterisi kullanılmıştır. Hava veya gaz kabarcıklarının oluşumu katalaz pozitif (+), kabarcıkların oluşmaması ise katalaz negatif (-) olarak değerlendirilmiştir (Akçelik vd., 2000).

3.2.4.3. Hidrojen sülfür oluşumu

Üç şekerli demir agar (TSI), farklı bakteri türlerinin tanımlanması ve ayırt edilmesi için kolay ve ucuz bir testtir. Genellikle gram (+) ve gram (-) bakterilerini bir birinden ayırmak için kullanılır. Eğer bakteriler gram pozitif ise, besiyeri demirin varlığı nedeniyle siyaha döner. Bakteriler gram negatif ise, dış zarın varlığı nedeniyle ortam sarı kalacaktır. Besi ortamında renk değişiminin olması, laktoz, sakkaroz şekerlerinin kullanımını, besi ortamının dip kısmından yukarıya doğru itilmesi ise glikoz şekerinden gaz oluşumuna işaretler. İğne uçlu öze yardımı ile bir miktar aktif bakteri suşu alınmış, dik dondurulmuş tüpteki besiyerine dik olarak inoküle edilmiştir (Hajna, 1945).

3.2.4.4. Hemolitik aktivite tayini

Bakteri suşlarının hemolitik aktivitesini belirlemek için MRS broth besiyerinde 2 kez LAB'lar aktiflendikten sonra 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası izolatlar Kanlı agar besiyerine tek koloni ekim yöntemi ile ekilip, 37°C'de 48 saat'lik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından koloni etrafında her hangi bir zon oluşturmayanlar non-hemolitik (γ -hemolitik), parlak yeşil ve şeffaf berrak zon oluşturanlar ise β -hemolitik ve açık kahverengi zon oluşturanlar ise; α - hemolitik olarak değerlendirilmiştir (Monika vd., 2017).

3.2.4.5. Biyofilm oluşumu tayini

Bakteriler çevresel streslere karşı çeşitli direnç mekanizmaları oluştururlar. Bunlardan en önemlisi de biyofilmdir (Kubota vd., 2008).

24 saat'lik aktif bakteri suşları McFarland 0.5 bulanıklığına göre ayarlanmıştır. %0.25 glikozlu 1.8 mL MRS broth üzerine McFarland 0.5 olan bakteri kültürlerinden

200 µl ilave edilerek 2 mL'ye tamamlanmıştır. “ U” tabanlı 96 kuyucuklu plakanın A1-A9 kuyucuklarına hazırlanan süspansiyondan 200 µl dağıtılmıştır. A10 kuyucuğuna test bakterisi olan *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 bakterisi konulmuştur. A11 ve A12 kuyucukları ise besiyeri kontrolüdür. Plaka 37°C’de 48 saat’lik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından plakadaki sıvı dökülmüştür. Her kuyucuğa 200 µl PBS konulmuştur. İki kez yıkama yapıp, dökülmüştür. Sonraki aşamada her kuyucuğa 150 µl %95’lik etanol koyulup 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda etanol dökülmüş ve kurutma işlemi yapılır. Kuruma işleminin ardından %0.1’lik kristal viyole çözeltisinden 150 µl eklenmiş ve 20 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda kristal viyole dökülüp, 200 µl musluk suyu konulmuştur. Dökülme aşamasının ardından son etap olarak yeniden 150 µl %95’lik etanol eklenip, dökülmüştür. Kurutma işleminin ardından Cytation3 ELIZA okuyucusunda 570 nm dalga boyunda okunmuştur (Stepanovic vd., 2000).

3.2.5. LAB izolatlarının probiyotik özelliklerinin belirlenmesi

3.2.5.1. % Otoagregasyon özelliklerinin belirlenmesi

Laktik asit bakterilerinde otoagregasyon yeteneğinin olup olmadığını belirlemek için; Kos ve diğerleri (2003)’nin metodu temel alınarak yapılmıştır. Bakteri izolatları MRS broth besiyerine ekilmiş ve 37°C’de %5 CO₂ ortamında 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Aktif bakteri kültürleri 24°C’de 1000 rpm’da 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant dökülmüş ve geride kalan pellet 2 kez pH 6.2 PBS ile yıkanmıştır ve yeniden çözülmüştür. Elde edilen çözelti önceden optik dansitesi (OD) 600 nm’ye ayarlanmış spektrofotometrede okutulmuş ve 4 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. 4 saat’lik inkübasyonun ardından çözeltinin üst fazından pipetle 0.1mL alınarak OD’si 600 nm’de okutulmuştur. Daha sonra aşağıdaki formüle uygun olarak bakteri suşlarının otoagregasyon yüzdeleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Otoagregasyon} = \frac{\text{OD1} - \text{OD2}}{\text{OD1}} \times 100$$

[OD1: İlk optikal yoğunluk; OD2: 4 saat sonraki optikal yoğunluk] (Kos vd., 2003).

3.2.5.2. % Koagregasyon özelliklerinin belirlenmesi

Bu test LAB'ların patojen bir bakteri ile (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923) agregasyon yapıp yapmadığını belirlemek için kullanılmaktadır. Koagregasyon özelliklerinin belirlenmesi için Rinkinen ve diğerleri (2003)'nin metodu temel alınmıştır.

Bakteri izolatları MRS broth besiyerinde en az iki kez aktiflendikten sonra 37°C'de %5 CO₂ ortamında 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyonun ardından bakteri izolatları 24°C'de 5000 rpm'da 15 dak santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış, pellet önceden pH 6.2'ye ayarlanmış PBS ile 2 kez yıkanıp ve aynı tampon içinde çözülmüştür. Her bir bakteri örneğinin optik yoğunluğu spektrofotometride 600nm'ye ayarlanmıştır. Test bakterileri ile patojen bakteriler eşit miktarda aynı tüpe eklenip 15 saniye vorteks ile karıştırıldıktan sonra 4 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. İnkübasyon ardından pipetle üst fazdan 100 µl çekilerek spektrofotometrede okutulmuştur. Aşağıda belirtilen formüle uygun şekilde koagregasyon yüzdeleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{Koagregasyon} = \frac{(\text{OD1} + \text{OD2}) - (2\text{OD3})}{\text{OD1} + \text{OD2}} \times 100$$

OD1: Bakteri kültürlerinin optikal yoğunluğu;

OD2: Patojen bakterilerin optikal yoğunluğu;

OD3: Karışık kültürün 4 saat sonundaki optikal yoğunluğu (Rinkinen vd., 2003).

3.2.5.3. Asit direncinin belirlenmesi

Bakteri suşları 5 mL MRS brothda, iki kez aktiflendikten sonra 37°C'de CO₂ ortamında 48 saat'lik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından 1%'lik ekim ile 5 mL MRS brothda yeniden ekim yapıp inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun ardından, 1 M HCl ile pH 2 ve pH 3'e ayarlanmış MRS brothlara ekim yapılmıştır. Kontrol olarak ise pH 7.2'ye ayarlanmış MRS broth hazırlanmıştır. Daha sonra 0,1,2 ve 4. saatin sonunda bakterilerden 10 µl alınmış ve petrilere ekim yapılmıştır. Petriler 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır (Claire vd., 2006).

3.2.5.4. Safra tuzu direncinin belirlenmesi

Bakteri suşları 5 mL MRS brothda, iki kez aktiflendikten sonra 37 °C’de %5 CO₂ ortamında 48 saat’lik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından 1%’lik ekim ile 5 mL MRS brothda yeniden ekim yapıp, 4 saat 37°C ‘de %5 CO₂ ortamında tekrar inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, %0,1 ve %0,03 safra tuzu içeren MRS brothda ekim yapılmıştır. Kontrol olarak MRS broth hazırlanmıştır. Sonrasında 0,1,2 ve 4. saatin sonunda bakterilerden 10µL alınmış ve MRS agarlı petrilere ekim yapılmıştır (Pereira vd., 2002).

3.2.5.5. Ekzopolisakkarit izolasyonu

LAB izolatları MRS brothda en az iki kez aktiflendikten sonra 37°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. 48 saat’lik inkübasyon ardından taze izolatlardan 2mL alınarak 100 mL erlenlere ekim yapılmıştır. EPS üretimini artırmak için MRS broth besiyerine et özütü ve maya özütü ilave edilmiştir. İnkübasyonun ardından bakteri kültürleri +4°C’de 8000 rpm’da 20 dakika santrifüj edilmiştir. Proteinlerin EPS’den ayrılması amacı ile santrifüj sonrası pellet atılmış, süpernatant alınıp ve üzerine son konsantrasyonu %14 olan %80’lik TCA ilave edilmiştir. Proteinlerin EPS’den ayrılması amacı ile TCA ilave edilmiş falkonlar +4°C’de 90 rpm’da 20-30 dakika çalkalamalı etüve bırakılmıştır. İnkübasyon ardından santrifüj işlemi yapılmıştır, proteinler çökmüş, süpernatantlar yeni bir falkona alınmıştır ve üzerine 2 katı soğuk etanol ilave edilerek, + 4°C’de 48 saat bekletilmiştir. 48 saat sonra falkonlar +4°C’de 8000 rpm’da 20 dak santrifüj edilmiş ve ekzopolisakkaritler dibe çökmüştür. Elde edilen ekzopolisakkaritler deneylerde kullanılmak amacı ile liyofilize edilmiştir (Vivek vd 2016).

3.2.5.6. Antibakteriyal aktivite tayini

3.2.5.6.1. Agar kuyucuk difüzyon yöntemi

Agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile izole edilen bakteri suşlarının standart bakteriler olan; *Staphlococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*’e karşı antimikrobiyal aktivite varlığı araştırılmıştır. Test bakterileri ise, Nutrient broth besiyerinde aktiflenmiştir.

Aktif test bakteri kültürleri McFarland 0.5 bulanıklığına ayarlanmıştır. Öncelikle 120 mm çapındaki steril petrilere 25'er mL Mueller hinton agar besiyeri dökülmüş ve steril kabinde donması beklenmiştir. Bulanıklığı ayarlanan patojen test bakterileri steril drigalski spatülü ile yayma ekimi yapıp, 30-40 dakika steril kabinde kapağı yarı açık şekilde kuruma işlemine bırakılmıştır. Kuruma işleminin ardından petrilere steril mantar deliğiyle 4 adet kuyucuk açılmıştır. Kuyucuklar birbirlerinden 2.5 cm, petri kenarlarından ise 1.5 cm uzaklıkta olacak şekilde yapılmıştır. EPS'ler tartılmış ve ependorflere 500 µl distile su eklenip, çözülmüştür. Kuyucuklara 50 µl ekzopolisakkarit eklenmiştir. Petriler 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon ardından oluşan zonlar cetvel ile ölçülmüştür (İşcan , 2015).

3.2.5.6.2. Mikrobroth dilüsyon yöntemi

Deney için “U” tabanlı 96 kuyucuklu plakalar kullanılmıştır. Patojen test bakterisi olarak *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* kullanılmıştır. Patojen bakteri suşları Nutrient broth besiyerinde aktiflenmiştir ve 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Plakalardaki A1-A10 kuyucuklarına liyofolize edilmiş ekzopolisakkaritler, A11 kuyucuğuna bakteri süspansiyonu içermeyen Mueller hinton broth besiyeri, A12 kuyucuğuna ise ekzopolisakkarit içermeyen bakteri süspansiyonu konulmuştur. Başlangıç konsantrasyonu 20 mg olan dilüsyonlar rezervuarda hazırlanmıştır. Çoklu pipetle dilüsyonlar rezervuarlardan alınıp, plakalara eklenmiştir. Her bir kuyucuğa çoklu pipet yardımı ile 100 µl MHB besiyeri konulmuştur. Daha sonra McFarland 0.5’e ayarlanmış test bakterileri sıra ile her plakaya 100µl koyulmuştur. Plakalar 24 saat 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon ardından plakalara 10 µl MTT boyası eklenmiştir. Plakalarda mavi renk üremenin olduğunu, sarı renk ise üremenin olmadığını belirtir (Ryan vd., 1996).

3.2.5.7. Antioksidan aktivitesinin belirlenmesi

Bu yöntemde Yan-Hwa, Chang ve Hsu (2000) tarafından düzenlenen Shimada ve diğerleri'nin (1992), kullandığı DPPH metodu kullanılmıştır.

Bakteri örnekleri MRS brothda en az iki kez aktiflenip, 37°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası aktif suşlar 10.000 rpm’da 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılıp, pellet 2 kez PBS ile yıkanmıştır ve 1 mL

PBS ile resüspanse edilmiştir. Bakterilerin yoğunluğu McFarland 0.5'e ayarlandıktan sonra her birinden 100 µl alınmış, 2.9 mL DPPH çözeltisine ilave edilip 30 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Her bir örnek spektrofotometride 520 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Kontrol olarak ise 100 µl PBS ile 2.9 mL DPPH çözeltisi kullanılmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Kontrol absorbanısı} - \text{Örneğin absorbanısı}}{\text{Kontrol absorbanısı}}$$

(Shimada vd., 1992).

3.2.5.8. Antibiyotik direnç testi

Antibiyotik direnç testi için "U" tabanlı 96'lı kuyucuklar kullanılmıştır. Patojen test olarak ise *Enterococcus faecalis* kullanılmıştır. Antibiyotik olarak Streptomisin, Cefamezin, Vancomicin, Kanamisin sulfat ve Penisilin G kullanılmıştır. Her bir antibiyotikten 28.8 µg tartılarak 2 mL distile suda çözülmüştür. Başlangıç konsantrasyon 72 µg/mL olan dilüsyonlar rezervuarlarda hazırlanmıştır. Antibiyotiklerin konsantrasyonları 72, 36, 18, 9, 4.5, 2.25, 1.25 ve 0.5 µg/mL olarak plakalara dağıtılmıştır. 96'lı kuyucuklardaki A1-A10 kuyucuklarında laktik asit bakterileri ve antibiyotik karışımı, A11 kuyucuklarında ise kontrol amaçlı besiyeri, A12 kuyucuğunda ise antibiyotik içermeyen bakteri süspansiyonu konulmuştur. Bakteriler McFarland 0.5'e ayarlanmıştır. Plakalar 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon ardından plakalara 10 µL MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difenil tetrazolyum bromür) çözeltisi eklenmiştir. Plakalarda mavi renk üremenin olduğunu, sarı renk ise üremenin olmadığını belirtir (Laia Tolosa vd., 2015).

3.2.5.9. Laktik asit üretiminin tayini

Bakteri suşlarının laktik asit üretimini belirlemek için MRS broth besiyerinde 2 kez aktiflendikten sonra 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Aktif LAB kültürlerinden 1 mL alınarak, 99 mL distile su bulunan steril erlene ilave edilip 100 mL'ye tamamlanmıştır. Üzerine 2-3 damla fenol fitalein indikatörü damlatılarak 0,1 M NaOH çözeltisi ile titrasyonları yapılmıştır. Harcanan NaOH miktarları kaydedilmiştir. Aşağıdaki formüle uygun şekilde bakterilerin ürettiği laktik asit miktarları hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Asitlik} = \text{Harcanan } 0,1 \text{ N NaOH (mL)} \times 0,9/\text{mL}$$

(Demirci ve Gündüz, 1994).

3.2.6. 16S rRNA dizi analizi ile genotipik karakterizasyonların belirlenmesi

Seçilen izolatın tanımlanması amacıyla 16s rRNA dizi analizi yapılmıştır. Bu amaçla sıvı besiyerinde hazırlanan gecelik kültür kullanılmıştır. İzolatın DNA izolasyonu için EurX GeneMATRIX Bacterial & Yeast DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. Elde edilen DNA'nın saflık ve miktar analizleri için Thermo Scientific Nanodrop 2000 spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. 8 F ve 1387 R primeleri (Universal primerler) ile tür tayini için hedeflenen gen bölgeleri PCR kullanılarak çoğaltılmıştır. Bakteri izolasyon protokolü aşağıdaki gibidir.

Bakteri DNA izolasyon Protokolü

1- 1,5 mL ependorf tüpte A ve B karıştırılır.

A- 100 µl 1 gece inkübe edilmiş bakteriyal kültür 200 µl Lyse BG buffer

B-Petriden bakteriyal koloni alınarak 300 µl LYSE BG içerisinde süspansedilir.

C- 0.1-1.5 mL 1 gece inkübe edilen bakteriyal kültür santrifüj edilir ve oluşan pellet 300 µl Lyse BG bufferda süspansedilir.

2- 50 µl BL ve 2 µl RNaz A eklenir ve 3 dakika karıştırılır (pipetleme veya vorteks ile)

3- 37 C'de 15 dakika inkübe edilir

4- 15 µl Proteinaz K ilave edilir. Birkaç defa karıştırılır ya da vorteks ile 3 Dakika karıştırılır.

5- 55 C'de 30 dakika inkübe edilir.

6- 350 µl Sol BG ilave edilir. Birkaç defa karıştırılır ya da vorteks ile 3 dakika karıştırılır.

7- 55 C'de 30 dakika inkübe edilir.

8- Lizat 2 dakika 11.000xG'de santrifüj edilir ve supernatant kısmından 600 µl DNA binding spin kolona aktarılır ve toplama tüpünün üstüne konulur.

9- 1 dakika 11.000xG'de santrifüj edilir. Toplama tüp boşaltılır ve spin-kolon tekrar toplama tüpüne konulur.

10- Kalan lizat spin-kolona ilave edilir ve 1 dakika 11.000xG'de santrifüj edilir.

Toplama tüp atılır ve spin kolon yeni bir collection tüpün üstüne konulur.

11- 450 µl Wash BGX buffer eklenir ve 11.000xG'de 1 dakika santrifüj edilir.

12- Toplama tüpteki sıvı boşaltılır ve spin-kolon tekrar toplama tüpün üstüne konur.

- 13- 450 µl Wash BGX buffer eklenir ve 11.000xG'de 1 dakika santrifüj edilir.
- 14- Toplama tüpteki sıvı boşaltılır ve spin-kolon tekrar topama tüpün üstüne konur.
- 15- Wash BGX bufferı tamamen uzaklaştırmak için tekrar 11.000xG'de 1 dakika santrifüj edilir.
- 16- Spin- kolon yeni temiz bir tüpe alınır (1,5-2 mL) ve 50-100 µl elüsyon buffer eklenir.
- 17- 2 dk oda sıcaklığında inkübe edilir.
- 18- 1 dakika 11.000xG'de santrifüj edilir.
- 19- Spin-kolon atılır ve tüp daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere 2-8 C'de ve/veya -20 C'de saklanır.

Elde edilen genomik DNA, kalıp DNA olarak kullanılarak 16S rRNA gen bölgesi için PCR kurulmuştur. Bu amaçla 8F= AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ve 1387R = GGGCGG WGTGTACAAGGC evrensel primerleri kullanılmıştır. Reaksiyon bileşenleri olarak, 10X TaqBuffer (+KCl-MgCl₂), 2,5 µ L; 25 mM MgCl₂, 2,5 µ L; 2,5 mM dNTP mix, 2,5 µ L; 2,5 mM 27F primer, 2,5 µ L; 2,5 mM 1492R primer 2,5 µ L; Taq polimeraz (5u/ µ L), 0,25 µ L; nükleaz içermeyen distile su, 11,75 µ L; kalıp DNA, 1 µL kullanılmıştır. PCR işleminde, ön denatürasyon basamağı 94°C'de 3 dak.; denatürasyon basamağı 94°C'de 30 sn., bağlanma basamağı 55°C'de 1 dak., uzama basamağı 72°C'de 2 dak., 35 döngü; son uzama basamağı ise 72°C'de 5 dak. olarak yapılmıştır.

leminde, ön denatürasyon basamağı 94°C'de 3 dak.; denatürasyon basamağı 94°C'de 30 sn., bağlanma basamağı 55°C'de 1 dak., uzama basamağı 72°C'de 2 dak., 35 döngü; son uzama basamağı ise 72°C'de 5 dak. olarak yapılmıştır.

Sanger dizileme ile elde edilen okumalar, bir konsensüs dizi oluşturmak amacıyla kontig haline getirilmiştir. Bu işlemin gerçekleştirilmesinde BioEdit yazılımı içinde CAP contig assembly algoritması kullanılmıştır. Diziler NCBI (National Center for Biotechnology Information) üzerinden eşleştirilerek en yakın tür belirlenmiştir. İzolatların dizi analizleri, Microbiota Biyoteknoloji Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketine hizmet alımı yoluyla yaptırılmıştır.

3.3. HÜCRE KÜLTÜRÜ DENEYLERİ:

3.3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Laboratuvar Gereçleri

10, 100, 1000 ve 5000 µL'lik pipetör	Eppendorf, Kanada
10, 100, 200, 1000 µL'lik mikropipet ucu	Greiner Bio-One, ABD
12 kanallı otomatik pipet	Axygen, İngiltere
15 ve 50 mL'lik santrifüj tüpleri	Isolab, Almanya
İzoterm mikroskop lamaları	SentezLab, Türkiye
Lamel	Isolab, Almanya
Penisilin/Streptomisin	Biological Industries, İsrail
Thermo Flask, Filtreli Kapak (75 cm ³)	Thermo Scientific, ABD
Thermo Flask, Filtreli Kapak (25 cm ³)	Thermo Scientific, ABD
2 mL'lik Ependorf tüpü	Greiner bio-one, ABD 5 Ve
10 mL'lik cam pipet	Isoterm, Türkiye
96 kuyucuklu hücre kültür plakası	Isolab, Almanya
12 ve 24 kuyucuklu hücre kültür plakası	Jet Biofil
6 kuyucuklu hücre kültür plakası	Nest, Çin
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma – Aldrich, Almanya
RPMI-1640 medyum (1X)	HyClone, Thermo Scientific
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma – Aldrich, Almanya
Cedex Smart Slide	Roche, Almanya
Parafilm	Pechiney, Fransa
Şarjlı pipetör	Starlab, Almanya

Tripsin-EDTA	10X Pan Biotech, Almanya
Tripan mavisi	Roche, Almanya
Kryotüp (2 mL)	Cyros, Türkiye
Hücre kazıyıcı	Greiner Bio-One, ABD
Phosphate Buffer Saline (PBS)	İnvitrogen, Almanya
Lipopolisakkarit <i>E.coli</i> L4005-100 mg	Sigma – Aldrich, Almanya

3.3.2. Kullanılan Laboratuvar Cihazları

HERAcell 240 Steril CO ₂ inkübatörü	Thermo Scientific, ABD
Laminar flow kabini	Heal Force, Çin
Masaüstü soğutmalı santrifüj	Eppendorf, Almanya
Hücre sayımı için Cedex XS	Innovatis, ABD
Cytation 3 Multi-Mode Reader	Bio-Tek, ABD
Derin dondurucu buzdolabı	Altus, Türkiye
Hassas terazi	Ohaus, Avustralya
Inverted mikroskop	Leica, Almanya
Otoklav	Alp, Türkiye
Otomatik pipetler	Eppendorf, Almanya
Sterilizatör	Nüve, Türkiye
Su banyosu	Nüve, Türkiye
Vorteks	Daihan, Güney Kore
Akış sitometri cihazı	BD. FACS Aria
Çalkalamalı etüv	Thermo Scientific, ABD

3.3.3. Kullanılan Malzemelerin Steril Edilmesi

Çalışmalarda kullanılacak cam ve metal malzemeler alüminyum folyolara sarılı olarak sterilizatörde 180°C’de 2 saat, sıvı solüsyonlar, şişeler, rezervuarlar, kazıyıcılar, pipetler ve falkon tüpler ise alüminyum folyolarla kaplanarak 121°C, 1.5 atm/Hg’de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Kontrol amaçlı her bir malzemeye otoklav bandı yapıştırılmıştır.

3.3.4. Kullanılan Maddelerin Hazırlanması:

3.3.4.1. *Ekzopolisakkarit*

Liyofolize sonrası toz halinde olan EPS’ler 20 mg olarak tartılmış ve 1 mL distile su içerisinde çözülerek ana stok hazırlanmıştır. Maddeler +4 °C muhafaza edilmiştir. Her deney aşamasında medyum ile seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda kullanılmıştır.

3.3.4.2. *Lipopolisakkarit*

LPS’ler gram negatif bakterilerinin hücre duvarında bulunmaktadır. Toz halinde olan LPS *E.coli* L4005 steril distile su ile çözünerek 100 ng/mL konsantrasyonunda ana stok hazırlanmıştır. Ana stok alikvatlanarak, -20°C’de saklanmıştır. Kokültür çalışmalarında kültür medyumu ile seyreltilerek gerekli konsantrasyonlarda THP-1 ve HepG-2 hücrelerinde kullanılmıştır. Her deney aşamasında taze olarak hazırlanmıştır.

3.3.4.3. *Doksorubisin*

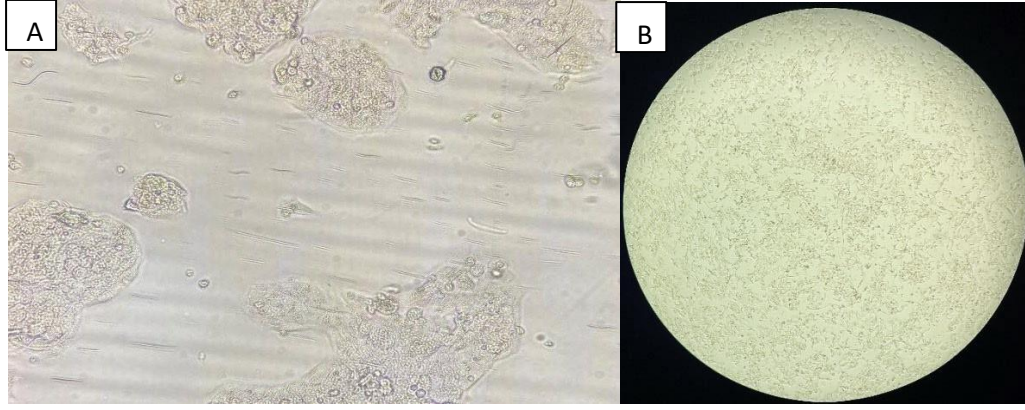
Çalışmamızda kanser hücreleri için pozitif kontrol olarak doksorubisin kullanılmıştır. Toz halindeki doksorubisin 29 mg tartılarak 1 mL DMSO’da çözünüp 50 mM konsantrasyonda ana stok hazırlanmıştır. Stok solüsyon +4°C muhafaza edilmiştir. Deneylerde ana stoktan kültür medyumu ile 1:10 dilüsyon yapılarak ara stok hazırlanmıştır.

3.3.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmamızda insan karaciğer hücre hattı HepG-2 ve insan monosit hücre hattı THP-1 kullanılmıştır.

Çizelge 3. 10. HepG-2 Hücre hattı özellikleri (http-1).

Organizma	İnsan
Cinsiyet	Erkek
Morfoloji	Epitel
Kromozom sayısı	55
Diğer Özellikleri	Yapışkan ve küçük kümeler halinde büyür
Tümörjenite	Değildir



Şekil 3. 1. HepG-2 hücre hattının mikroskop altındaki görüntüsü: A-10X; B-4X.

3.3.5.1. Stoktan hücre çıkarma

Hücreler -80°C’de donmuş halde muhafaza edilmektedir. Dondurulmuş hücreler 37°C sıcaklığındaki su banyosunda hızlı bir şekilde çözülmüştür. Çözöldükten sonra hücreler 50 mL’lik falkona aktarılıp üzerine 10 katı besiyeri ilave edilip, 5 dakika 1250 rpm’de santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmıştır. Falconun dibine çöken hücre pelletine 5 mL taze besiyeri ilave edilip, pipetaj yapılmıştır. Süspanse şeklinde olan hücreler serolojik pipet ile 25 cm³’lik küçük flaska aktarılmıştır. Flask etüve kaldırılmıştır.

3.3.5.2. HepG-2 hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması ve deneylere hazırlık

Karaciğer hücre hattı (HepG-2) %10 fetal bovine serum (FBS), %1 penisilin/streptomisin (PS) ve %0.1 piromisin içeren Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) büyüme besiyeri kültür ortamında çoğaltılmıştır. Ardından flasklar %5 CO₂'li etüvde, %95 bağıl nem'de 37°C'de kültür ortamında çoğaltılmıştır. HepG-2 hücre hattı 25 cm³'lik flasklarda geliştirilmiş, yaklaşık 2 günlük inkübasyon sonrası flaskın %70-80 oranında tabanını kaplamıştır. Flasktaki eski besiyeri serolojik pipet yardımı ile çekilerek uzaklaştırılmıştır. 5 mL PBS flaska ilave edilmiştir. Yıkama işleminin ardından adhere hücreleri kaldırmak amacı ile flaska 500 µl tripsin-EDTA eklenmiş ve 3 dakika inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından flaska kenar kısımlardan hafif mekanik güç uygulanmış ve hücreler yüzeyden tamamen kaldırılmıştır. Tripsinin etkisini nötralize etmek için yüzen hücrelere 5 mL taze besiyeri ilave edilerek, pipetaj yapılmıştır. Ardından süspansiyon hücreler 50 mL'lik falkona aktarılarak 5 dakika 1250 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırılıp, çöken hücre pelletine 15 mL besiyeri ilave edilmiştir. Pipetleme sonrası hücreler 75 cm³'lik büyük flaska aktarılmış ve etüve kaldırılmıştır.

3.3.5.3. THP-1 hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması ve deneylere hazırlık

İnsan monosit THP-1 hücreleri %10 fetal bovine serum (FBS), %1 penisilin/streptomisin (PS) ve %0,1 piromisin içeren RPMI (Roswell Park Memorial Institute 164RPMI-1640) büyüme besiyeri kültür ortamında çoğaltılmıştır. Ardından flasklar %5 CO₂'li etüvde, %95 bağıl nem'de 37°C'de kültür ortamında çoğaltılmıştır. THP-1 hücre hattı 25 cm³'lik küçük flasklarda geliştirilmiş, yaklaşık 2 günlük inkübasyon sonrası flaskın %70-80 oranında kaplamaktadır. Küçük flaskdaki eski besiyeri serolojik pipet yardımı ile çekilerek 50 mL'lik falkonlara aktarılmıştır ve 5 dakika 1250 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırılıp çöken hücre pelletine 15 mL besiyeri ilave edilmiştir. Pipetleme sonrası hücreler 75 cm³'lik büyük flaska aktarılmış ve etüve kaldırılmıştır.

3.3.5.4. Hücrelerin stoklanması

Hücrelerin eski besiyerleri uzaklaştırılmış, PBS ile yıkanmış ve kaldırıldıktan sonra 50 mL'lik falkona aktarılarak 1250 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış, üzerine 1370 µl FBS ve 130 µL Dimetilsülfoksit (DMSO) çözeltisi konularak pipetleme yapılmıştır.

Pipetaj işleminin ardından homojen karışım kriyotüpe aktarılmıştır. -20°C’de 4 saat bekletilip, daha sonra -80°C’deki dondurucuda stoklanmıştır.

3.3.5.5. HepG-2 hücrelerinin sayımı

HepG-2 hücreleri 75 cm³’lik büyük flaskda yeterli yoğunluğa ulaştıklarında pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Flasktaki eski besiyeri serolojik pipetle uzaklaştırılır ve 5 mL PBS ilave edilerek yıkama işlemi yapılmıştır. Hücreler adhere olduğu için flaska 1 mL tripsin- EDTA ilave edilerek 3 dakika etüve bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından flaska kenar kısımlardan hafif mekanik güç uygulanmış ve hücreler yüzeyden tamamen kaldırılmıştır. Tripsinin etkisini nötralize etmek için flaska 5 mL taze besiyeri ilave edilmiştir. Ardından süspanse hücreler 50 mL’lik falkona aktararak 5 dakika 1250 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış, falkona 1 mL taze DMEM besiyeri eklenerek pipetaj yapılmıştır. Pipetlemenin ardından lamelin üzerine 10 µl Tripan mavisi ve 10 µl hücre eklenerek karıştırılmış Cedex Smart Slide’a aktarılmış ve Cedex XS (Innovatis) cihazında hücreler sayılmıştır.

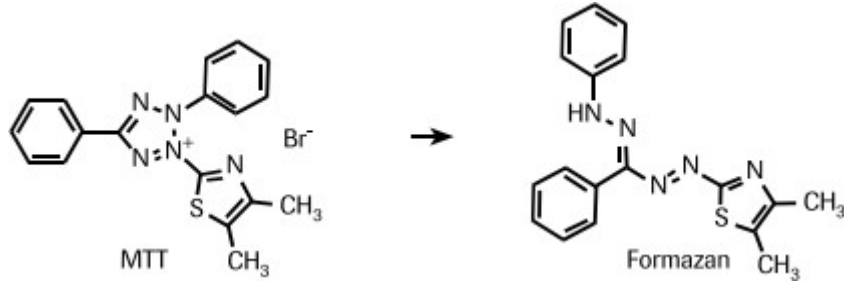
3.3.5.6. THP-1 hücrelerinin sayımı

THP-1 hücreleri 75 cm³’lik büyük flaskda yeterli yoğunluğa ulaşınca hücre sayımı yapılmıştır. Flaskdaki eski besiyeri serolojik pipet yardımı ile çekilerek 50 mL’lik falkonlara aktarılmıştır ve 5 dakika 1250 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırılıp, çöken hücre pelletine 1mL taze RPMI besiyeri eklenerek pipetaj yapılmıştır. Pipetlemenin ardından lamelin üzerine 10 µl Tripan mavisi ve 10 µl hücre eklenerek karıştırılmış Cedex Smart Slide’a aktarılmış ve Cedex XS (Innovatis) cihazında hücreler sayılmıştır.

3.3.5.7. MTT yöntemi ile sitotoksitenin belirlenmesi

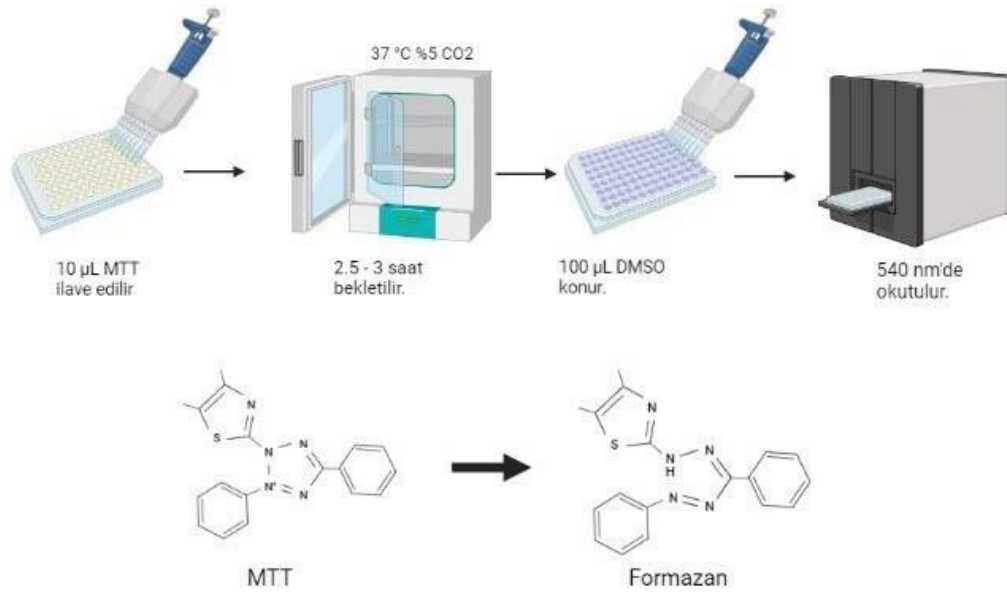
Sitotoksiste testi, maddelerin çeşitli dokulara toksisitesini tahmin etmek için kullanılan ilk *in vitro* biyoanaliz yöntemlerindedir (Tolosa vd., 2015). Mosmann 1983 yılında hücre canlılığını, proliferasyon ve sitotoksiste belirleme yöntemi olan MTT testini geliştirmiştir. Bu test hücre canlılığı testlerinin “altın standardı” olarak

adlandırılmaktadır (Erkekoğlu ve Baydar, 2021). Canlı hücreler mitokondriyal dehidrogenaz enzime sahiptirler. Bu kolorimetrik yöntem, canlı hücrelerde sarı tetrazolium tuzunun (MTT ve ya 3-(4,5 dimetiltiyazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromür) aktif hücreler tarafından mor renkli formazan kristallerine indirgenmesine dayanmaktadır (Genc vd., 2002; Hanelt vd.,1994).



Şekil 3. 2. MTT boyasının kimyasal yapısı (https-2).

MTT analizinde mor renkli suda çözünmeyen formazan tuzuna çözebilmek için çözücü olarak DMSO kullanılır. Spektrofotometride 540-570 nm dalga boyunda ölçülür. Kuyucuklar ne kadar koyu mor renkte olursa hücrelerin canlılığı ve metabolik aktivitesi o kadar fazla demektir. Ölü veya mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler ise boyanmaz, renksiz-açık sarı olarak kalırlar (https-2). Yöntemin uygulanması: HepG-2 hücreleri DMEM besiyerinde 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde kültüre edilmiştir. 5x10³ hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekim yapılmıştır. Hücreler 24 saat'lik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki medyumlar uzaklaştırılmış, ilk konsantrasyonu 10 mg olacak şekilde EPS'lerden seri dilüsyon hazırlanıp, plakalara 100 µl olarak dağıtılmıştır. Kontrol olarak ise EPS içermeyen hücreler kullanılmıştır. Hücreler tekrar 24 saat'lik inkübasyon için etüve bırakılmıştır. Deney sırasında maddelere renk körüde yapılmıştır. Steril kabinde karanlık ortamda MTT boyasından her bir kuyucuğa 10 µl olacak şekilde konulmuştur. Sonrasında hücreler 2.5-3 saat'lik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon ardından MTT içeren besiyerleri uzaklaştırılarak, her kuyucuğa 100 µl DMSO konulmuştur. Plakalar, Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader'da 540-570 nm dalga boyunda, her konsantrasyon 8 tekrarlı şekilde okutulmuştur.



Şekil 3. 3. MTT yönteminin uygulanması (Biorender aracılığı ile yapılmıştır.)

3.3.5.8. Annexin V-PI yöntemi ile apoptozisin Akış sitometride belirlenmesi

Sağlıklı hücrelerin yüzeyi, plazma zarının iç ve dış yüzeyine asimetric olarak dağılmış lipidlerden oluşur. Bu lipidlerden biri olan fosfatidilserin (PS), normalde plazma zarının iç membranında bulunmaktadır. Apoptoz sırasında lipid asimetrisi kaybolur ve hücrede bir sıra değişimler ortaya çıkar. En belirgin değişim ise normalde hücre zarının iç yüzünde yerleşen negatif yüklü PS, plazma zarının dış yüzeyine transloke olmasıdır. Bu sebepten kollektin (C1q) proteinleri hücre zarına bağlanır. Bu değişim sağlıklı hücrelerden hücre membranının bütünlüğünün bozulmadığı apoptik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir (Crowley vd., 2016). Bu değişim ilk kez Koopman tarafından tanımlanmıştır (Koopman vd., 1994).

Annexin V proteini, ilk kez Bohn ve arkadaşları tarafından insan plasentasından izole edilmiştir (Raynal vd., 1994). 36 kDa kalsiyum bağlayıcı olan Annexin V fosfatidilserine'lere bağlanabildiği için, floresan bir madde ile (örn. FITC) işaretlenerek apoptotik hücrelerin görünür hale gelmesini sağlar (Karabekir, 2017). Ölü ve geç apoptize giren hücreleri belirlemek için Propidium iyodid (PI) boyası kullanılır. Bu boya çift sarmallı RNA veya DNA moleküllerine bağlanarak apoptik hücreleri belirler (Engeland vd., 1999). Yöntemin uygulanması: Çalışmada kullanılacak olan HepG-2 hücreleri DMEM besiyerinde 37°C'de %5 CO₂ inkübatöründe kültüre edilmiştir.

Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler kaldırılarak 6'lı plakalara 1×10^5 sayıda ekilip, etüve kaldırılmıştır. 24 saat'lik inkübasyon ardından her kuyucuğa 250 µl EPS eklenmiştir. Kontrol amaçlı bir kuyuda sadece besiyeri içeren hücre ekilmiştir. Daha sonra plakalar 24 saat'lik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklardaki hücre medyum karışımı 15 mL'lik falkonlara aktarılmıştır. Hücreler adhere olduğu için her kuyucuğa 250 µl tripsin-ETDA eklenmiş ve 3 dakika inkübatörde bekletilmiştir. Süre sonunda her kuyucuğa 1 mL soğuk PBS ilave edilerek pipetaj yapılmıştır. Süspansiyon hücreler falkona aktararak 5 dakika 1200 rpm'da santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmıştır. Yeniden 1 mL soğuk PBS eklenerek yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkama işleminin ardından hücre pelletine 400 µl soğuk PBS eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Ependorfun her köşesine birbirine paralel şekilde 5 µl Annexin V ve 5 µl PI boyası konulmuştur. Sonrasında PBS ile resüspanse edilmiş hücreden 200 µl ependorfa eklenip, 25-30 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Süre sonunda ependorfa 200 µl 1X Annexin bağlama tamponu eklenip, akış sitometri cihazında (Accuri C6, BD) okutulmuş ve analizleri yapılmıştır.

3.3.5.9. Kokültür deneyi

Kokültür çalışmasında iki hücrenin aynı ortamda yaşaması için üst ve alt odaların bir birinden ayrı olduğu, 0.4 µm çapta gözeneklere sahip olan filtre ile ayrılan özel 24 kuyucuklu ko-kültür plakaları kullanılmıştır. Filtresiz kuyucuklara insan monosit hücreleri olan THP-1, filtreli kuyucuklara ise HepG-2 hücreleri ekilmiştir. Deneylerde HepG-2 hücre sayısı 2×10^5 iken THP-1 hücreleri ise onun 5 katı yani, 1×10^6 olarak ekilmiştir. Hücreler plakaya ekildikten sonra 24 saat'lik etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon ardından THP-1 ekilen kuyucuklara 5 µl LPS eklenmiştir. Kontrol olarak 2 kuyucuk bırakılmıştır. Yeniden 4 saat'lik inkübasyona bırakılmıştır. 4 saat'lik sürecin ardından filtreli kuyucuklardaki HepG-2 hücreleri ile birlikte THP-1 olan kuyucuklara taşınmıştır. Her kuyucuğa konsantrasyonu 5 mg olacak şekilde 50 µl EPS eklenmiştir. Pozitif kontrol olarak doksorubisin kullanılmıştır. Yeniden 24 saat'lik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası IL-1β, IL-6, IL-10 ve TNF-α sitokin seviyelerini belirlemek için kullanılmıştır.



Şekil 3. 4. Kokültür modeli için kullanılan 24 kuyucuklu plaka (Sol) ve 0.4 µm por açıklığına sahip üst odacık

3.3.5.10. Akış sitometride interlökin 1 beta (IL-1β) seviyelerinin belirlenmesi

İnterlökin-1β ilk olarak farelerde ve insanlarda keşfedilmiştir. IL-1 enflamasyonun ana aracısıdır ve genel olarak enflamasyon sırasında karakteristik olarak eksprese edilen çok çeşitli yapısal olmayan, işlevle ilişkili genleri, özellikle diğer sitokinlerin salınımını başlatır veya artırır. Vücudun mikrobiyal istilaya, iltihaplanmaya, immünolojik reaksiyonlara ve doku hasarına tepkisinin ana araçlarından biridir (Bird vd., 2002). IL-1β epitel ve endotel hücreleri ve kondrositler gibi çok sayıda farklı hücre tipinde yüzlerce genin mRNA ekspresyonunu hızla indükler (Weber vd., 2010). Bu yöntemde FITC anti-human IL-1β Antibody (Biotium, Kat. No: B276958) kullanılmıştır. EPS'ler 5 mg konsantrasyonda uygulanarak 24 saat inkübe edilmiştir sonrasında kokültür hücre grubu 15 mL'lik falkonlara toplanmıştır. Her kuyucuk 1 mL PBS ile yıkanıp falkona aktarılmıştır. Santrifüj sonrası supernatant uzaklaştırılıp, üzerine 500 µl PBS eklenerek, resüspanse edilmiştir. Resüspanse hücreler üzerine 250 µl cytofix/cytoperm solüsyonu eklenerek, 20-30 dakika buzda bekletilmiştir. İnkübasyon ardından santrifüj edilip, pellet 500 µl perm wash ile yıkanmıştır. Sonrasında 500 µl PBS eklenip, pipetaj yapılmıştır. Ependorfa 5 µl IL-1β konulup, üzerine 100 µl hücre eklendikten sonra akış sitometri cihazında (Accuri C6, BD) okunarak analiz edilmiştir.

3.3.5.11. Akış sitometride TNF-α ve IL-10, IL-6, sitokin seviyelerinin belirlenmesi

Bu yöntemde PE anti-human TNF-α (Beckman Coulter LOT:200049), PE anti-human IL-6 (Invitrogen LOT:2489227) ve PE anti-human IL-10 (Invitrogen LOT:

2265361), kiti kullanılmıştır. Ekzopolisakkarit uygulanarak 24 saat inkübe edilmiş kokültür hücre grubu 15 mL'lik falkonlara toplanılmıştır. Her kuyucuk 1 mL PBS ile yıkanıp falkona aktarılmıştır. Santrifüj sonrası supernatant uzaklaştırılıp, üzerine 250 µl PBS eklenerek, resüspanse edilmiştir. Ependorflara her sitokinden 5 µl konulup, üzerine 100 µl resüspanse hücre eklenmiştir. 20 dakika'lık inkübasyon ardından akış sitometri cihazında (Accuri C6, BD) okunarak analiz edilmiştir.

3.3.5.12. Sitotoksite yöntemlerinin istatistiksel analizi.

İstatistiksel değerlendirmeler ve grafiklerin çizimi GraphPad Prizm 9.0 analiz programı kullanılarak yapılmıştır. Analizler sırasında hücre gruplarının % canlılık grafikleri kontrol grubu maksimum değerlendirilerek çizilmiş olup, elde edilen veriler tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak analiz edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık değerleri $p > 0.5$ fark yok, $p < 0.05$ (*) fark var, $p < 0.01$ (**) anlamlı fark var, $p < 0.001$ (***) önemli fark var, $p < 0.0001$ (****) çok önemli fark var olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Kolostrumdan Laktobasil İzolasyonu

Araştırmada Afyonkarahisar Sandıklı Reşadiye Köyü'nden elde edilen kolostrum örneğinden toplam 34 izolat elde edilmiştir. Her bir bakteri örneği MRS agar besiyeri ortamında üretildikten sonra öncelikle Gram ve katalaz özelliğine göre ayırt edilmiştir. 9 bakteri örneği laktobasil olarak seçilmiş ve diğer çalışmalara bu izolatlarla devam edilmiştir.

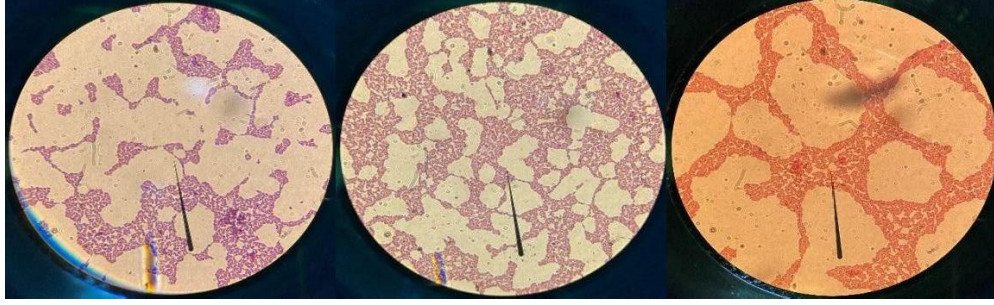


Şekil 4. 1. Kolostrumdan izole edilen LAB örnekleri

4.2. İzolatların Tanımlanması

4.2.1. Gram Boyama sonuçları

İzolasyon sonrası elde edilen 34 LAB izolatından 13 izolatın basil gram pozitif (+) ve katalaz pozitif (+), 4 izolatın basil gram negatif (-) ve katalaz pozitif (+), 9 izolatın basil gram pozitif (+) ve katalaz (-) negatif, 3 izolatın kok ve kokobasil gram negatif (-) ve katalaz pozitif (+), 2 izolatın ise basil gram negatif (-), katalaz negatif (-) olduğu tespit edilmiştir. Deneylere basil gram pozitif (+), katalaz negatif (-) olan 9 izolatla devam edilmiştir.



Şekil 4. 2. Saf izolatların Gram boyama örnekleri

4.2.2. Katalaz Testi

Çalışmada kontrol olarak katalaz pozitif özelliği olan *S.aureus* bakterisi kullanılmıştır. Fotoğraftan görüldüğü gibi *S.aureus* bakterisinde katalaz enziminin varlığı gaz veya hava kabarcıklarına neden olmuştur. 9 adet LAB basil gram pozitif (+) izolatında ise gaz kabarcıkları oluşmamış, katalaz negatif (-) olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4. 3. Katalaz pozitif (+) ve negatif (-) sonucu

Çizelge 4. 1. Elde edilen izolatların kodları ve özellikleri

İzolat örnekleri	Laboratuvar kodları	Gram özelliği	Katalaz özelliği	Morfoloji	Hareketliliği	H ₂ S oluşum
İzolat 1	1.1 (A)E	-	+	kok	-	-
İzolat 2	1.1.1 (A)E	-	+	basil	-	-
İzolat 3	1.1.2 (A)E	+	+	basil	-	-
İzolat 4	1.1.3(AE)	+	-	basil	-	-
İzolat 5	1.1 (A)Y	+	+	basil	-	-
İzolat 6	1.1.1(A)Y	-	-	basil	-	-
İzolat 7	1.1.2(A)Y	-	-	basil	-	-
İzolat 8	1.2.1A(E)	+	-	basil	-	-
İzolat 9	1.2.1(AET)	+	+	basil	-	-

Çizelge 4. 2. (Devam) Elde edilen izolatların kodları ve özellikleri

İzolat 10	1.2.2(AET)	-	+	basil	-	-
İzolat 11	1.2.1(AYT)	+	+	basil	-	-
İzolat 12	1.2.2(AYT)	+	+	basil	-	-
İzolat 13	1.3(AYT)	+	-	basil	-	-
İzolat 14	1.3.4(A)E	+	+	basil	-	-
İzolat 15	1.3.5(A)E	+	+	basil	-	-
İzolat 16	1.4(AET)	+	-	basil	-	-
İzolat 17	1.4.1(A)Y	+	+	basil	-	-
İzolat 18	1.4.2(A)Y	-	+	basil	-	-
İzolat 19	1.4.1(A)E	-	+	basil	-	-
İzolat 20	1.4.2(A)E	-	+	kok	-	-
İzolat 21	1.A.1(AYT)	+	-	basil	-	-
İzolat 22	1.A.1A(Y)	-	+	basil	-	-
İzolat 23	1.A.2A(Y)	+	-	basil	-	-
İzolat 24	2.1.1(AET)	+	+	basil	-	-
İzolat 25	2.1.2(AET)	+	+	basil	-	-
İzolat 26	2.1.3(AET)	+	+	basil	-	-
İzolat 27	2.2.1A(Y)	+	-	basil	-	-
İzolat 28	2.A.1(AET)	-	+	kokobasil	-	-
İzolat 29	2.A.2(AET)	-	+	kokobasil	-	-
İzolat 30	2.2.1(AET)	+	+	basil	-	-
İzolat 31	2.2.2(AET)	-	+	kok	-	-
İzolat 32	2.A.2(AET)	-	+	kokobasil	-	-
İzolat 33	2.A.3(AET)	+	+	basil	-	-
İzolat 34	2.3(AYT)	+	-	basil	-	-

4.3. İzole edilen mikroorganizmaların biyokimyasal aktivite sonuçları

4.3.1. Hidrojen sülfür oluşumunun değerlendirilmesi

Kullanılan bakterilerin kükürt içeren sülfatlar veya aminoasitlerden (sistin, sistein gibi) hidrojen sülfür (H_2S) oluşturup oluşturmadığının değerlendirildiği bir deneydir.

Üç şekerli demir agar testi için aktif bakteri suşları hazırlanmıştır. LAB izolatları yatık TSI agar ortamına ekilmiştir. 2-7 gün inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyonun ardından, tüplerin dibinde siyah renk oluşumu H_2S gazının varlığı açısından negatif (-) olarak değerlendirilmiştir. 9 LAB izolatında TSI'da üreme gözlenmiştir.

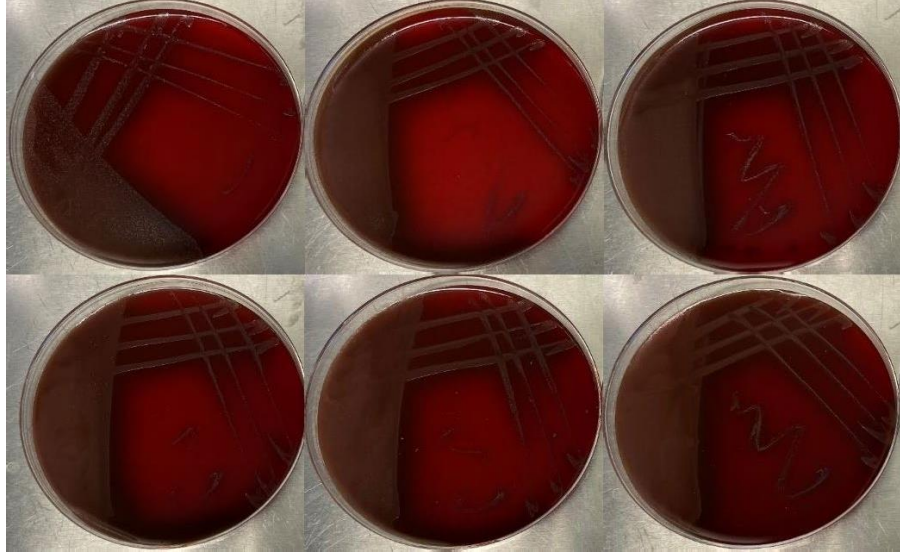


Şekil 4. 4. TSI agarda üreme, hareketlilik ve H_2S oluşumu

4.3.2. İzolatların hemolitik aktivite sonuçları.

Probiyotik özellikli bakterilerde virüent etkinin olup olmadığının kontrolü için ön güvenlik koşulu olarak hemolitik aktivite testi yapılmaktadır (Rogosa vd., 1951). Elde edilen izolatlarının hemolitik aktivitesinin belirlenmesi için, aktif suşlar tek koloni yöntemi ile petrilere ekilmiştir. 24 saat'lik inkübasyon ardından 9 LAB izolatı da zon oluşturmamıştır. Sonuç olarak izolatlar non-hemolitik (γ -hemolitik) olarak değerlendirilmiştir.





Şekil 4. 5. LAB izolatlarının hemolitik aktivite γ -hemolitik izolatların petri görüntüsü

Probiyotik özellikli bakterilerde hemolitik aktivite özelliği olmamalıdır. Hemolisin üretimi enfeksiyonları şiddetlendirdiğinden dolayı probiyotik bakterilerin γ -hemolitik olması gerekmektedir (Upadhyaya vd., 2009).

4.4. LAB İzolatlarının Probiyotik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

Saf olarak izole edilen 9 LAB örneğinin probiyotik özelliklerinin belirlenmesi için aşağıdaki deneyler yapılmıştır.

4.4.1. Bakteri Suşlarının % Koagregasyon Yeteneklerinin Değerlendirilmesi

Bakteri izolatlarının *E.coli* ATTC 35298 ile koagregasyon özellikleri %34-88 arasında bulunmuştur. En yüksek koagregasyon özelliği %88 ile 8 No'lu izolatta tespit edilirken, en düşük koagregasyon özelliği ise %34 ile 4 No'lu izolatta belirlenmiştir. Çizelge 4.2'de gösterildiği gibi LAB suşlarının İzolat 1, izolat 2, izolat 3, izolat 4, izolat 5, izolat 6, izolat 7, izolat 8 ve izolat 9 *E.coli* ATTC 35298 ile koagregasyon yetenekleri sırasıyla %80, %61, %37, %34, %88, %53, %64, %50, %37 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4. 3. Bakteri suşlarının ile % koagregasyon değerleri

Bakteri suşları	%Koagregasyon
İzolat 1	80
İzolat 2	61

Çizelge 4. 4. (Devam) Bakteri suşlarının ile % koagregasyon değerleri

İzolat 3	37
İzolat 4	34
İzolat 5	88
İzolat 6	53
İzolat 7	64
İzolat 8	50
İzolat 9	37

Bakteri izolatlarının *S.aureus* ATCC 25923 ile koagregasyon özellikleri %27-37 arasında değerlendirilmiştir. En yüksek koagregasyon özelliği %37 ile izolat 8’de tespit edilirken, en düşük koagregasyon özelliği ise %27 ile izolat 3’de belirlenmiştir. İzolat 1, izolat 2, izolat 3, izolat 4, izolat 5, izolat 6, izolat 7, izolat 8 ve izolat 9 *S.aureus* ATCC 25923 ile koagregasyon yetenekleri sırasıyla %31, %28, %27, %34, %34, %27, %33, %37, %31 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4. 5. Bakteri suşlarının ile % koagregasyon değerleri

Bakteri suşları	%Koagregasyon
İzolat 1	31
İzolat 2	28
İzolat 3	27
İzolat 4	34
İzolat 5	34
İzolat 6	27
İzolat 7	33
İzolat 8	37
İzolat 9	31

Yapılan birden fazla çalışmada LAB izolatlarının koagregasyon yeteneği tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada *E.coli* ve *S.aureus*’da, tüm laktik asit bakterilerinde

%43,70±0,82'den %52,63±0,93'e kadar koagregasyon yeteneği rapor edilmiştir (Jeong-Eunvd,2020).

4.4.2. Bakteri Suşlarının % Otoagregasyon Değerleri

Probiyotik özellikli bakteriler de otoagregasyon önemli özelliklerden biridir. Otoagregasyon aynı suşa ait bakteriler arasında oluşur. Bu özellik sayesinde patojen bakterilerin bağırsak yüzeyine yapışmasını engellerler (Jankovic vd., 2003).

İzolatların otoagregasyon değerleri %3-19 arasında değerlendirilmiştir. En yüksek otoagregasyon özelliği, %19 ile izolat 3'de tespit edilirken, en düşük otoagregasyon özelliği ise %3 ile izolat 7'de belirlenmiştir.

Çizelge 4. 6. Bakteri suşlarının %otoagregasyon değerleri

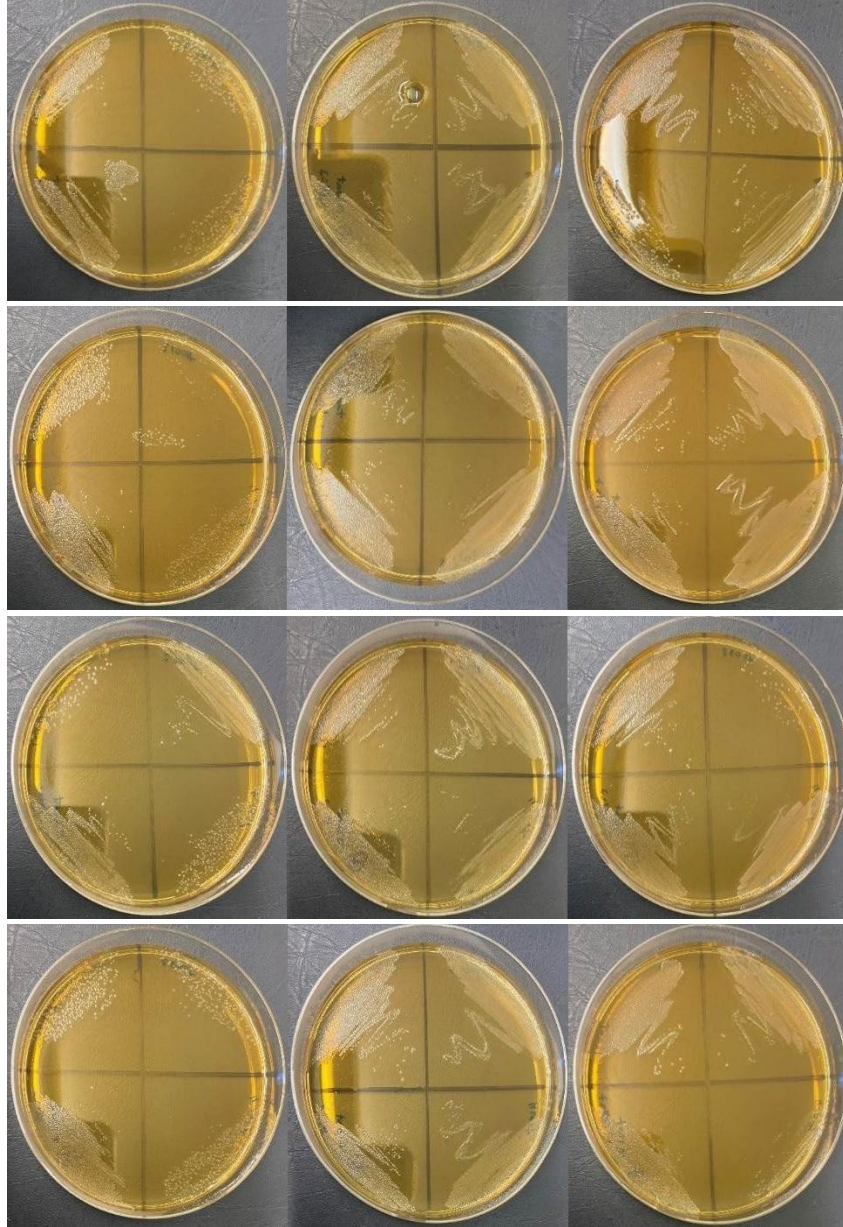
Bakteri suşları	% otoagregasyon
İzolat 1	14
İzolat 2	4
İzolat 3	19
İzolat 4	4
İzolat 5	4
İzolat 6	6
İzolat 7	3
İzolat 8	13
İzolat 9	6.6

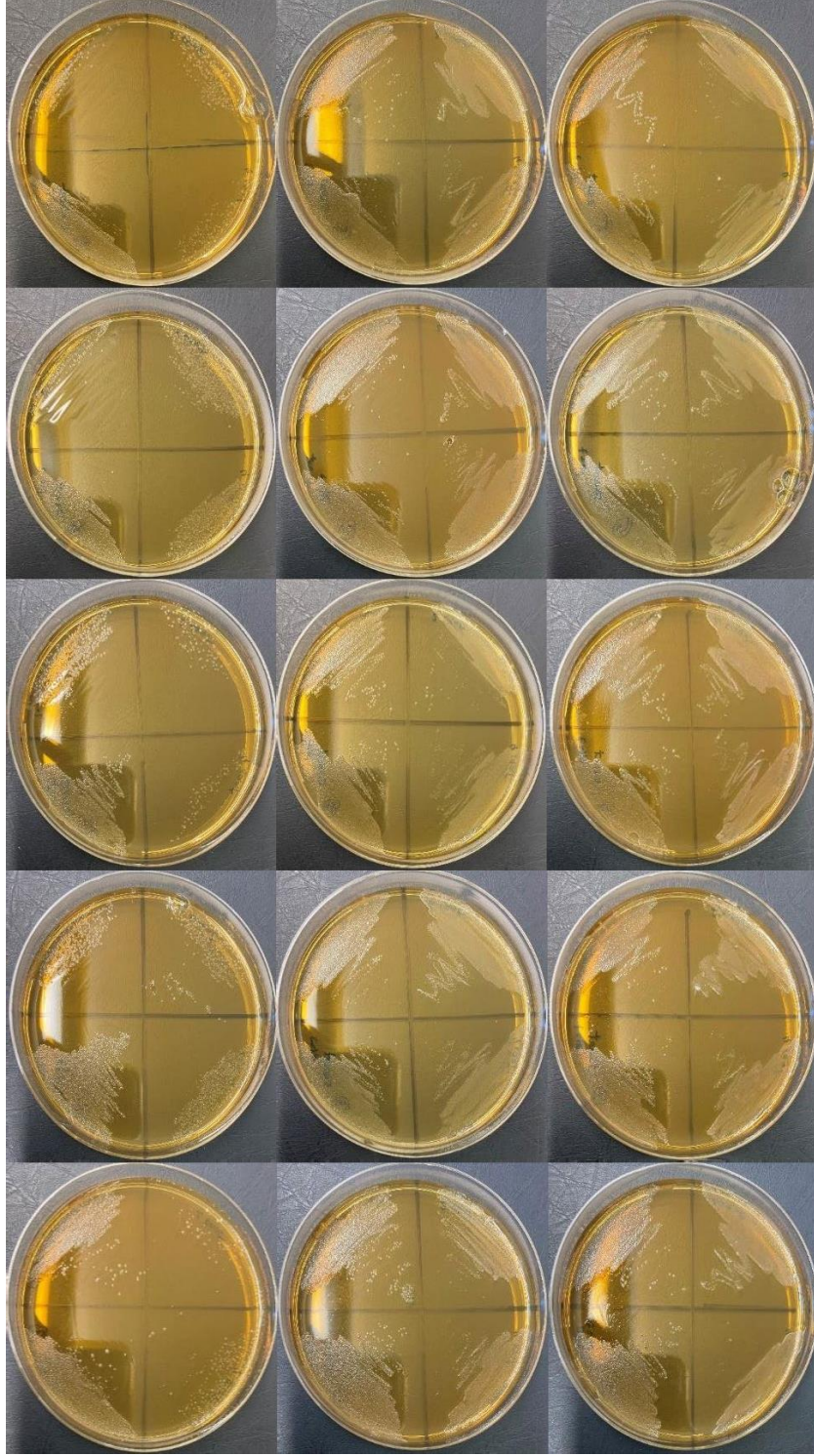
2008 yılında yapılan çalışmada *L. fermentum* ME3 suşunun otoagregasyon özelliği %29,7 ve %70,2 olarak rapor edilmiştir. 2020 yılında Todhanakasem Tatsaporn ve diğerleri yaptıkları çalışmada LAB izolatlarının otoagregasyon değerleri %78-86 arasında olduğu rapor edilmiştir (Todhanakasem, 2020).

4.4.3. Asit direncinin belirlenmesi

Laktik asit bakterilerinin konakçı hücre üzerinde yararlı etki gösterebilmesi için aside ve safra tuzuna karşı dirençli olması gerekmektedir (Todhanakasem, 2020).

Kolostrumdan izole edilen 9 adet LAB izolatu pH 2 ve pH 3 MRS broth ortamına ekim yapılmıştır. Kontrol olarak ise pH 7'ye ayarlanmış petriler kullanılmıştır. Ardından 0. sa, 1. sa, 2. sa ve 4.saatlerde MRS agarlı petrilere ekim yapılmıştır. 9 LAB izolatu da pH 2 ve pH 3 ortamında üreme göstermiştir. Sonuç olarak izolatların asite dayanıklı olduğu belirlenmiştir.





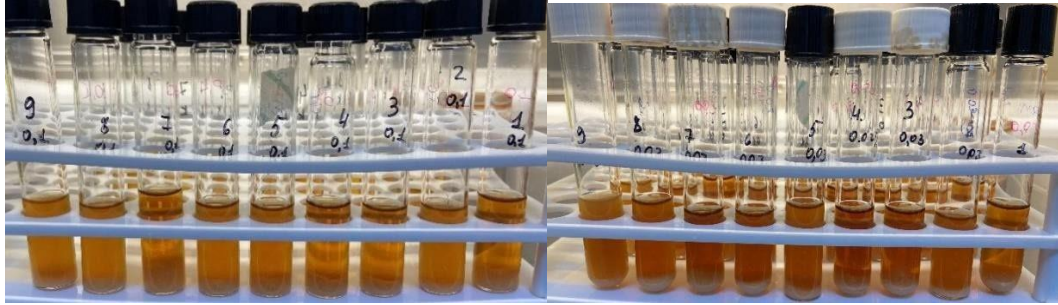
Şekil 4. 6. *pH:2, pH:3 MRS broth asit ortamında ve kontrol ortamı olan pH: 7 MRS broth ortamında 4 saat inkübe edilen LAB izolatlarının 0., 1., 2., 4. saatlerde MRS agarda gelişimleri*

LAB'ların düşük pH ya olan direnci türe bağlıdır (Muñoz-Quezada vd., 2013). 2020 yılında yapılan bir çalışmada kullanılan LAB'lerinin %68,37'sinin pH 2 ve pH 3 asit ortamına karşı dirençli olduğu rapor edilmiştir (Ohn vd., 2020).

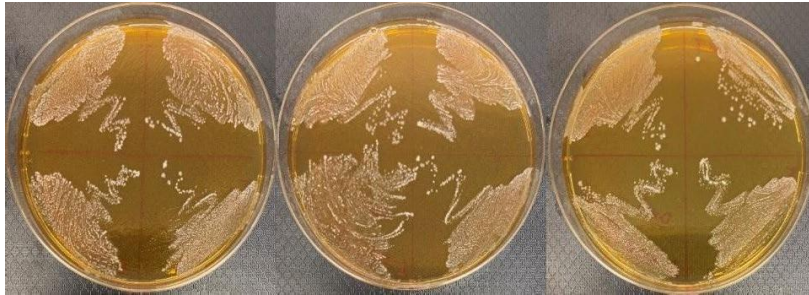
4.4.4. Safra tuzu direncinin belirlenmesi

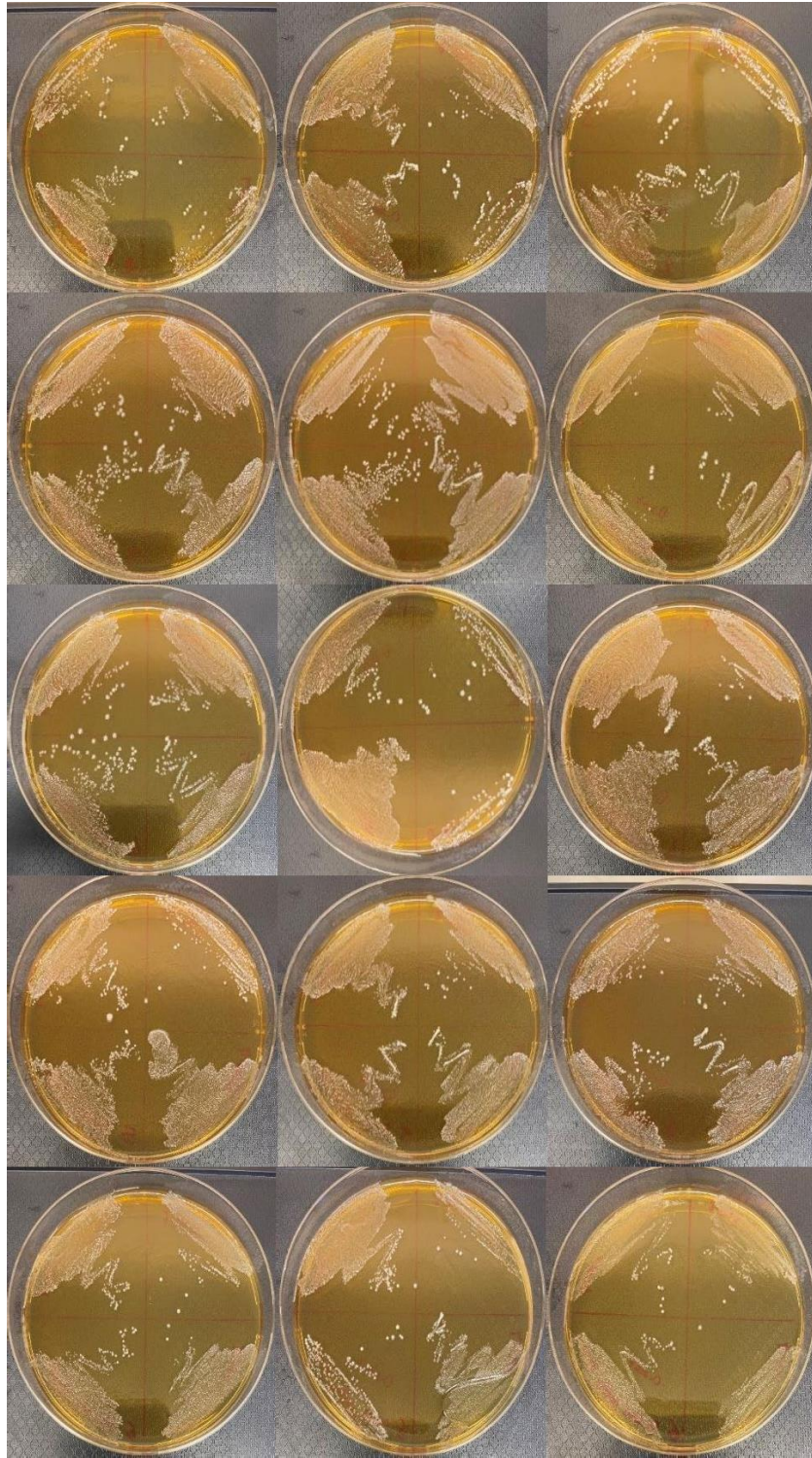
LAB'ların faydalı olması için güçlü asidik mideden ve ardından safranın bulunduğu duodenumdan geçerek hedef organa ulaşması gerekmektedir. Deneyde kullanılan 9 LAB izolatu 2 farklı (%0.1, %0.03) safra tuzu konsantrasyonunda MRS broth besiyerine inoküle edilmiştir. Kontrol olarak ise safra tuzu ilave edilmemiş MRS broth kullanılmıştır. Ardından 0. sa, 1. sa, 2. sa ve 4. saatlerde MRS agarlı petrilere ekim yapılmıştır. Süre sonunda her üç petride üreme görülmüştür. Sonuç olarak kullanılan 9 LAB izolatının %0.1 ve % 0.03 safra tuzuna karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir.

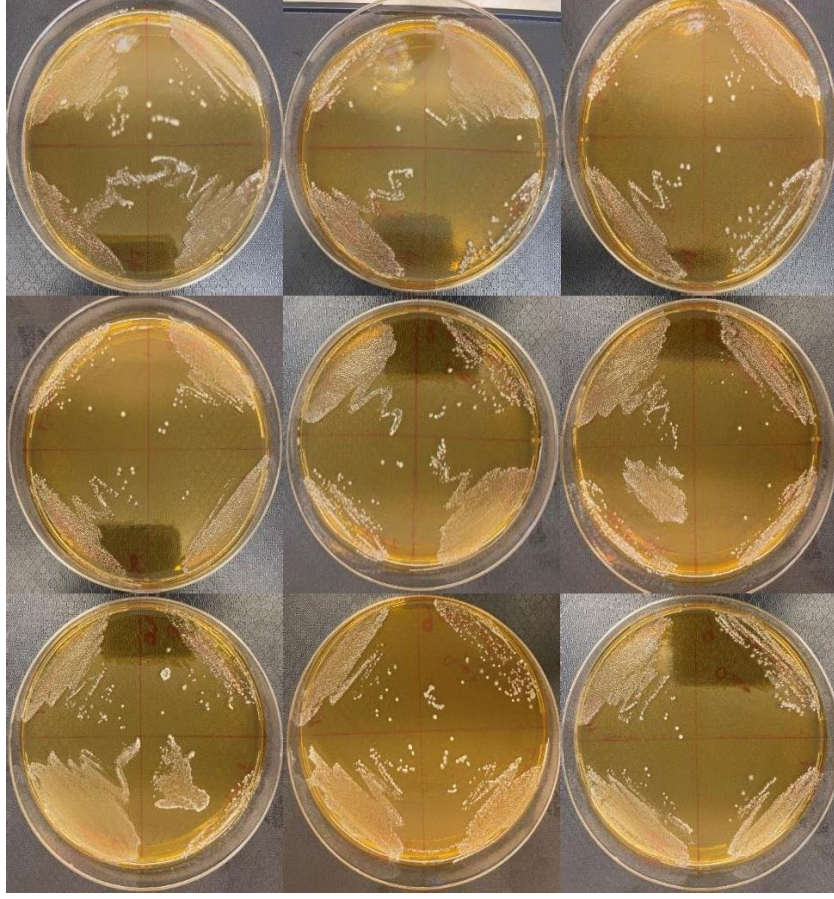
Eman H. Zaghoul ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da *Lactiplantibacillus plantarum* EI6 suşunun safra tuzlarına karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir (Zaghoul, 2022).



Şekil 4. 7. %0.1, %0.0.3 safra tuzu içeren MRS broth ortamında LAB izolatlarının gelişimi







Şekil 4. 8. Kontrol ortamı normal MRS broth ve %0.1, %0.3 safra tuzu içeren MRS broth ortamında 4 saat inkübe edilen LAB izolatlarının 0., 1., 2., 4. saatlerde MRS agarda gelişimleri

2020 yılında yapılan bir çalışmada kullanılan LAB'ların %40'ı %0.3 safra tuzuna direnç göstermiştir (Son vd., 2017; Donald vd., 1990).

4.4.5. LAB'lerinden Ekzopolisakkarit Üretimi

Her bir bakteri türü farklı biyolojik aktivitelere sahip EPS üretme yeteneğine sahiptir (Yılmaz vd., 2011). Kolostrumdan elde edilen 9 laktobasil suşunda EPS üretimi 97-177 mg arasında bulunmuştur. Suşlar içinde en yüksek EPS üretimi (177 mg) izolat 5'de bulunurken, en düşük ise (97mg) izolat 1'de tespit edilmiştir. Elde edilen EPS miktarları hücre kültüründe deneylerde kullanılmıştır.



Şekil 4. 9. Safizolatlardan elde edilen ekzopolisakkarit örnekleri

EPS izolasyonu ve biyosentezi üzerine çok fazla çalışma yapılmıştır. Özellikle EPS'lerin antikanser aktivitesi üzerinde çalışmalar yoğun ilgi görmüştür. 2010 yılında *Lactobacillus acidophilus* 606 suşunda elde edilen EPS'in kolon kanseri üzerinde etkisine bakılmıştır (Y. Kim vd., 2010). *Lactiplantibacillus plantarum* EI6'dan 270 mg/L, anne sütünden izole edilen *L. rhamnosus* suşundan 461-737 mg/L, deve sütünden izole edilen *L. plantarum* ve *L. paraplantarum* suşundan ise toplam 1,4-2,97 g/L EPS elde edilmiştir.

4.4.6. Antibakteriyal aktivite tayini

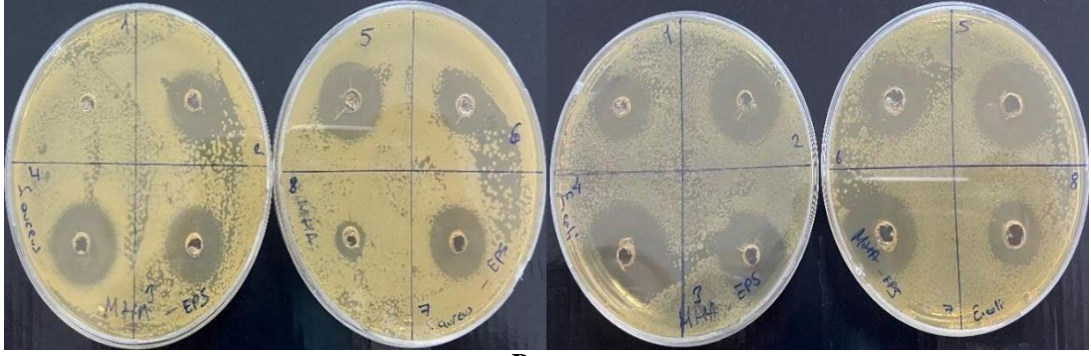
4.4.6.1. Agar kuyucuk difüzyon

Probiyotik bakterilerin gastrointestinal sistemde kolonize olabilmesi için patojen bakterileri yok etmesi gerekmektedir. LAB'ları bağırsaktaki zararlı ve patojen bakterileri yok edecek önemli antimikrobiyal maddeler üretmektedir.

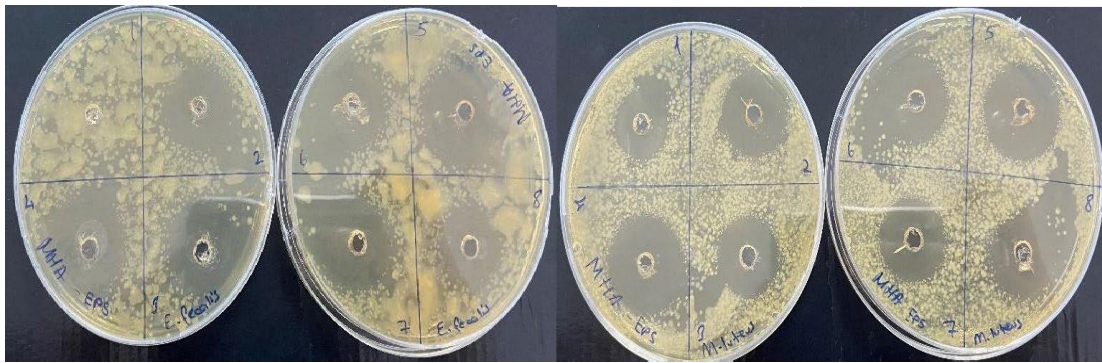
Çizelge 4.5'de kolostrumdan elde edilen 9 LAB bakterisinin 5 patojen bakteriye karşı (*S. epidermidis*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *M.luteus*, *E. coli*) antibakteriyal aktivitesi gösterilmiştir. İzolat 1 *E. faecalis* ve *S. aureus* bakterilerine karşı zon oluşturmamıştır. Tüm LAB liyofilize ekzopolisakkaritleri patojen bakterilere karşı zon oluşturmuştur. Zon çapları 11-30 mm arasında değişiklik göstermiştir. En düşük zon çapının (11 mm) İzolat 8'de *S.aureus* patojenine karşı olduğu rapor edilmiştir. En büyük zonlar ise izolat 5'de görülmüştür.

Çizelge 4. 7. LAB liyofilize ekzopolisakkaritlerinin üzerinde oluşturduğu zon çapları

	Bakteri örnekleri	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>M.luteus</i>	<i>E.fecalis</i>	<i>E.coli</i>
1	İzolat 1	Dirençli	15	24	Dirençli	20
2	İzolat 2	19	23	24	24	25
3	İzolat 3	22	22	21	26	21
4	İzolat 4	23	28	27	28	30
5	İzolat 5	23	23	26	30	26
6	İzolat 6	18	17	25	20	21
7	İzolat 7	18	18	23	24	23
8	İzolat 8	11	16	23	18	17
9	İzolat 9	18	17	24	26	23



A B
Şekil 4. 10. LAB liyofilize ekzopolisakkaritlerinin *S.aureus* (A) ve *E.coli* (B) test bakterileri üzerinde antibakteriyal etkisi



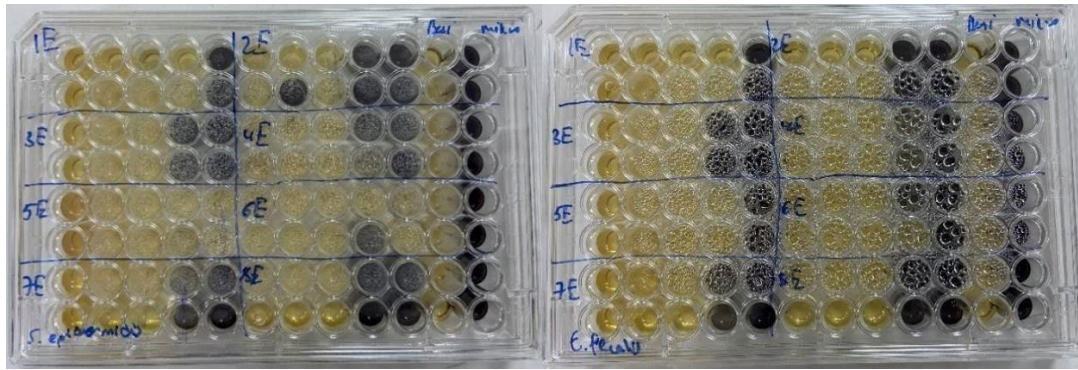
A B
Şekil 4. 11. LAB liyofilize ekzopolisakkaritlerinin *E.fecalis* (A) ve *M.luteus* (B) test bakterileri üzerinde antibakteriyal etkisi

4.4.6.2. Mikrobroth dilüsyon yöntemi

Mikrobroth dilüsyon yöntemi ile 9 LAB suşunun 5 patojen bakteriye karşı (*S. epidermidis*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *M.luteus*, *E. coli*) antibakteriyal aktivitesi belirlenmiştir. Başlangıç konsantrasyonu 20 mg olan seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Üremenin olmadığı en son kuyucuktaki konsantrasyon Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değeri olarak belirlenmiştir. Plakalarda 12.sıra mikroorganizma kontrolü olarak kullanılmıştır. Çizelge 4.6’da izolatların 24 ve 48 saat’lik antibakteriyal aktivite sonuçları rapor edilmiştir.

Çizelge 4. 8. LAB izolatlarının patojen bakterileri üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi (mg/mL)

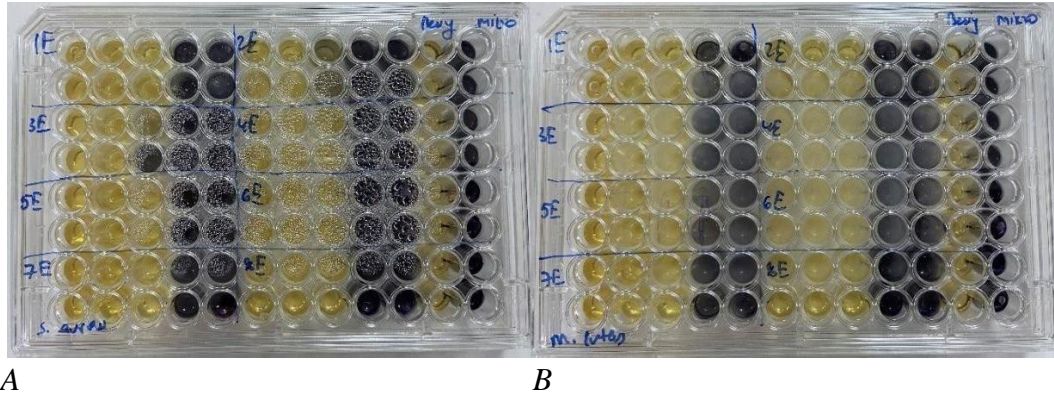
	Bakteri örnekleri	<i>E.coli</i> 24s	<i>E.coli</i> 48s	<i>S.aure</i> 24s	<i>S.aure</i> 48s	<i>M.lut</i> 24s	<i>M.lut</i> 48s	<i>E.fec</i> 24s	<i>E.fec</i> 48s	<i>S.epid</i> 24s	<i>S.epid</i> 48s
1	İzolat 1	2500	5000	5000	10.000	5000	5000	2500	2500	2500	2500
2	İzolat 2	5000	10.000	5000	10.000	5000	5000	5000	5000	5000	5000
3	İzolat 3	5000	10.000	5000	10.000	5000	10.000	5000	5000	5000	5000
4	İzolat 4	2500	5000	5000	10.000	5000	5000	2500	5000	2500	5000
5	İzolat 5	2500	5000	5000	10.000	5000	5000	2500	2500	1250	1250
6	İzolat 6	2500	5000	5000	10.000	5000	5000	2500	5000	1250	1250
7	İzolat 7	5000	5000	5000	10.000	5000	10000	5000	5000	5000	5000
8	İzolat 8	5000	5000	5000	10000	5000	5000	5000	2500	5000	5000
9	İzolat 9	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000



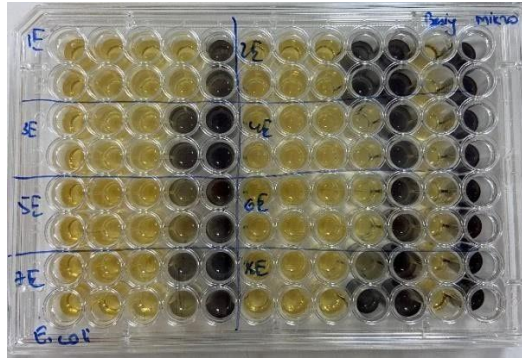
A

B

Şekil 4. 12. LAB liyofilize ekzopolisakaritlerinin mikrobroth dilüsyon metodu ile *S.epidermidis*(A) ve *E.fecalis*(B) test bakterileri üzerinde antibakteriyal etkisi



Şekil 4. 13. LAB liyofilize ekzopolisakkaritlerinin mikrobrot dilüsyon metodu ile *S.aureus*(A) ve *M.luteus*(B) test bakterileri üzerinde antibakteriyal etkisi



Şekil 4. 14. LAB liyofilize ekzopolisakkaritlerinin mikrobrot dilüsyon metodu ile *E.coli* üzerinde antibakteriyal etkisi

4.4.7. Bakteri Suşlarının Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi

İnsan vücudunu serbest radikallerden koruyabilmesi ve birçok kronik hastalığın ilerlemesini geciktirebilmeleri için doğal ve etkili antioksidanların geliştirilmesi oldukça önemlidir. LAB'ların ürettikleri organik asitlerin, antioksidan aktiviteyi artırdıkları, serbest radikal oluşumunu azalttıkları tespit edilmiştir (Cheng vd., 2009).

Kullanılan laktobasil suşlarının antioksidan aktiviteleri %82.93-84.6 arasında tespit edilmiştir. En yüksek antioksidan aktivite, %84.61 ile izolat 1 ve izolat 5'de tespit edilirken, en düşük antioksidan aktivite ise %82.93 ile izolat 6'da belirlenmiştir.

Çizelge 4. 9. LAB izolatlarının % antioksidan aktivitesi

	Örnekler	% Antioksidan
1	İzolat 1	84.61

Çizelge 4. 10. (Devam) LAB izolatlarının % antioksidan aktivitesi

2	İzolat 2	83.61
3	İzolat 3	84.28
4	İzolat 4	84.28
5	İzolat 5	84.61
6	İzolat 6	82.93
7	İzolat 7	83.27
8	İzolat 8	82.94
9	İzolat 9	82.94

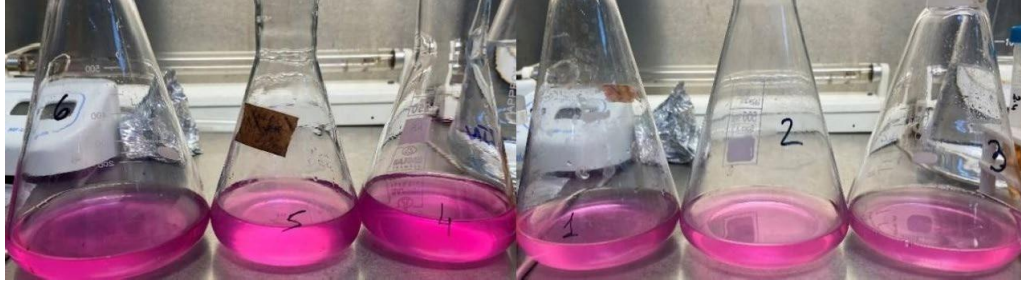
Antioksidan özelliklerinden dolayı LAB ile ilgili araştırmalar oldukça artmıştır. Örneğin; *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* ve *Enterococcus durans* LAB 18 cinsine ait bakteriler DPPH ve 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) serbest radikallerini azalttığı rapor edilmiştir (Cizeikiene vd., 2021). 2009 yılında yapılan çalışma da *L. rhamnosus* BCRC16000 suşunun antioksidan aktivitesi %84.7 olarak tespit edilmiştir (Liu vd., 2009).

4.4.8. Laktik asit üretim miktarının belirlenmesi

Laktik asit üretimi miktarlarına göre; İzolat 6, izolat 7 ve izolat 8 sırasıyla %2,43, 2,385 ve 2,25, diğer 6 izolatlarda ise % 2,7 NaOH harcanmıştır. En düşük laktik asit üretimi izolat 9'da tespit edilmiştir.

Çizelge 4. 11. LAB izolatlarının % Laktik asit üretimi

	LAB izolatları	Kültür miktarı	Kullanılan NaOH	%
1	İzolat 1	100	300	2,7
2	İzolat 2	100	300	2,7
3	İzolat 3	100	300	2,7
4	İzolat 4	100	300	2,7
5	İzolat 5	100	300	2,7
6	İzolat 6	100	270	2,43
7	İzolat 7	100	265	2,38
8	İzolat 8	100	300	2,7
9	İzolat 9	100	250	2,25



Şekil 4. 15. Laktik asit tayini deneyi titrasyon sonucu renk oluşumu

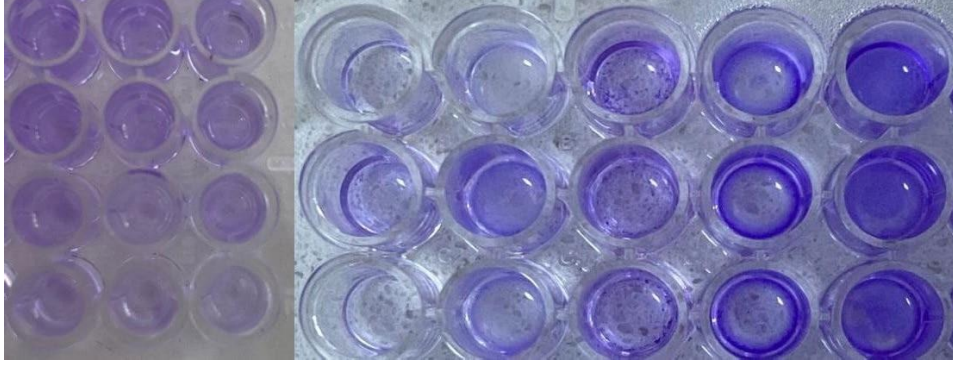
4.4.9. Biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi

Biyofilm bakterileri antibiyotiklere karşı daha dirençli hale getirdiği için önemli bir özelliktir (https-3). Laktik asit bakterilerinde biyofilm oluşturma özelliğinin tespit edilmesi için mikropilaka yöntemi uygulanmıştır. Çalışma 8 paralel olarak yapılmıştır. LAB izolatları arasında 6 izolat orta, 3 izolat zayıf ve 1 izolat biyofilm oluşturma yeteneğine göre güçlü olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.9. LAB izolatları ve *E. faecalis* 51299 suşlarının biyofilm oluşturma yetenekleri

İzolat kodu	Optik dansite değer aralığı	Optik dansite ortalaması	Biyofilm oluşumu
İzolat 1	0,132-0,378	0,268	Zayıf
İzolat 2	0,197-0,468	0,418	Orta
İzolat 3	0,146-0,353	0,238	Zayıf
İzolat 4	0,134-0,312	0,256	Zayıf
İzolat 5	0,47-0,848	0,647	Güçlü
İzolat 6	0,539-0,62	0,589	Orta
İzolat 7	0,311-0,708	0,514	Orta
İzolat 8	0,34-0,555	0,433	Orta
İzolat 9	0,466-0,612	0,468	Orta
<i>E. faecalis</i>	0,344-0,388	0,345	Orta

Yapılan çalışmalar sonucu LAB'lar içerisinde en iyi biyofilm oluşturma yeteneği *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103)'da görülmüştür (Salas vd., 2016).



Şekil 4. 16. 96'lı kuyucukda biyofilm görüntüsü

4.4.10. Antibiyotik direnç testi

Bazı antibiyotiklere direnç gösterme yeteneği probiyotik bakteriler için önemli kriterlerdendir. Özellikle, antibiyotik tedavisinden sonra bağırsak dengesini ve sağlıklı bir ortamı yeniden sağlamak için yardımcı olabilirler. Antibiyotik direnci hücre duvarı yapısına, membran geçirgenliğine ve akış mekanizmalarına bağlıdır (Huys vd., 2013).

LAB'ların antibiyotik dirençliliğinin belirlenmesinde mikrobrot dilüsyon yöntemi kullanılmıştır.

24 saat'lik inkübasyon sonrası plakalara MTT boyası verilmiştir. Üreme olan kuyucuklar mor, üremenin olmadığı kuyucuklar ise sarı renke boyanmıştır. İzolat 1, izolat 2, ve izolat 6'nın Streptomisin 0.5 ve 1.125 µg/mL konsantrasyonlarda dirençli olduğu tespit edilmiştir. İzolat 1 ve izolat 2 diğer bakterilerden farklı olarak Penisilin G 0.5 µg/mL dozunda dirençli olmuştur. İzolat 4, izolat 5 ve izolat 7 streptomisin 0.5-2.25 µg/mL dozlarında etkili çıkmıştır. 9 laktik asit bakterisinde de cefamezine karşı duyarlı olduğu gözlemlenmiştir. Tüm bakteriler vancomycin 0.5, 1.125, 2.25, 4.5, 9, 18 ve 36 µg/mL dozlarında dirençli olduğu görülmüştür. İzolat 1, izolat 2 ve izolat 8'de 0.5, 1.125, 2.25, 4.5 ve 9 µg/mL dozlarda, İzolat 3, izolat 4, izolat 5, izolat 6, izolat 7 ve izolat 9 ise 0.5, 1.125, 2.25, 4.5, 9 ve 18 µg/mL konsantrasyonlarda etkili çıkmıştır.

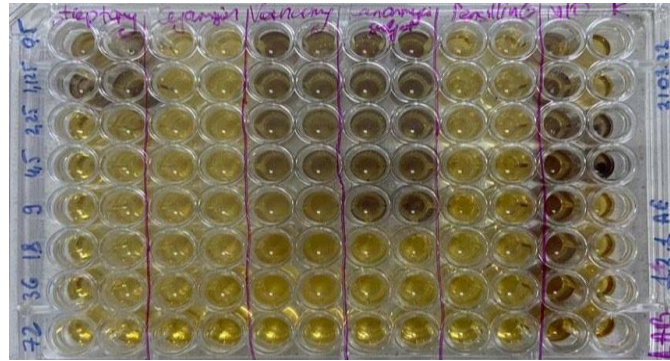
Çizelge 4. 10. LAB izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları (-: üremenin olmadığını, R: dirençli olduğunu belirtmektedir)

Bakteriler	Streptomisin	Cefamezin	Vancomycin	Kanamisin sulfat	Penisilin G
İzolat 1	2.25	-	72	18	1.125
İzolat 2	2.25	-	72	18	1.125

Çizelge 4. 10. (Devam) LAB izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları (-: üremenin olmadığını, R: dirençli olduğunu belirtmektedir)

İzolat 3	2.25	-	72	18	-
İzolat 4	4.5	-	72	36	-
İzolat 5	4.5	-	72	36	-
İzolat 6	2.25	-	72	36	-
İzolat 7	4.5	-	72	36	-
İzolat 8	2.25	-	72	18	-
İzolat 9	2.25	-	72	36	-

Hangshenas ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda Lactobacilli'lerin genellikle Vancomycine karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Vancomycin klinik enfeksiyonlarına neden olan patojen bakterilere karşı en etkili antibiyotiktir (Nami vd., 2014).



Şekil 4. 17. Antibiyotik duyarlılıkları

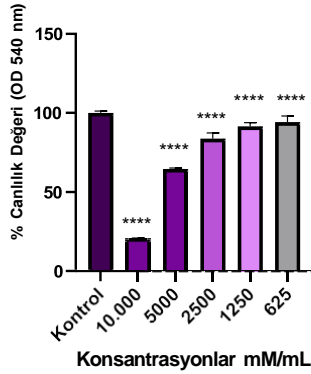
4.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

4.5.1. MTT yöntemi ile HepG-2 hücrelerinde ekzopolisakkaritlerin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi.

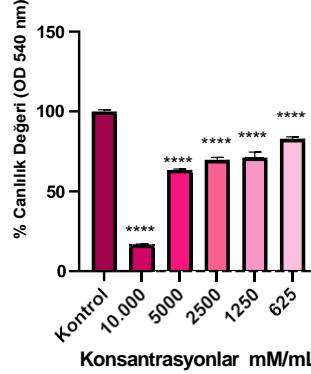
HepG-2 hücreleri, EPS'lerin 10, 5, 2.5, 12,5, 6.25 mg/mL konsantrasyonları ile 24 saat inkübasyona bırakılmıştır, süre sonunda EPS'lerin HepG-2 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Kontrol ve konsantrasyon verilmiş

gruplar ELİZA (Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Yöntemi) cihazında 540 nm dalga boyunda değerlendirilmiştir. Kontrol grubunun absorbans değeri %100 kabul edilerek, her bir örneğin % hücre canlılığı Microsoft Office Excel % programında hesaplanmıştır. Sonrasında veriler GraphPad Prism 9.0 programına aktarılarak, grafikler oluşturulmuştur.

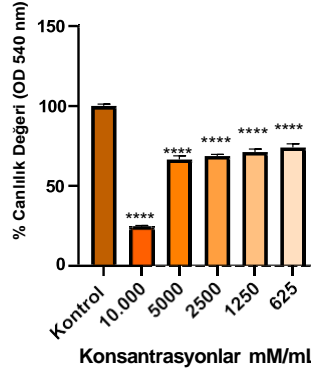
1 No'lu LAB ekzopolisakkaritinin HepG-2 üzerindeki sitotoksik etkisi



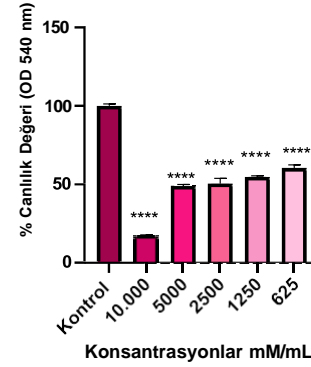
3 No'lu LAB ekzopolisakkaritinin HepG-2 üzerindeki sitotoksik etkisi



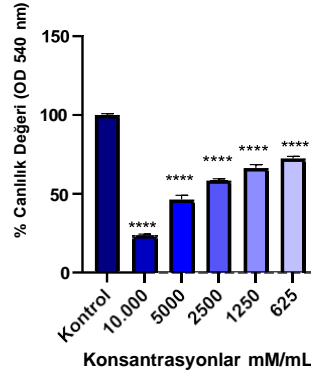
4 No'lu LAB ekzopolisakkaritinin HepG-2 üzerindeki sitotoksik etkisi



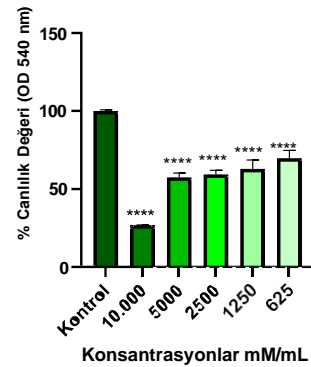
5 No'lu LAB ekzopolisakkaritinin HepG-2 üzerindeki sitotoksik etkisi



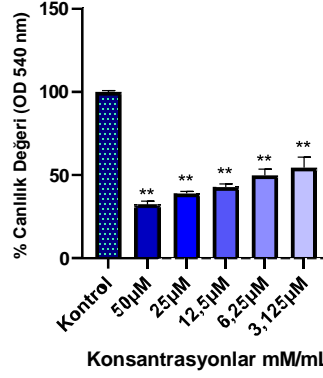
8 No'lu LAB ekzopolisakkaritinin HepG-2 üzerindeki sitotoksik etkisi



9 No'lu LAB ekzopolisakkaritinin HepG-2 üzerindeki sitotoksik etkisi



Doksorubisin HepG-2 Üzerindeki Sitotoksik Etkisi



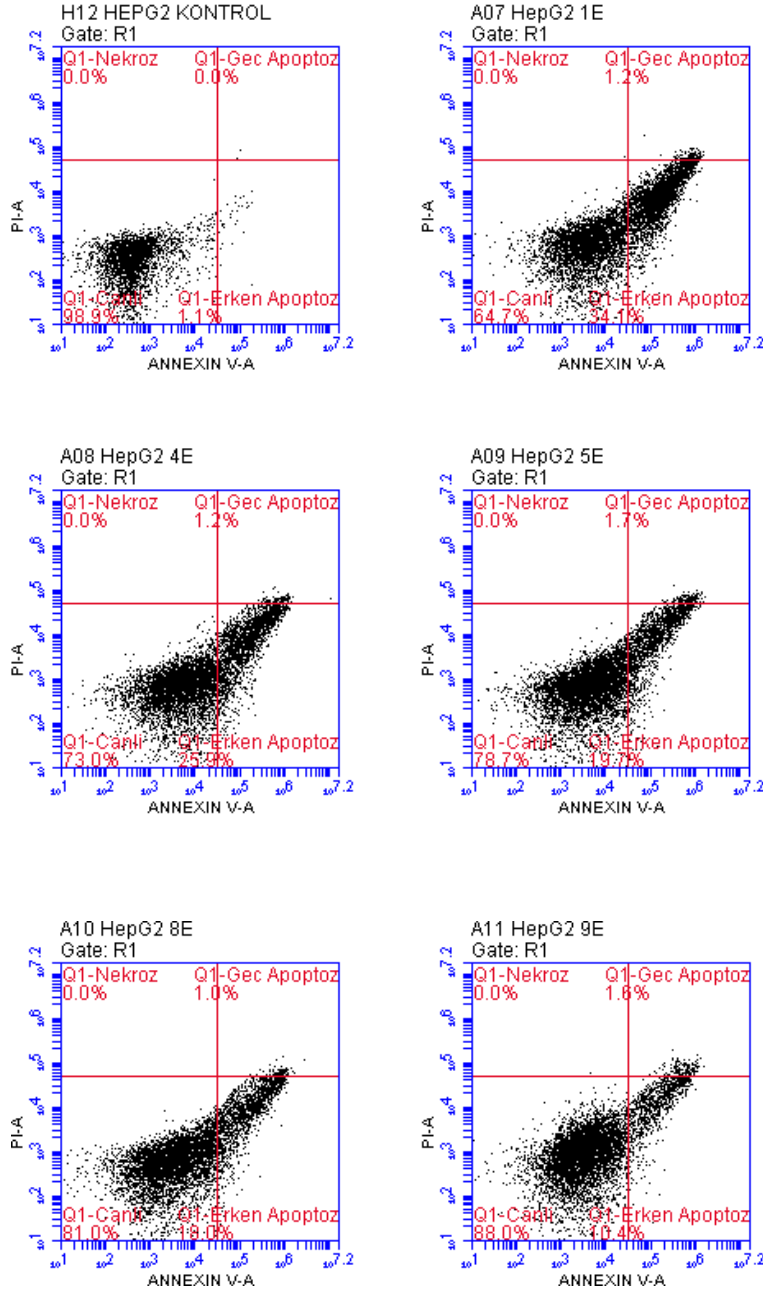
Şekil 4.18. Liyofilize EPS'lerin ve doksorubisinin HepG-2 hücre hattı üzerindeki % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (**** $p < 0.0001$ $n=8$)

Çizelge 4.11. Liyofilize ekzopolisakkaritlerin IC_{50} değerleri (mg/mL)

İzolat kodları	IC_{50} Konsantrasyonları, mg/mL
1	6.5
3	5.5
4	6.01
5	3.02
8	4.5
9	5.1

4.5.2. Akış sitometride Annexin V-PI yöntemi ile apoptotik etkinin değerlendirilmesi

6'lı kuyucuklara 1×10^5 sayıda HepG-2 hücreleri ekildikten sonra 5 mg/mL konsantrasyonda farklı ekzopolisakkaritler uygulanmıştır. 24 saat'lik inkübasyon sonrası plakalara 'Annexin-V Fitc Apoptosis Detection Kit (Katalog no: 181273, BD)' protokolü uygulanmıştır. Örnekler akış sitometri cihazında okutularak analiz edilmiştir.



Şekil 4. 19. Liyofilize LAB EPS'lerinin HepG-2 hücre hattındaki apoptotik etkisinin Annexin-V – PI yöntemi ile akış sitometride değerlendirilmesi

Çizelge 4.12.. Liyofilize ekzopolisakkaritlerin HepG-2 hücre hattındaki apoptotik etkisinin belirlenmesi.

Maddeler	Canlı hücre %	Nekrotik hücre%	Erken Apoptotik hücre %	Gec Apoptotik hücre %	Toplam Apoptotik Hücre %
Kontrol	98.9	0.0	1.1	0.0	1.1

Çizelge 4.12.(Devam). *Liyofilize ekzopolisakkaritlerin HepG-2 hücre hattındaki apoptotik etkisinin belirlenmesi.*

1	64.7	0.0	34.1	1.2	35.3
4	73.0	0.0	25	1.2	26.2
5	78.7	0.0	19.6	1.7	21.3
8	81.0	0.0	18.0	1.0	19.0
9	88.0	0.0	1.6	10.4	12.0

En fazla erken apoptotik hücre ölümü, %34.1 ile izolat 1'den elde edilmiş ekzopolisakkarit uygulanmış hücrelerde tespit edilmiştir. Nekrotik hücre ölümü 5 farklı ekzopolisakkaritde de tespit edilmemiştir. En fazla geç apoptotik hücre ölümü %10.4 ile izolat 9'dan elde edilen liyofilize ekzopolisakkarit konsantrasyonuna maruz kalan hücrelerde tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre; Annexin-V-PI ile boyanan HepG-2 hücrelerinde kontrol grubunun canlı hücreleri %98,9; iken nekroza uğrayan hücreler %0, geç apoptoza uğrayan hücrelerin ise %0 ve erken apoptozda ise %1.1 olarak bulunmuştur.

HepG-2 hücrelerinin 24 saat izolat 1'den elde edilen liyofilize EPS ile inkübe edilmesi sonucu canlı hücrelerin toplam hücrelerin %64.7 iken nekroza uğrayan hücreler %0, erken apoptoza uğrayan hücreler %34.1 ve geç apoptoza uğrayan hücreler ise %1.2' dir. Bu durumda apoptotik hücreler toplam hücrelerin %35,3'ünü oluşturmaktadır.

HepG-2 hücrelerinin 24 saat izolat 4'dem elde edilen liyofilize EPS ile inkübe edilmesi sonucu canlı hücrelerin toplam hücrelerin %73.0 iken nekroza uğrayan hücreler %0, erken apoptoza uğrayan hücreler %25 ve geç apoptoza uğrayan hücreler ise %1.2' dir. Bu durumda apoptotik hücreler toplam hücrelerin %26.2'ini oluşturmaktadır.

HepG-2 hücrelerinin 24 saat izolat 5'den elde edilen liyofilize EPS ile inkübe edilmesi sonucu canlı hücrelerin toplam hücrelerin %78.7 iken nekroza uğrayan hücreler %0, erken apoptoza uğrayan hücreler %19.6 ve geç apoptoza uğrayan hücreler ise %1.7' dir. Bu durumda apoptotik hücreler toplam hücrelerin %21,3'ünü oluşturmaktadır.

HepG-2 hücrelerinin 24 saat izolat 8'den elde edilen liyofilize EPS ile inkübe edilmesi sonucu canlı hücrelerin toplam hücrelerin %81.0 iken nekroza uğrayan hücreler %0, erken apoptoza uğrayan hücreler %18 ve geç apoptoza uğrayan hücreler ise %1.0' dir. Bu durumda apoptotik hücreler toplam hücrelerin %19.0'ını oluşturmaktadır.

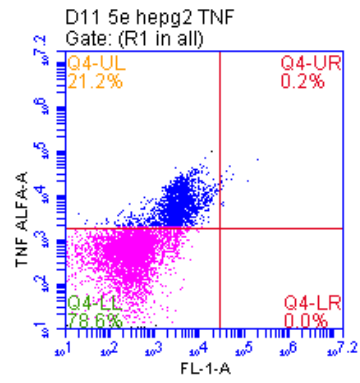
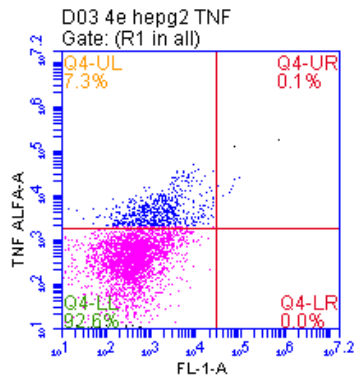
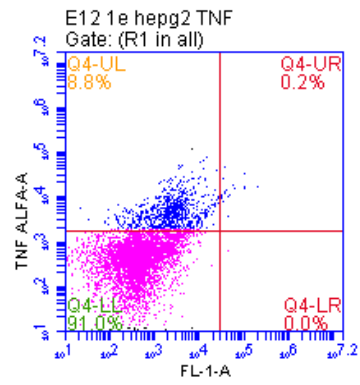
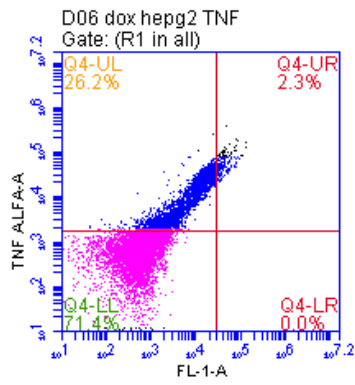
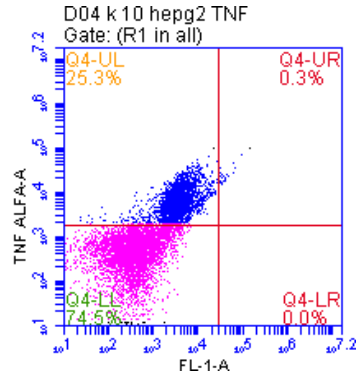
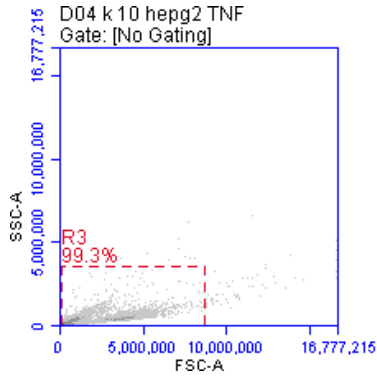
HepG-2 hücrelerinin 24 saat izolat 9'dan elde edilen liyofilize EPS ile inkübe edilmesi sonucu canlı hücrelerin toplam hücrelerin %88 iken nekroza uğrayan hücreler %0, erken apoptoza uğrayan hücreler %1.6 ve geç apoptoza uğrayan hücreler ise %10.4' dir. Bu durumda apoptotik hücreler toplam hücrelerin %12,0'ını oluşturmaktadır.

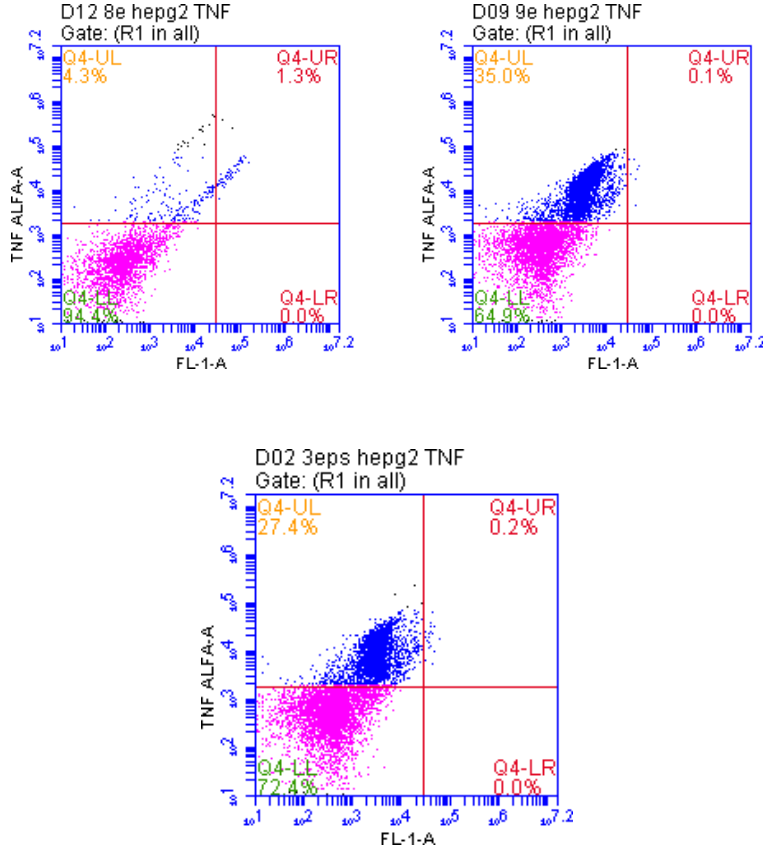
2017 yılında yapılan araştırmada Akdeniz'den izole edilen *Bacillus flexus* elde edilen EPS'in HepG-2 hücre hattında antiproliferatif etkisi olduğu tespit edilmiştir (Salma vd., 2017).

4.5.3. Akış sitometride sitokinlerin (IL-1-beta, IL-6,IL-10, TNF) seviyelerinin değerlendirilmesi

HepG-2 ve THP-1 hücrelerinden kokültür modelinin oluşturulmasından sonra hücrelere 5 mg/mL konsantrasyonda farklı ekzopolisakkaritler hücrelere verilmiştir. Daha sonrasında hücreler 24 saat'lik inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda, hücreler kaldırılarak hücre içi (IL-1beta) ve hücre dışı (TNF, IL-6, IL-10) sitokin seviyeleri akış sitometri cihazında okutulmuş ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

Akış sitometri cihazı kullanılarak ölçülen değerlere göre HepG-2 hücrelerinin kontrol grubunda 100 ng/mL LPS uygulanmış ve TNF- α seviyesi %25.3 olarak bulunmuştur. İzolat 1'den elde edilen liyofilize EPS uygulanmış ko-kültür modelinde TNF- α seviyesi %8.8'e düşerek ve 2.87 kat azalmıştır. İzolat 4'den elde edilen liyofilize EPS uygulanmış ko-kültür modelinde TNF- α seviyesi %7.3'e düşerek ve 3.46 kat azalmıştır. İzolat 5'den elde edilen liyofilize EPS uygulanmış ko-kültür modelinde TNF- α seviyesi 21.2'ye düşmüş ve 1.19 kat azalmıştır. İzolat 8'den elde edilen liyofilize EPS uygulanmış ko-kültür modelinde TNF- α seviyesi 4.3'e düşmüş ve 5.88 kat azalmıştır. İzolat 9'dan elde edilen liyofilize EPS uygulanmış ko-kültür modelinde TNF- α seviyesi %35'e yükselerek, 1.38 kat artmıştır. Doksorubisin ile muamele edilen ko-kültür modelinde TNF- α seviyesi %26.2 olup , 1.03 kat artmıştır.

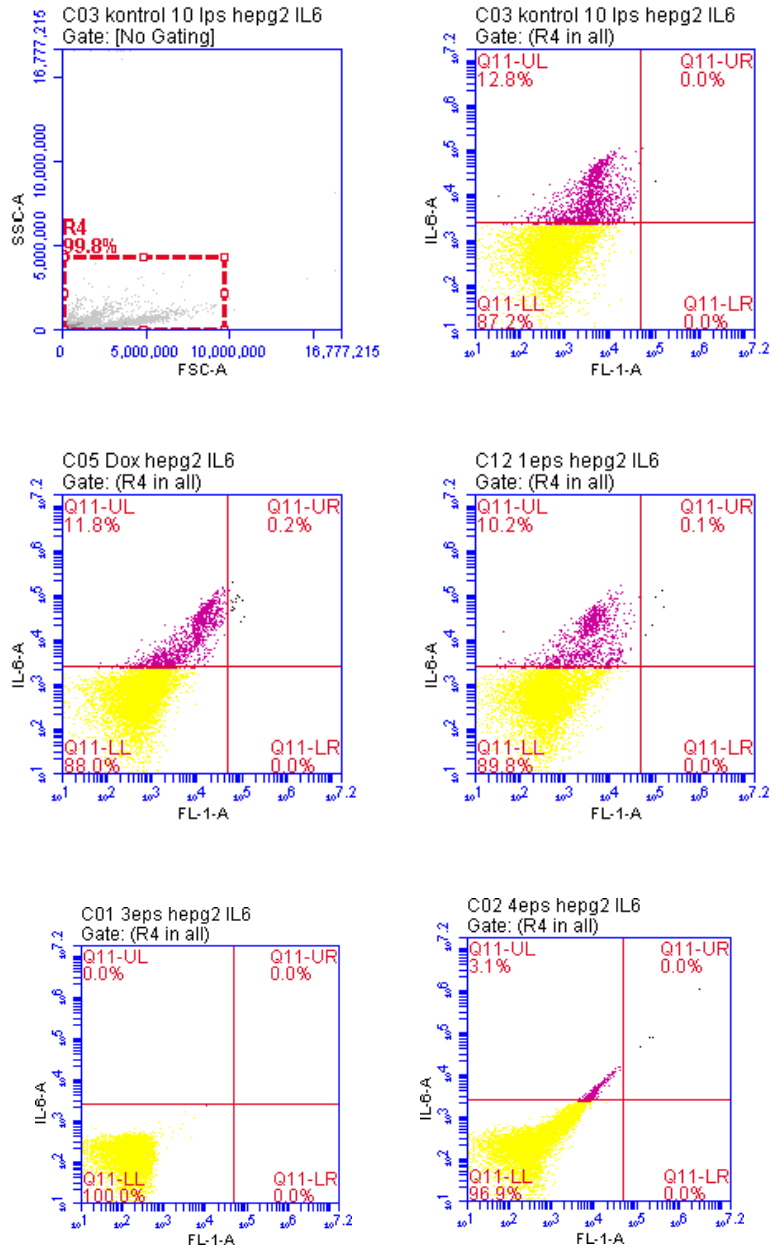


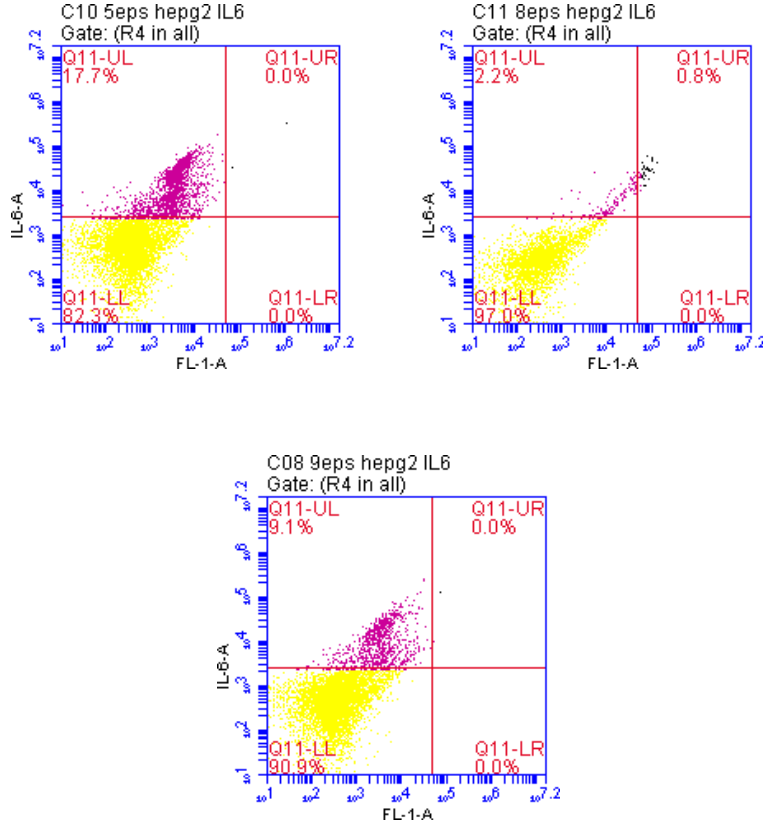


Şekil 4. 20. *Liyofilize LAB EPS'lerinin HepG-2 hücre hattındaki TNF sitokin miktarını akış sitometride değerlendirmesi*

Akış sitometri cihazı kullanılarak ölçülen değerlere göre HepG-2 hücrelerinin kontrol grubunda 100 ng/mL LPS uygulanmış ve IL-6 seviyesi %12.8 olarak bulunmuştur. İzolat 1'den elde edilen liyofilize EPS uygulanmış ko-kültür modelinde IL-6 seviyesi %10.2'e düşerek, 1.25 kat azalmıştır. İzolat 3'den elde edilen liyofilize EPS uygulanmış ko-kültür modelinde IL-6 seviyesinde değişiklik bulunmamıştır. İzolat 4'den elde edilen liyofilize EPS uygulanmış ko-kültür modelinde IL-6 seviyesi %3.1'e düşerek, 4.12 kat azalmıştır. İzolat 5'den elde edilen liyofilize EPS uygulanmış ko-kültür modelinde IL-6 seviyesi %17.7'ye yükselerek, 1.38 kat artmıştır. İzolat 8'den elde edilen liyofilize EPS uygulanmış ko-kültür modelinde IL-6 seviyesi %2.2'ye düşerek, 5.81 kat azalmıştır. İzolat 9'dan elde edilen liyofilize EPS uygulanmış ko-kültür modelinde IL-6 seviyesi

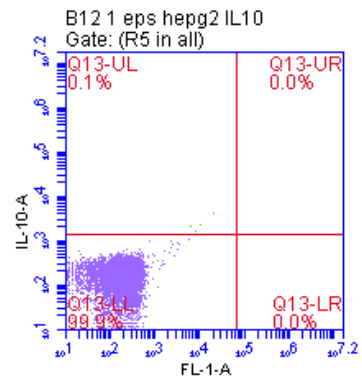
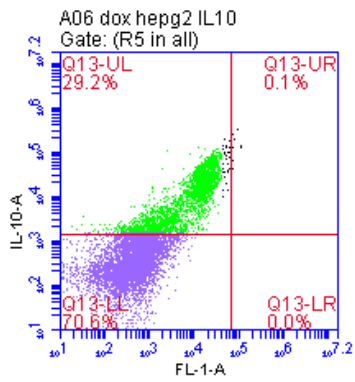
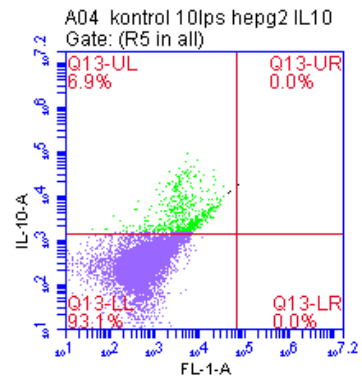
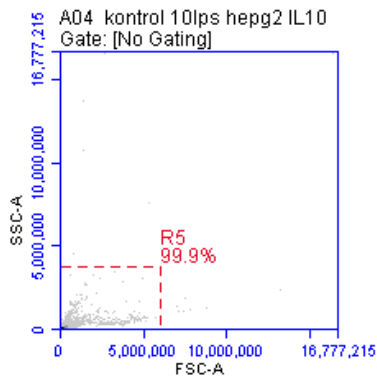
%9.1'e düşerek, 1.40 kat azalmıştır. Doksorubisin ile muamele edilen ko-kültür modelinde IL-6 seviyesi %11.8'e düşerek, 1.08 kat azalmıştır.

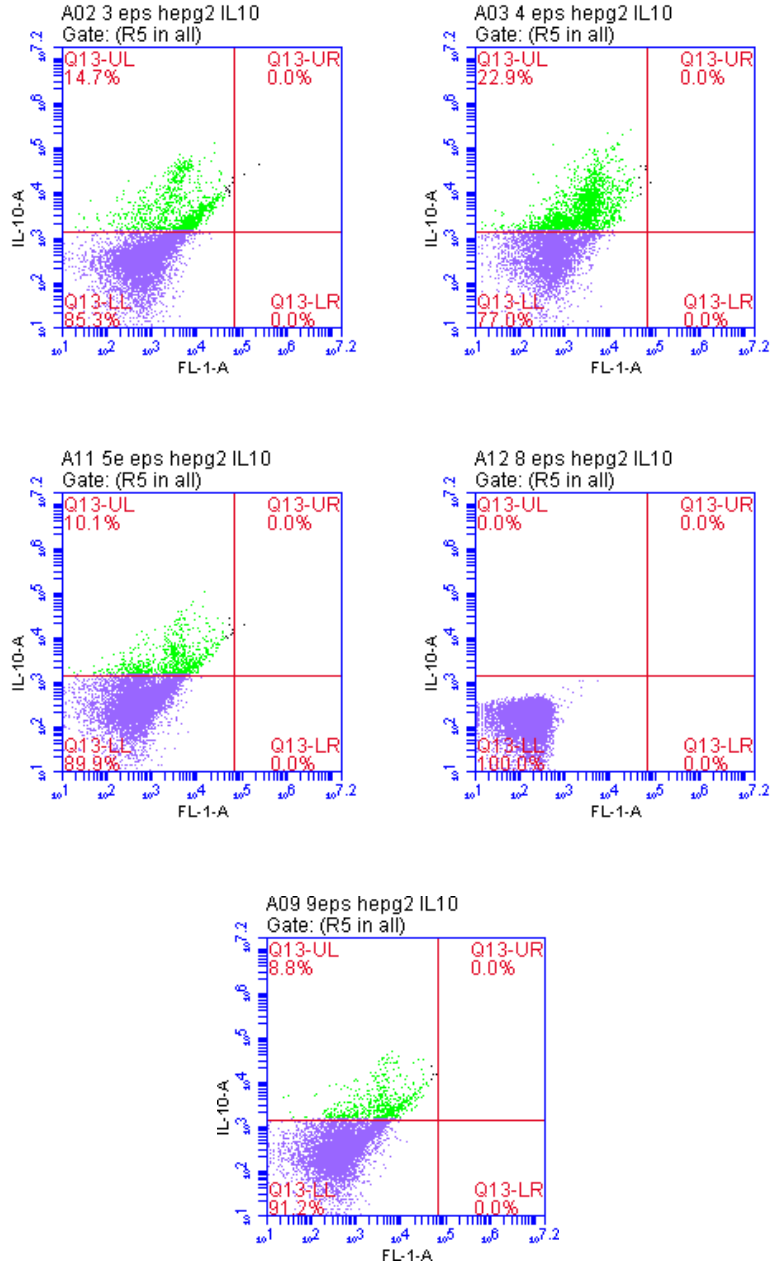




Şekil 4. 20. *Liyofilize LAB EPS'lerinin HepG-2 hücre hattındaki IL-6 sitokin miktarını akış sitometride değerlendirmesi*

Akış sitometri cihazı kullanılarak ölçülen değerlere göre HepG-2 hücrelerinin kontrol grubunda 100 ng/mL LPS uygulanmış ve IL-10 seviyesi %6.9 olarak bulunmuştur. İzolat 1'den elde edilen liyofilize EPS uygulanmış ko-kültür modelinde IL-10 seviyesinde değişiklik tespit edilmemiştir. İzolat 3'den elde edilen liyofilize EPS uygulanmış ko-kültür modelinde IL-10 seviyesi %14.7'ye yükselerek, 2.1 kat artmıştır. İzolat 4'den elde edilen liyofilize EPS uygulanmış ko-kültür modelinde IL-10 seviyesi %22.9'a yükselerek, 3.31 kat artmıştır. İzolat 5'den elde edilen liyofilize EPS uygulanmış ko-kültür modelinde IL-10 seviyesi %10.1'e yükselerek, 1.4 kat artmıştır. İzolat 8'den elde edilen liyofilize EPS uygulanmış ko-kültür modelinde IL-10 seviyesinde değişiklik gözlenmemiştir. İzolat 9'dan elde edilen liyofilize EPS uygulanmış ko-kültür modelinde IL-10 seviyesi %8.8'e yükselerek, 1.27 kat artmıştır. Doksorubisin ile muamele edilen ko-kültür modelinde IL-10 seviyesi %29.2'ye yükselerek, 4 kat artmıştır.

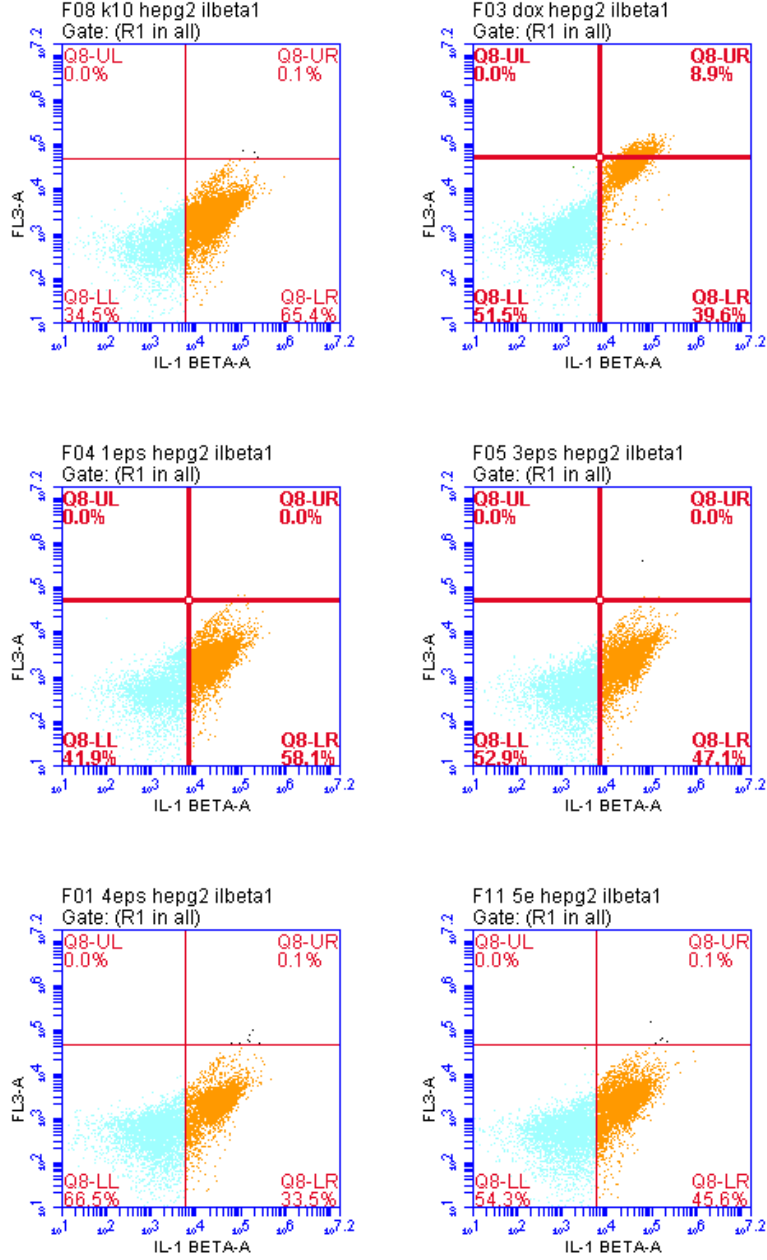


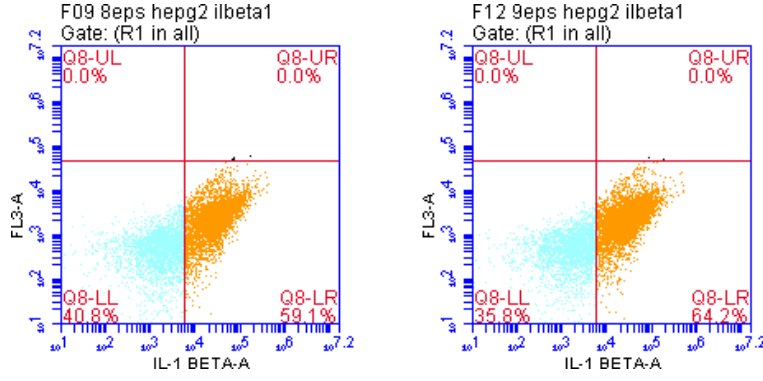


Şekil 4. 21. *Liyofilize LAB EPS'lerinin HepG-2 hücre hattındaki IL-10 sitokin miktarını akış sitometride değerlendirmesi*

Yapılan çalışmada 100 ng/mL LPS ile stimüle edilen THP-1 hücrelerinin kontrol grubunda IL-1 β seviyesi %65.4'tür. 1 No'lu EPS uygulanmış ko-kültür modelinde IL-1 β seviyesi %58.1'e düşerek, 1.12 kat azalmıştır. 3 No'lu EPS uygulanmış ko-kültür modelinde IL-1 β seviyesi %47.1'e düşerek, 1.38 kat azalmıştır. 4 No'lu EPS uygulanmış ko-kültür modelinde IL-1 β seviyesi %33.5'e düşerek, 1.95 kat azalmıştır. 5 No'lu EPS uygulanmış ko-kültür modelinde IL-1 β seviyesi %45.6'ya düşerek, 1.43 kat azalmıştır.

8 No'lu EPS uygulanmış ko-kültür modelinde IL-1 β seviyesi %59.1'e düşerek, 1.10 kat azalmıştır. 9 No'lu EPS uygulanmış ko-kültür modelinde IL-1 β seviyesi %39.6'ya düşerek, 1.65 kat azalmıştır.





Şekil 4. 22. Liyofilize LAB EPS'lerinin HepG-2 hücre hattındaki IL-1 β sitokin miktarını akış sitometride değerlendirmesi

Çizelge 4.13. HepG-2 hücre hattında IL-1 Beta seviyesinin sonuçları

	IL-1 Beta Negatif (%)	IL-1 Beta Pozitif (%)
Kontrol	34.5	65.4
1	41.9	58.1
3	52.9	47.1
4	66.5	33.5
5	54.3	45.6
8	40.8	59.1
9	35.8	64.2
DOX	51.5	39.6

4.5.4. 16S rRNA Dizi Analizi ile Genotipik Karakterizasyonların Belirlenmesi

16S rRNA gen dizilimine göre; Sanger dizileme ile elde edilen okumalar, bir konsensüs dizi oluşturmak amacıyla kontig haline getirilmiştir. Bu işlemin gerçekleştirilmesinde BioEdit yazılımı içinde CAP contig assembly algoritması kullanılmıştır. Diziler NCBI (National Center for Biotechnology Information) üzerinden eşleştirilerek en yakın türler belirlenmiştir. Benzerlik Oranları: %99.80 olarak bulunmuş *Lacticaseibacillus rhamnosus* olarak belirlenmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında; kolostrumdan izole edilmiş laktik asit bakterilerinin izolasyonu, klasik ve moleküler yöntemlerle tanımlanması, antibiyotik duyarlılıkları, antimikrobiyal aktivite testleri, laktik asit üretimi, hemolitik aktiviteleri, pH, tuz, safra tuzu ve asit dirençleri, otoagregasyon ve koagregasyon yetenekleri, biyofilm oluşturma yetenekleri, ekzopolisakkarit izolasyonu ve HepG-2 hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri, hücre içi ve hücre dışı sitokin seviyeleri araştırılmıştır. İzole edilen suşlar arasından probiyotik özelliği olan laktobasiller seçilip, ekzopolisakkarit izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen ekzopolisakkaritler liyofilize edilerek biyolojik aktiviteleri belirlenmiştir. Laktik asit bakterileri; gram pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmayan, asite ve safra tuzuna dirençli, anaerobik veya fakültatif aerobik kok veya basil şeklinde olan bakterilerdir (Salas vd., 2016).

Çalışmamızda kolostrumdan toplam 34 adet izolat elde edilmiştir. Bu izolatlardan gram boyama ve katalaz testi sonucu sonrası diğer deneylere 9 laktobasil suşu ile devam edilmiştir. Bu izolatlara farklı safra tuzu konsantrasyonunda ve farklı pH' da gelişim, TSI da üreme, hareketlilik ve hidrojen sülfür oluşumu testleri uygulanmıştır. 9 izolatında morfolojik olarak basil olduğu belirlenmiştir.

İzolatların probiyotik özelliklerini belirlemek için 9 izolat da hemolitik aktivite, asitte ve safra tuzunda üreme, ekzopolisakkarit üretimi, koagregasyon ve otoagregasyon yeteneklerinin belirlenmesi, biyofilm oluşturma, laktik asit üretim miktarlarının tayini, antibiyotik duyarlılıklarının test edilmesi, serbest radikal süpürücü etkilerinin belirlenmesi gibi testler yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre; tüm izolatların asite ve safra tuzuna karşı dirençli olduğu ve γ -hemolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Laktobasil suşlarının otoagregasyon değerleri %3-19 arasında değerlendirilmiştir. En yüksek otoagregasyon özelliği, %19 ile izolat 3'de tespit edilirken, en düşük otoagregasyon özelliği ise %3 ile izolat 7'de belirlenmiştir. Çizelge 4.4'de gösterilmiştir.

Laktobasil suşlarının *E.coli* ATTC 35298 ile koagregasyon değerleri %34-88 arasında tespit edilmiştir. En yüksek koagregasyon özelliği %88 ile izolat 5'de tespit

edilirken, en düşük koagregasyon özelliği ise %34 ile izolat 4’de belirlenmiştir. Laktobasil suşlarının *S.aureus* ATCC 25923 ile koagregasyon özellikleri %27-37 arasında değerlendirilmiştir. En yüksek koagregasyon özelliği %37 ile izolat 8’de tespit edilirken, en düşük koagregasyon özelliği ise %27 ile izolat 3’de belirlenmiştir. Çizelge 4.2 ve 4.3’de sonuçlar gösterilmiştir.

Laktik asit üretimi patojen bakterilerin üremesine engel olduğu için en önemli probiyotik özelliklerden biridir. Laktobasil suşlarının laktik asit üretimi miktarı %2,25 ile %2,7 arasında tespit edilmiştir.

Serbest radikal süpürücü etki bakımından değerlendirilen laktobasil suşlarında antioksidan aktiviteleri %82.93-84.6 arasında tespit edilmiştir. En yüksek antioksidan aktivite, %84.61 ile izolat 1 ve 5 suşunda tespit edilirken, en düşük antioksidan aktivite ise %82.93 ile 6 suşunda belirlenmiştir.

Disk difüzyon yöntemine göre yapılan antimikrobiyal aktivite testinde; tüm LAB liyofilize ekzopolisakkaritler patojen bakterilere karşı zon oluşturmuştur. Zon çapları 11-30 mm arasında değişiklik göstermiştir. En düşük zon çapının (11 mm) izolat 8’de *S.aureus* patojenine karşı olduğu belirlenmiştir. En büyük zonlar (30mm) ise izolat 5’de görülmüştür.

Antibiyotik duyarlılıkları açısından izolat 1, izolat 2, izolat 3 ve izolat 6’nın Streptomisin 0.5 ve 1.125 µg/mL dozlarında dirençli olduğu tespit edilmiştir. İzolat 1 ve izolat 2’nin diğer izolatlardan farklı olarak penisilin G 0.5 µg/mL dozunda dirençli olmuştur. İzolat 4, izolat 5 ve izolat 7’nin streptomisin 0.5-2.25 µg/mL dozlarında etkili çıkmıştır. 9 LAB izolatının cefamezine karşı duyarlı olduğu gözlemlenmiştir. Tüm izolatlar vancomycin 0.5, 1.125, 2.25, 4.5, 9, 18 ve 36 µg/mL dozlarında dirençli olduğu görülmüştür. İzolat 1, izolat 2 ve izolat 8’in 0.5, 1.125, 2.25, 4.5 ve 9 µg/mL dozlarda, izolat 3, izolat 4, izolat 5, izolat 6, izolat 7 ve izolat 9’un 0.5, 1.125, 2.25, 4.5, 9 ve 18 µg/mL dozlarda etkili çıkmıştır.

TCA yöntemi ile tüm suşlardan EPS izolasyonu yapılmıştır. 9 LAB izolatında EPS üretimi 97-177 mg arasında bulunmuştur. Suşlar içinde en yüksek EPS üretimi (177 mg) izolat 5’de bulunurken, en düşük ise (97mg) izolat 1’de tespit edilmiştir.

LAB liyofilize ekzopolisakkarit konsantrasyonlarının sitotoksik etkileri HepG-2 hücre hattı üzerinde MTT yöntemiyle belirlenmiş ve IC₅₀ değerleri çizelge 4.11’de verilmiştir. Liyofilize ekzopolisakkaritlerin IC₅₀ değerleri izolat 1, izolat 3, izolat 4, izolat 5, izolat 8 ve izolat 9 için sırasıyla 6.5 mg/mL, 5.5 mg/mL, 6.01 mg/mL, 3.02 mg/mL, 4.5 mg/mL ve 5.1 mg/mL olarak belirlenmiştir.

LAB izolatlarının liyofilize EPS’lerin apoptotik etkileri çizelge 4.11’de gösterilmiştir. HepG-2 hücrelerine konsantrasyon verildikten sonraki 24 saat’lik sonuçları; 1 No’lu EPS’in hücrelerde %35.3’de apoptoza neden olduğu, 4 No’lu EPS’in hücrelerde %26.2’de apoptoza neden olduğu, 5 No’lu EPS’in hücrelerde %21.3’de apoptoza neden olduğu, 8 No’lu EPS’in hücrelerde %19.0’da apoptoza neden olduğu, 9 No’lu EPS’in hücrelerde %12.0’ da apoptoza neden olduğu belirlenmiştir. 9 LAB izolatı arasından biyolojik aktiviteleri daha yüksek olan suşlarda hücre içi ve hücre dışı sitokin seviyeleri belirlenmiştir. Sonuç olarak; Lactobasillerden elde edilen ekzopolisakkaritlerin, sağlık, gıda ve kozmetik alanında birçok uygulama potansiyeli olabileceği, gelecekte farklı alanlarda uygulama yeri bulabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

- Abdalla, A.K., Ayyash, M.M., Olaimat, A.N., Osaili, T.M., Al-Nabulsi, A.A., Shah, N.P., Holley, R. (2021). Exopolysaccharides as antimicrobial agents: Mechanism and spectrum of activity, *Frontiers in Microbiology*, 664395.
- Abdelnasser, S., Yahya, S., Mohamed, W. F. (2017). Antitumor Exopolysaccharides Derived from Novel Marine Bacillus: Isolation, Characterization Aspect and Biological Activity. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 18(7):1847-1854.
- Adebayo-Tayo, C., Popoola, A. O. (2017). Biogenic synthesis and antimicrobial activity of silver nanoparticle using exopolysaccharides from lactic acid bacteria., *CrossRef* 8, 61–69.
- Akçelik, M., Ayhan, K., Çakır, D., Doğan, H. B., Gürgün, V., Halkman, A., Kaleli, D., Kuleaşan, H., Özkaya, D. F., Tunail, N. ve Tükel, Ç. (2000). Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Birimi, Ankara, 2. Baskı, 229-275, 514-515.
- Angelin, J., & Kavitha, M. (2020). Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *International journal of biological macromolecules*, 162, 853–865.
- Anonymous. (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, FAO/WHO, 34 p., Argentina
- Bajpai, V. K., Majumder, R., Rather, I. A., & Kim, K. (2016). Extraction, isolation and purification of exopolysaccharide from lactic acid bacteria using ethanol precipitation method. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 11(3), 573-576.
- Balzarini, P., Benetti, A., Invernici, G., Cristini, S., Zicari, S., Caruso, A., Gatta, L.B., Berenzi, A., Imberti, L., Zanotti, C. (2012). Transforming Growth Factor-

Beta1 Induces Microvascular Abnormalities through a down-Modulation of Neural Cell Adhesion Molecule in Human Hepatocellular Carcinoma. *Lab. Investig, CrossRef*, 1297–1309.

- Bars, A. (2010). Bazı heterosiklik ligandların Au(III), Pt(II) dinükleer metalkomplekslerinin sağlam ve kanserli hücreler üzerindeki apoptotik ve antiproliferatif etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Behare, P.V., Singh, R., Nagpal, R., Rao, KH. (2013). Exopolysaccharides producing *Lactobacillus fermentum* strain for enhancing rheological and sensory attributes of low-fat, *Food Sci Tech*. 2013;50:1228–3.
- Bhat. B., Bajaj. B.K. (2019). Hypocholesterolemic potential and bioactivity spectrum of an exopolysaccharide from a probiotic isolate *Lactobacillus paracasei* M7, *Bioact. Carbohydrates Diet. Fibre*. 19 100191.
- Binda, S, Hill, C., Johansen, E., Obis, D., Pot, B., Sanders, M. E., Tremblay, A ve Ouwehand, A.C. (2020). Criteria to Qualify Microorganisms as "Probiotic" in Foods and Dietary Supplements, *Frontiers in microbiology*, 11, 1662.
- Bird, S., Zou, J., Wang, T., Munday, B., Cunningham, C., Secombes, C. J. (2002). Evolution of interleukin-1 β , *Cytokine & growth factor reviews*, 13(6), 483–502.
- Bleau, C., Monges, A., Rashidan, K., Laverdure, JP., Lacroix, M. (2010). Intermediate chains of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M increase IL-10 production by macrophages. *J. Appl. Microbiol.* 108:666–75.
- Brenne, D. J., Krieg, N. R., Staley, J.T., ve Garrity, G. (2005). Bergey's manual of systematic bacteriology. The proteobacteria. *Introductory Essays*, 2(1)
- Bron, P. A., Tomita, S., Mercenier, A., Kleerebezem, M. (2013). Cell surface-associated compounds of probiotic lactobacilli sustain the strain. *Curr Opin Microbiol.* (2013) 16:262–9.

- Chen, D. S., Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*, 39(1), 1–10.
- Cheng, K., Yang, R., Samson, C.S., Wang, M. (2009). Analysis of antioxidant activity and antioxidant constituents of Chinese toon, *Journal of Functional Foods*, 1(3), 253-25.
- Chiba, M., Itabashi, T., Hirai, K., Sakamoto, M., Ohkuma, M., Ishige, T. (2018). *Lactobacillus metriopterae* sp. Nov, a novel lactic acid bacterium isolated from the gut of grasshopper metrioptera engelhardti. *Int J Syst Evol Microbiol.* (2018) 68:1484–9.
- Cizeikiene, D., Jagelaviciute, J. (2021). Investigation of antibacterial activity and probiotic properties of strains belonging to Lactobacillus and Bifidobacterium genera for their potential application in functional food and feed products. *Probiotics Antimicrob. Proteins CrossRef* 2021, 13, 1387–1403.
- Claire, L., Glenn, V., Gibson, R. ve Robert, A. (2006). “Carbohydrate preference, acid tolerance and bile tolerance in five strains of Bifidobacterium,” *J. Appl. Microbiol.*, 100, 846–853.
- Crowley, L.C., Marfell, B., Scott, A.P., Waterhouse, N.P. (2016). Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow, *Cold Spring Harbor protocols*, 10.1101/pdb.prot087288.
- Dash, S.K. (2009). Paper from XXXVII Dairy Industry Conference, February 7-9, Kala Academy, Panjim, Goa.
- Demirci, M. ve Gündüz, H. (1994). “Süt Teknolojisi El Kitabı, *Hasad Yayıncılık*, Ankara,
- Denisenko, T. V., Budkevich, I. N., Zhivotovsky, B. (2018). Cell death-based treatment of lung adenocarcinoma. *Cell Death & Disease*, 9(2), 117.

- Di, W., Zhang, L., Wang, S., Yi, H., Han, X., Fan, R., Zhang, Y. (2017). Physicochemical characterization and antitumour activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus casei* SB27 from yak milk. *Carbohydr Polym.* 2017;171:307–15.
- Di, W., Zhang, L., Yi, H., Han, X., Zhang, Y., Xin, L. (2018). Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* strains suppress HT-29 cell growth via induction of G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis, *Oncol. Lett.* 16 (2018) 3577–3586.
- Dunne, C., Mahony, L., Lisa, M., Thornton, G., Morrissey, D., Halloran, S., Feeney, M., Flynn, M., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., Gerald, C., Sullivan, Shanahan, F., ve Collins, J.K. (2001). In vitro selection criteria for the probiotic bacteria of human origin: correlate with the vivo findings. *American Journal of Clinical Nutrition* 73:386-392.
- Engeland, M., Luc, J.W. Nieland., Frans, C.S., Schutte, B., ve Chris, P.M. (1988) Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure: *Cytometry*, 31(1), 1–9.
- Erkekoğlu, P., Baydar, T. (2021). Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy, 41(1), 45-63.
- Fracchia, L., Cavallo, M., Allegrone, G., Martinotti, MG. (2010). A *Lactobacillus* derived biosurfactant inhibits biofilm formation of human pathogenic *Candida albicans* biofilm producers. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2:827–37
- Fuller, B.R. (1992). History and development of probiotics. *Probiotics: The scientific basis*, 1-8.
- Genç, Ş., Akhisaroğlu, M., Genç, K. (2002). Eritropoetin'in PC-12 hücre hattında amiloid-beta peptid ile oluşturulan nörotoksisiteye karşı koruyucu etkisi. *Turkish Journal of Geriatrics, Geriatri* 5 (1): 1-6.
- Gismondo, MR., Drago, L., Lombardi, A. (1999). Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *Int J Antimicrob Ag* 12:287–292

- Hajna, A. A. (1945). Triple-sugar iron agar medium for the identification of the intestinal group of bacteria. *J. Bacteriol.* 49:516-517.
- Hammes, W ve Hertel, C. (2006). The general *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. The prokaryotes. 3rd ed. *New York: Springer*; p. 319–403
- Hammes, W., Hertel, C., Genus, I. (2009). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. *Berlin: Springer*; 2009. p. 465–510.
- Hanelt, M., Gareis, M., Kollarczik, B. (1994). Cytotoxicity of mycotoxins evaluated by the MTT cell culture assay, Institute of Medical Microbiology, Infectious and Epidemic Diseases, Veterinary Faculty, Ludwig-Maximilian-University Munich, Munich, Germany
- Hayek, S.A. ve Ibrahim, S.A. (2013). Current Limitations and Challenges with Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food and Nutrition Sciences*, 4, 73-87.
- Huys, G., Botteldoorn, N., Delvigne, F., De Vuyst, L., Heyndrickx, M., Pot, B vd.. (2013). Probiyotiklerin mikrobiyal karakterizasyonu – Belçika Yüksek Sağlık Konseyi'nin (SHC) “8651 Probiyotikler” Çalışma Grubu'nun danışma raporu. *Mol. Nutr. Gıda Res.* 57, 1479–1504.
- Ismail, B., Nampoothiri, K.M. (2013) Exposition of antitumour activity of a chemically characterized exopolysaccharide from a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510. *CrossRef, Biologia* 2013, 68, 1041–1047.
- Jankovic, I., Ventura, M., Meylan, V., Rouvet, M., Elli, M., Zink, R. (2003). Contribution of aggregation-promoting factor to maintenance of cell shape in *Lactobacillus gasseri* 4B2. *J Bacteriol* 185: 3288– 96

- Jara, M. J., Ilabaca, A., Marco Vega. (2016). Biofilm Forming Lactobacillus: New Challenges for the Development of Probiotics, *Microorganisms*, 4(3), 35.
- Johnson, G., R. M. ve Dong, H. (2017). Functional Expression of Programmed Death-Ligand 1 (B7-H1) by Immune Cells and Tumor Cells. *Frontiers in Immunology*, 8, 961.
- K, Wang., M, Niu., D, Song., X, Song., J, Zhao., Y, Wu., B, Lu., G, Niu (2019). Preparation, partial characterization and biological activity of exopolysaccharides produced from *Lactobacillus fermentum* S1, *J. Biosci. Bioeng.* xxx (2019) 1–9.
- Karabekir, G. (2017). MCF-7 hücre soyunda resveratrolün apoptoz mekanizması üzerine etkisinin araştırılması, Master's thesis, İstanbul Bilim Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Khalil, M., Fatma, Ii. (2022). Exploring the Therapeutic Potentials of Exopolysaccharides Derived From Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Antioxidant, Antitumor, and Periodontal Regeneration, *Frontiers in Microbiology*, 13, 803688.
- Kim, Y., Yun, H.S., Oh, S., Kim, S.H. (2010). Cell-bound exopolysaccharide from probiotic bacteria induces autophagic cell death of tumour cells, *Letters in applied microbiology*, 51(2), 123-130.
- Klaenhammer, TR. ve Kullen, M.J. (1999). Selection and design of probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 50 (1-2): 45-57)
- Klaenhammer, TR., Altermann, E., Pfeiler, E., Buck, BL., Goh, YJ., O'Flaherty, S. (2008). Functional genomics of probiotic Lactobacilli. *J Clin Gastroenterol.* 2008;42, 3, 160–162.
- Kodali, V. P., Das, S., Sen, R. (2009). An exopolysaccharide from a probiotic: biosynthesis dynamics, composition and emulsifying activity food research international an exopolysaccharide from a probiotic : biosynthesis dynamics, composition and emulsifying activity, *Food Res. Int.* 42 (2009) 695–699.

- Koopman, G., Reutelingsperger, CP., Kuijten, GA., Keehnen, RM., Pals, ST. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84: 1415– 1420
- Kos., B. V., Suskovic, Z. E., Vukovic, J., Simpraga, M., Frece. J ve Matosic. S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 94(6), 981-987
- Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda. H, Uchiyama. H. (2008). Biofilm Formation by Lactic Acid Bacteria and Resistance to Environmental Stress, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(4), 381-386.
- Laino, J., Villena, J., Kanmani, P., Kitazawa, H. (2016). Immunoregulatory effects triggered by lactic acid bacteria ~ exopolysaccharides: new insights into molecular interactions with host cells. *Microorganisms* 4, 3,:E27
- Landersjö, C., Yang, Z., Huttunen, E., Widmalm, G. (2002). Structural studies of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (ATCC 53103). *Biomacromolecules.*,3,880–884.
- Leroy, F ve De Vuyst, L. (2004). Lactic Acid Bacteria as Functional Starter Cultures for the Food Fermentation Industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 67-78.
- Liu, C ve Pan, T. (2010). In Vitro Effects of Lactic Acid Bacteria on Cancer Cell Viability and Antioxidant Activity, *Journal of Food and Drug Analysis*, 18(2), 8.
- Li, C., Li, W., Chen, X., Feng, M., Rui, X., Jiang, M., Dong, M. (2014). Microbiological, physicochemical and rheological properties of fermented soymilk produced with exopolysaccharide (EPS) producing lactic acid bacteria strains. *LWT Food Sci. Technol.* 57, 477–485.
- Li, S., Huang, R., Shah, N. P., Tao, X., Xiong, Y., Wei, H. (2014). Antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides from *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 and *Lactobacillus plantarum* R315, *J. Dairy Sci.* 1–10,

- Li, W., Xi, X., Tang, W., Ji, J., Rui, J., Chen, X., Jiang, M., Zhou, M., Zhang, Q., ve Dong, M. (2015). Structural Characterization and Anticancer Activity of Cell-Bound Exopolysaccharide from *Lactobacillus helveticus* MB2 1, *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(13), 3454-3463.
- Liang, T., Wu, C., Chen, Y., Wang, I., Wang, S. (2014). Exopolysaccharides and Antimicrobial Biosurfactants Produced by *Paenibacillus macerans* TKU029, *Applied biochemistry and biotechnology*, 172, 933-950.
- Liu, C.F., Pan, T, M. (2010). In vitro effects of lactic acid bacteria on cancer cell viability and antioxidant activity, *J. Food Drug Anal.* 18 (2010) 77–86.
- Liu, CF., Tseng, KC., Chiang, SS., Lee, BH., Hsu, WH., Pan, TM. (2011). Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus* exopolysaccharides. *J. Sci. Food Agric.* 91:2284–91
- Lynch, M.L., Zannini, E., Coffey, A., ve Arendt, K. E. (2018). Lactic Acid Bacteria Exopolysaccharides in Foods and Beverages: Isolation, Properties, Characterization, and Health Benefits, *Annual review of food science and technology*, 9, 155-176.
- Masci, E. (2013). Bacteria and intestinal health in adult and pediatric population: moving from the field of alternative medicine to evidence-based treatment. *International Journal of Probiotics and Prebiotics* 8: 1-4
- Mduduzi, P. M, (2017). Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review, *Molecules*, 22(8), 1255.
- Mende, S., Rohm, H., Jaros, D. (2016). Influence of exopolysaccharides on the structure, texture, stability and sensory properties of yoghurt and related products, *International Dairy Journal*, 52, 57-71.
- Meulen, R. V., Grosu-Tudor, S., Mozzi, F., Vanningelgem, F., Zamfir, M., Valdez, Luc De Vuyst, G. F. (2007). Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved,

International journal of food microbiology, 118(3), 250-258.

- Monika, K. V., Kumaril, A., Angmo, K. (2017). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from traditional pickles of Himachal Pradesh, India, *ournal of Food Science and Technology*, 54, 1945-1952.
- Mourad, K. ve Nour-Eddine, K. (2006). In vitro preselection criteria for probiotic *Lactobacillus plantarum* strains offermented olive origin. *International Journal of Probiotics and Prebiotics* 27-32
- Moyes, R. B., Reynolds, J., Breakwell, D. P (2009). Differential staining of bacteria: gram stain, *Current Protocols in Microbiology*, 15(1), A-3C.
- Muñoz-Quezada, S., Chenoll, E., Vieites, J.M., Genovés, S., Maldonado, J., Bermúdez-Brito, M., Gomez-Llorente, C., Matencio, E., Bernal, M.J., Romero, F., Suárez, A., Ramón, D ve Gil, A. (2013). Isolation, identification and characterisation of three novel probiotic strains. *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I4036 from the faeces of exclusively breast-fed infants *British Journal of Nutrition*, 109 (2), 51-62
- Nagai, T., Makino, S., Ikegami, S., Itoh, H., Yamada, H. (2011). Effects of oral administration of yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* OLL1073R-1 and its exopolysaccharides against influenza virus infection in mice. *Int. Immunopharmacol.* 2011, 11, 2246–2250.
- Nami, Y., Abdullah, N., Haghshenas, B., Radiah, D., Rosli, R. ve Khosroushahi, AY (2014). Vajinal mikrofloradan izole edilen *Enterococcus durans* 6HL ve *Lactococcus lactis* 2HL'nin probiyotik değerlendirilmesi. *J. Med. Mikrobiyoloji.* 63.
- Ohn, J. (2020). The Potential Probiotic and Functional Health Effects of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Korean Fermented Foods, *생명과학회지*, 30(7), 581-591.

- Oleksy, M., Klewicka, E. (2018). Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sp.*: Biosynthesis and applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2018, 58, 450–462
- Parveen, R., Anandharaj, M., David, A. (2018). International journal of biological macromolecules characterization of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus gasseri* FR4 and demonstration of its in vitro biological properties, *Int. J. Biol. Macromol.* 109 (2018) 772–783,
- Patel, S., Majumder, A., Goyal, A. (2012). Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. *Indian Journal of Microbiology*, 52(1), 3–12.
- Pereira, D.I. A. ve Gibson, G. R. (2002). “Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans,” *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 37:4, 259–281.
- Prete, R., Alam, M. K., Perpetuini, G., Perla, C., Pittia, P., Corsetti, A. (2021). Lactic acid bacteria exopolysaccharides producers: A sustainable tool for functional foods.
- Rajoka, M.S., Mehwish, H.M., Zhang, H., Ashraf, M., Fang, H., Zeng, X., Wu, Y., Khurshid, M., Zhao, L., He, Z. (2020). Antibacterial and antioxidant activity of exopolysaccharide mediated silver nanoparticle synthesized by *Lactobacillus brevis* isolated from Chinese koumiss. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 186.
- Rajoka, Riaz., Jin, M., Haobin, Z., Li, Q., Shao, D., Jiang, C., Huang, Q., Yang, H., Shi, J., Hussain, N. (2018). Functional characterization and biotechnological potential of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from human breast milk, *LWT – Food Sci. Technol.* 89 (2018) 638–647
- Ramachandran, P., Lacher, D. W., Pfeiler, E. A., Elkins, C. A. (2013). Development of a tiered multilocus sequence typing scheme for members of the *Lactobacillus acidophilus* complex. *Appl Environ Microbiol.*;79(23):7220–8.

- Raynal, P., Pollard, H.B. (1994). Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1197:63–93.
- Rinkinen, M., Jalava, K., Westermarck, E., Salminen, S., ve Ouwehand, A. C. (2003). Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization. *Veterinary Microbiology*, 92(1-2), 111-119.
- Rodríguez, C., Medici, M., Rodríguez, A., Mozzi, F. (2009). Prevention of chronic gastritis by fermented milks made with exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains, *ournal of Dairy Science*, 92(6), 2423-2434.
- Rogosa, M., Mitchell, J. A ve Wiseman, R. F. (1951). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23(1), 130-135.
- Ruas-Madiedo, P. (2014). Biosynthesis and bioactivity of exopolysaccharides produced by probiotic bacteria. *Food Oligosacch. Prod. Anal. Bioact.* 2014, 118–133.
- Ruas-Madiedo, P., Gavilán, C.G. (2005). Methods for the Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria, *J. Dairy Sci.*, 88, 853-866.
- Rumgay, H., Arnold, M., Ferlay, J., Laversanne, M., Katherine A. (2022). Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040, *ournal of Hepatology*, 77(6), 1598-1606.
- Ryan, M.P., Rea, M.C., Hill, C., Ross, R.P. (1996), ‘An Application in Cheddar Cheese Manufactura for a Strain Of *Lactococcus lactis* Producing a Novel Broad Spectrum Bacteriocin, Lacticin 3147, *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (2), 612–619.
- Saadat, Y.R., Khosroushahi, A.Y., Gargari, B.P. (2019). A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. *Carbohydr. Polym.* 2019, 217, 79–89

- Shewale, R., Pravin, D., Khedkarand, C. D., Singh, A. (2018). Selection criteria for probiotics: A review, *International Journal of Probiotics & Prebiotics*, 9(1/2), 17.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., ve Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(6), 945-948
- Son, S., Jeon, H. vd. (2017). The Potential Probiotic and Functional Health Effects of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Korean Fermented Foods, *생명과학회지*, 30(7), 581-591.
- Soyuçok, A., Ekiz, T., Kılıç, G.B., (2016). Ekzopolisakaritlerin Özellikleri ve Gıda Sanayindeki Önemi, *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 5, 332-344.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B. ve Svabic-Vlahovic, M. (2000), "A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation," *J. Microbiol. Methods*, 40, 175–179.
- Sungur, T., Aslim, B., Karaaslan, C., Aktas, B. (2017). Anaerobe impact of exopolysaccharides (EPSs) of *Lactobacillus gasseri* strains isolated from human vagina on cervical tumor cells (HeLa), *Anaerobe*, 47, 137–144,
- Tamer, A. Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, D., Bursalıoğlu, M. ve Oğultekin, R. (1989), 3. Ve 4. Sınıf Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu, Anadolu Üniversitesi Eğitim Sağlık ve Bilimsel Araştırma Çalışmaları Vakfı Yayınları, Eskişehir, No: 74, 23-25, 240
- Tang, W., Dong, M., Wang, W., Han, S., Rui, X., Chen, X., Jiang, M., Zhang, Q., Wu, J., Li, W. (2017). Structural characterization and antioxidant property of released exopolysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* SRFM-1, *Carbohydr. Polym.* 173 (2017) 654–664.

- Tatsaporn, T ve Kornkanok, K (2020). Using Potential Lactic Acid Bacteria Biofilms and their Compounds to Control Biofilms of Foodborne Pathogens, *Biotechnology Reports*, 26, e00477.
- Tobias, A. Oelschlaeger. (2010). Mechanisms of probiotic actions a review, *International journal of medical microbiology*, 300(1), 57-62.
- Tolosa, L., Donato, M.T., ve Lechón, M.J. (2015). General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay, *Protocols in in vitro hepatocyte research*, 333-348.
- Tomasetti, C., Li, L., Vogelstein, B. (2017). Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science*, 355(6331), 1330–1334
- Tuohy, K.M., Probert, H.M., Smejkal, C.W., Gibson, G.R. (2003). Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Dis Today* 8:692–700
- Upadhyaya, G., Ravikumar, P. L ve Umopathy, B.L. (2009). Review of virulence factors of Enterococcus: an emerging nosocomial pathogen, *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27 (4), 301-5
- Vaningelgem, F., Zamfir, M., Mozzi, F., Adriany, T., Vancanneyt, T., Swings, J., ve Vuyst, L. (2006). Biodiversity of exopolysaccharides produced by *streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics, *Applied and environmental microbiology*, 70(2), 900-912.
- Vinothkanna, A., Sathiyarayanan, G., Balaji, P., Mathivanan, K., Pugazhendhi, A., Yongkun, M., Sekar, S., Thirumurugan, R., (2021). Structural characterization, functional and biological activities of an exopolysaccharide produced by probiotic *Bacillus licheniformis* AG-06 from Indian polyherbal fermented traditional medicine, *International Journal of Biological Macromolecules*, 174, 144-152.
- Wang, K., Li, W., Rui, X., Chen, X., Jiang, M., Dong, M. (2014). Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum*

- 70810, *Int. J. Biol. Macromol.* 63 (2014) 133–139.
- Weber, A., Wasiliew, P., ve Kracht, M. (2010). Interleukin-1 (IL-1) Pathway Science Signaling, *Science signaling*, 3(105), cm1-cm1.
- Wei, Y., Li, F., Li, L., Huang, L ve Li, Q. (2019). Genetic and Biochemical Characterization of an Exopolysaccharide With in vitro Antitumoral Activity Produced by *Lactobacillus fermentum* YL-11, *Frontiers in Microbiology*, 10, 2898.
- Wiśniewski, J.R., Koepsell, H., Gizak, A., Rakus, D. (2015). Absolute Protein Quantification Allows Differentiation of Cell-Specific Metabolic Routes and Functions. *Proteomics*, 15, 1316–1325.
- Wiśniewski, J.R., Vildhede, A., Norén, A., Artursson, P. (2016). In-Depth Quantitative Analysis and Comparison of the Human Hepatocyte and Hepatoma Cell Line HepG2 Proteomes. *J. Proteom.*, 136, 234–247.
- Yamashita, T ve Xin, Wang. (2013). Cancer stem cells in the development of liver cancer, *The Journal of clinical investigation*, 123(5), 1911-1918.
- Yılmaz, M.T., Dertli, E., Toker, O.S., Tatlısu, N.B., Sagdic, O. ve Arıcı, M. (2015). Yerde ekzopolisakkarit üretiminin yoğurt içeceği ayranın fizikokimyasal, reolojik, duyuusal ve mikroyapısal özelliklerine etkisi: fermantasyon kinetiğine dayalı bir optimizasyon çalışması. *J. Süt Ürünleri Bilimi* 98.
- You, X., Yang, L., Zhao, X., Ma, K., Chen, X., Zhang, C., Wang, G., Dong, M., Rui, X., Zhang, Q.W. (2020). Isolation, purification, characterization and immunostimulatory activity of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus pentosus* LZ-R-17 isolated from Tibetan kefir, *Int. J. Biol. Macromol.* 158 (2020) 408–419.
- Zaghloul, E ve Mohamed, I. A. (2022). Production and Characterization of Exopolysaccharide From Newly Isolated Marine Probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* EI6 With in vitro Wound Healing Activity, *Frontiers in Microbiology*, 13, 903363.

Zannini, E., Waters, D. M., Coffey, A., Arendt, E. K. (2016). Production, Properties, And Industrial Food Application Of Lactic Acid Bacteria-Derived Exopolysaccharides. *In Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 1121–1135.

Zhang, A.Z., Cao. H., Wang. F. (2012). Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research, *Carbohydrate polymers*, 90(4), 1395-1410.

Zhao, H., Xu, X., Lei, S., Shao, D., Jiang, C., Shi, J., Zhang, Y., Liu, L., Lei, S., Sun, H., Huang, Q. (2019). Iturin Alike lipopeptides from *Bacillus subtilis* trigger apoptosis, paraptosis, and autophagy in Caco-2 cells, *J. Cell. Physiol.* 234 6414–6427.

https-1:

[/www.hepg2.com/#:~:text=HepG2%20Cell%20Line%20Origin%20and%20Characteristics&text=HepG2%20cells%20exhibit%20an%20epithelial,as%20monolayers%20in%20small%20aggregates](http://www.hepg2.com/#:~:text=HepG2%20Cell%20Line%20Origin%20and%20Characteristics&text=HepG2%20cells%20exhibit%20an%20epithelial,as%20monolayers%20in%20small%20aggregates) (erişim tarihi: 26.10.2023).

https-2: [//fullsepp.com/tr/yayinlar/560/in-vitro-sitotoksisite-testi-mtt/1/a](http://fullsepp.com/tr/yayinlar/560/in-vitro-sitotoksisite-testi-mtt/1/a) (erişim tarihi: 09.10.2023).

https-3:

[//acikerisim.nku.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.11776/3821/0063332.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://acikerisim.nku.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.11776/3821/0063332.pdf?sequence=1&isAllowed=y) (erişim tarihi: 12.10.2023).