

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

***Lactobacillus plantarum* SUŞLARI TARAFINDAN ÜRETİLEN
EKZOPOLİSAKKARİTLERİN SAĞLIK ÜZERİNE ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TÜLİN YILMAZ

DENİZLİ, AĞUSTOS - 2018

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI



Lactobacillus plantarum SUŞLARI TARAFINDAN ÜRETİLEN
EKZOPOLİSAKKARİTLERİN SAĞLIK ÜZERİNE ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TÜLİN YILMAZ

DENİZLİ, AĞUSTOS - 2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

Tülin YILMAZ tarafından hazırlanan “*Lactobacillus plantarum* Suşları Tarafından Üretilen Ekzopolisakkaritlerin Sağlık Üzerine Etkileri” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 13.08.2018 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Doç. Dr. Ömer ŞİMŞEK

Üye
Prof. Dr. Nazime Mercan DOĞAN

Üye
Prof. Dr. Hüseyin ERTEN

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 12/09/2018 tarih ve 37/19 sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Uğur YÜCEL

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışması Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 116O525 nolu proje ile desteklenmiştir. Çalışmada ekzopolisakkaritlerin kolesterol giderimi ve α -glukozidaz enzim inhibisyon deneyleri için Pamukkale Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminden 2017FEBE008 nolu proje kapsamında ek destek alınmıştır.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birinciğ ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

Tülin YILMAZ



ÖZET

***Lactobacillus plantarum* SUŞLARI TARAFINDAN ÜRETİLEN
EKZOPOLİSAKKARİTLERİN SAĞLIK ÜZERİNE ETKİLERİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
TÜLİN YILMAZ
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI:DOÇ. DR. ÖMER ŞİMŞEK)**

DENİZLİ, AĞUSTOS - 2018

Bu çalışmada geleneksel fermente bir ürün olan tarhanadan daha önce izole edilmiş ve ekzopolisakkarit (EPS) üreticisi olarak belirlenmiş *Lactobacillus plantarum* PFC308, PFC309, PFC310, PFC311, PFC312 ve PFC313 suşlarının ürettiği EPS'lerin sağlık üzerine etkileri araştırılmıştır. Söz konusu suşlar tarafından üretilen EPS'lerin sağlık üzerine etkilerini belirlemek amacıyla prebiyotik özellikleri, antioksidan aktiviteleri, α -glukozidaz enzim inhibitör aktiviteleri, pro-inflamatuar, anti-inflamatuar özellikleri ve kolesterol giderimi üzerine etkileri *in vitro* ortamda araştırılmıştır. Yapılan analizler sonucunda çalışmada kullanılan suşların 178-377 mg L⁻¹ aralığında EPS ürettikleri ve en yüksek EPS üretiminin PFC308 suşu tarafından gerçekleştirildiği tespit edilmiştir. Ayrıca söz konusu suşlar tarafından üretilen EPS'lerin suşlara bağlı olarak birbirlerinden farklı prebiyotik etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. Çalışmada üretilen tüm EPS'lerin antioksidan aktivitesi gösterdiği ve %51,86 oranı ile en yüksek hidroksil radikali süpürme etkisinin PFC309 suşundan üretilen EPS'de tespit edilmiştir. Ayrıca; PFC308 suşu tarafından üretilen EPS'nin kolesterol seviyesini %68,75 oranında düşürme etkisinin olduğu bulunmuştur. Diğer yandan; PFC311 suşundan elde edilen EPS'nin %40,98 oranında α -glukozidaz enzim inhibitör aktivitesine sahip olduğu ve probiyotik bakteriler için güçlü prebiyotik özellik gösterdiği de tespit edilmiştir. Anti-inflamatuar ve pro-inflamatuar sitokin indüklemelerinde ise en etkili sırasıyla PFC309 ve PFC313 suşlarından üretilen EPS'lerin olduğu belirlenmiştir. Nitekim; bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre *L. plantarum* PFC308, PFC309, PFC310, PFC311, PFC312 ve PFC313 suşlarından üretilen EPS'lerin her birinin farklı seviyelerde sağlığı iyileştirici özelliğe sahip olduğu ve ikame ya da destekleyici olarak kullanılacak doğal biyopolimerler olduğu gösterilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: *Lactobacillus plantarum*, Ekzopolisakkarit, Prebiyotik, Antioksidan, Sitokin, Kolesterol

ABSTRACT

HEALTH EFFECTS OF EXOPOLYSACCHARIDES PRODUCED BY *Lactobacillus plantarum* STRAINS

MSC THESIS

TÜLİN YILMAZ

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

FOOD ENGINEERING

(SUPERVISOR:ASSOC. PROF. ÖMER ŞİMŞEK)

DENİZLİ, AUGUST 2018

In this study, the health benefits of exopolysaccharides (EPS) produced by *Lactobacillus plantarum* PFC308, PFC309, PFC310, PFC311, PFC312 and PFC313 strains isolated from tarhana, a traditional fermented product, were investigated. In this respect, the prebiotic properties, antioxidant activities, α -glucosidase enzyme inhibitor activities, pro-inflammatory, anti-inflammatory properties and cholesterol removal effects were studied in vitro to determine the health benefits of EPSs produced by single and mixed culture of these strains. It was determined that the EPS production amounts of the strains used in the study were between 178-377 mg L⁻¹ and that the highest EPS production was performed by the PFC308. It was also determined that the EPSs produced by the strains showed prebiotic effect at different rates depending on the strains. All EPSs showed antioxidant activity in different level and the highest (51.86%) hydroxyl radical scavenging effect was determined at EPS produced by PFC309. Also; the EPS produced by PFC308 strain was able to lower the cholesterol level at 68.75%. On the other hand; EPS obtained from the PFC311 strain inhibited 40.98% of the α -glucosidase enzyme inhibitor activity as well as showed high prebiotic effect for probiotic bacteria. EPSs produced from the PFC309 and PFC313 strains were found the most effective for the anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokine induction, respectively. As a conclusion, EPSs produced from *L. plantarum* PFC308, PFC309, PFC310, PFC311, PFC312 and PFC313 strains showed developing effects on health and proposed to be alternatives for substitutes or supplements.

KEYWORDS: *Lactobacillus plantarum*, Exopolysaccharides, Prebiotic, Antioxidant, Cytokines, Cholesterol

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vi
SEMBOL LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Tezin Amacı	2
1.2 Literatür özeti	2
1.2.1 Laktik Asit Bakterileri ve Genel Özellikleri	2
1.2.1.1 <i>Lactobacillus</i> Cinsi Bakterilerinin Genel Özellikleri.....	5
1.2.2 Ekzopolisakkaritler (EPS).....	7
1.2.3 LAB'ler Tarafından Üretilen EPS'nin Sağlıkla İlişkisi	12
1.2.3.1 EPS'lerin Prebiyotik Etkileri.....	13
1.2.3.2 EPS'lerin Antioksidan Aktiviteleri	15
1.2.3.3 EPS'lerin Süperoksit Anyon Süpürme Aktiviteleri	18
1.2.3.4 EPS'lerin Hidroksil Radikal Süpürme Aktiviteleri.....	18
1.2.3.5 EPS'lerin Serbest Radikal Süpürme Aktiviteleri	19
1.2.3.6 EPS'lerin İmmün Modülasyon Özellikleri.....	19
1.2.3.7 EPS'lerin Kolesterol Seviyesi Azaltma Üzerine Etkileri.....	23
1.2.3.8 EPS'lerin Alfa-Glukozidaz İnhibitör Aktiviteleri.....	25
2. MATERYAL VE METOT	27
2.1 Materyal.....	27
2.2 Metot.....	27
2.2.1 <i>L. plantarum</i> Suşlarından EPS Üretimi ve Saflaştırılması	27
2.2.2 EPS'lerin pro-inflamatuar TNF- α , IL-12 ve anti-inflamatuar IL-10, IL-4 sitokinleri Uyarıcı İmmün Modülasyon Özelliklerinin Belirlenmesi.....	28
2.2.2.1 Hücre Hattının Temini ve Çoğaltılması	29
2.2.2.2 Hücrelerin Açılması, Pasajlanması, Sayılması ve Dondurulması	29
2.2.2.3 Enzim-bağlı İmmünoabsorbent Analizi (ELIZA) Yöntemi ile IL-4, IL-10, IL-12 ve TNF- α Konsantrasyonlarının Belirlenmesi ...	32
2.2.3 EPS'lerin Prebiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	35
2.2.4 EPS'lerin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi	36
2.2.5 EPS'lerin Alfa-glukozidaz İnhibitör Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	37
2.2.6 EPS'lerin Kolesterol Seviyesini Düşürme Yeteneklerinin Belirlenmesi.....	38
2.2.7 İstatistiksel Analiz.....	38
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	39
3.1 <i>L. plantarum</i> Suşları Tarafından EPS Üretimi ve Saflaştırılması	39

3.2	<i>L. plantarum</i> Suşlarından Üretilen EPS'lerin Enzim-bağlı İmmünoabsorbent Analizi (ELIZA) Yöntemi ile IL-4, IL-10, IL-12 ve TNF- α Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	41
3.3	<i>L. plantarum</i> Suşlarından Üretilen EPS'lerin Prebiyotik Etkilerinin Belirlenmesi.....	47
3.4	<i>L. plantarum</i> Suşlarından Üretilen EPS'lerin Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi.....	53
3.5	<i>L. plantarum</i> Suşlarından Üretilen EPS'lerin Alfa Glukozidaz İnhibitör Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	56
3.6	<i>L. plantarum</i> Suşlarından Üretilen EPS'lerin Kolesterol Seviyesini Düşürme Yeteneklerinin Belirlenmesi.....	57
4.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	59
5.	KAYNAKLAR.....	62
6.	ÖZGEÇMİŞ.....	79

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Dekstran'ın yapısı (Harutoshi 2013).....	10
Şekil 1.2: Mutan'ın yapısı (Harutoshi 2013).....	10
Şekil 1.3: Alternan'ın yapısı (Harutoshi 2013).....	11
Şekil 1.4: Levan'ın yapısı (Harutoshi 2013).....	11
Şekil 1.5: İnülin'in yapısı (Harutoshi 2013)	12
Şekil 2.1: HT-29 hücre hattının (ATCC No: HTB-38) düşük ve yüksek yoğunluktaki mikroskop görüntüsü.....	29
Şekil 2.2: Neubauer hücre sayım lamı	31
Şekil 2.3: Neubauer lamı alan görüntüsü. Hücre sayım işleminde mavi renklerle gösterilen 4 büyük karedeki hücreler sayılır ve toplam sayı 4'e bölünerek ortalama değer alınmaktadır.	32
Şekil 3.1: PFC308 suşunun fermentörde üretimi	39
Şekil 3.2: PFC308 suşunun liyofilize görüntüsü.....	40
Şekil 3.3: IL-4 ait standart eğim grafiği	41
Şekil 3.4: IL-10 ait standart eğim grafiği	42
Şekil 3.5: IL-12 ait standart eğim grafiği	42
Şekil 3.6: TNF- α ait standart eğim grafiği	43
Şekil 3.7: EPS varlığında HT-29 hücrelerinde IL-4 sitokin üretim miktarı.....	44
Şekil 3.8: EPS varlığında HT-29 hücrelerinde IL-10 sitokin üretim miktarı....	44
Şekil 3.9: HT-29 hücrelerinde EPS'lerin IL-12 sitokini üzerindeki etkileri	45
Şekil 3.10: HT-29 hücrelerinde EPS'lerin TNF- α sitokini üzerindeki etkileri ..	46
Şekil 3.11: <i>L. plantarum</i> PFC308, PFC309, PFC310, PFC311, PFC312 ve PFC313 suşlarından üretilen EPS'leri içeren MRS ortamında <i>B. bifidum</i> DSM 20082'nin gelişimi.....	48
Şekil 3.12: <i>L. plantarum</i> PFC308, PFC309, PFC310, PFC311, PFC312 ve PFC313 suşlarından üretilen EPS'leri içeren MRS ortamında <i>L. casei</i> subsp. <i>shirota</i> 'nın gelişimi.....	49
Şekil 3.13: <i>L. plantarum</i> PFC308, PFC309, PFC310, PFC311, PFC312 ve PFC313 suşlarından üretilen EPS'leri içeren ortamda <i>L. rhamnosus</i> GG'nin gelişimi	50
Şekil 3.14: <i>L. plantarum</i> PFC308, PFC309, PFC310, PFC311, PFC312 ve PFC313 suşlarından üretilen EPS'leri içeren ortamda <i>L. acidophilus</i> DSM 20079'un gelişimi.	51
Şekil 3.15: <i>L. plantarum</i> PFC308, 309, 310, 311, 312 ve 313 suşlarından elde edilen EPS'lerin süperoksit anyon süpürme % aktivitesi	54
Şekil 3.16: <i>L. plantarum</i> PFC308, 309, 310, 311, 312 ve 313 suşlarından elde edilen EPS'lerin hidroksil radikali süpürme % aktivitesi.....	55
Şekil 3.17: <i>L. plantarum</i> PFC308, 309, 310, 311, 312 ve 313 suşlarından elde edilen EPS'lerin radikal süpürme % aktivitesi	56
Şekil 3.18: <i>L. plantarum</i> PFC308, 309, 310, 311, 312 ve 313 suşlarından elde edilen EPS'lerin alfa glikozidaz inhibitör % aktivitesi	57
Şekil 3.19: <i>L. plantarum</i> PFC308, 309, 310, 311, 312 ve 313 suşlarından elde edilen EPS'lerin kolesterol seviyesini düşürme yetenekleri...58	

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: <i>Lactobacillus</i> türlerinin metabolik karakterlerine göre sınıflandırılması (Axelsson 2004)	7
Tablo 2.1: Modifiye BHI besiyeri (1 litre için).....	27
Tablo 2.2: Bir ELIZA kiti içerisinde bulunan ekipmanlara ait bilgiler.....	33
Tablo 2.3: IL-4, IL-10, IL-12 ve TNF- α ELIZA kitleri için standart konsantrasyonları ve standartlara ait çalışma konsantrasyonları ...	33
Tablo 2.4: MRS besiyeri (1 litre için).....	36
Tablo 3.1: Biyoreaktör ortamında <i>L. plantarum</i> PFC308, 309, 310, 311, 312 ve 313 suşları tarafından üretilen EPS'lerin miktarları.....	40
Tablo 3.2: Bazı LAB Suşları Tarafından Üretilen EPS'lerin Prebiyotik Etkisi (Ryan ve diğ. 2014).....	52

SEMBOL LİSTESİ

LAB	:	Laktik Asit Bakterisi
EPS	:	Ekzopolisakkarit
°C	:	Santigrat derece
CO₂	:	Karbondioksit
α	:	Alfa
β	:	Beta
rpm	:	Dakikadaki devir sayısı
mL	:	Mililitre
L	:	Litre
g	:	Gram
<i>g</i>	:	Rölatif santrifüj kuvveti
mTorr	:	Militorr
mm	:	Milimetre
μL	:	Mikrolitre
dk	:	Dakika
nm	:	Nanometre
OD	:	Optik yoğunluk
mM	:	Milimolar
U	:	Ünite
μg	:	Mikrogram
mg	:	Miligram
pg	:	Pikogram

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü bilgisini, desteğini ve sabrını hiçbir zaman esirgemeyen, çalışma konusunun belirlenmesi, planlanması, çalışmalarımın yönlendirilmesinde ve tamamlanmasında değerli fikirleriyle bana yol gösteren birlikte çalışmaktan onur duyduğum çok değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Ömer ŞİMŞEK'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın tamamlanmasına gerekli olanakları sağlayan Pamukkale Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölüm Başkanlığı'na ve bölüm Öğretim Üyelerine, ayrıca tez çalışmamı destekleyen üniversitemizin Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca tecrübelerini ve bilgilerini esirgemeyen Arş. Gör. Halil İbrahim KAYA'ya, aynı çalışma ortamını paylaşmaktan mutluluk duyduğum, sonsuz desteklerini hissettiğim can arkadaşlarım Gıda Müh. Elif TAŞDELEN'e ve Öğr. Gör. Burcu ÖZEL'e, diğer tüm laboratuvar ekip arkadaşlarıma, yüksek lisans eğitimim boyunca aynı evi paylaştığım ve desteğini hep hissettiğim Cansu LAZ'a teşekkür ederim.

Çalışmanın immün modülasyon özelliklerinin belirlenmesi kısmında değerli fikirlerini benden esirgmeden yardımcı olan, tecrübelerinden yararlandığım Doç. Dr. Yavuz DODURGA'ya ve Arş. Gör. Levent ELMAS'a teşekkür ederim.

Son olarak her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini sonsuz hissettiğim bugüne kadar üstesinden gelerek elde ettiğim tüm başarılarımın mimarisi olan sevgili annem Ayşe YILMAZ'a, canım babam M. Durdu YILMAZ'a ve kardeşlerime çok teşekkür ederim.

Ağustos, 2018

Tülin YILMAZ

1. GİRİŞ

Geleneksel alışkanlıklara bağılı olarak üretilen fermente gıdaların gerek olgunlaştırma aşamasında gerek tat, aroma ve kendine özgün tekstürünün oluşturulmasında starter kültür olarak kullanılan laktik asit bakterileri (LAB), gıdadaki karbonhidratları fermente ederek son ürün olarak temelde laktik asit üretirler. Bunun yanında LAB besin bakımından zengin ortamlarda bulunduğunda çeşitli organik asitler, hidrojen peroksit, bakteriyosin veya ekzopolisakkarit (EPS) gibi çok çeşitli metabolitleri de üreterek fonksiyonel özellik gösterebilir. LAB'ler ürettikleri metabolitler ile gıdanın yapısal ve tekstürel özelliklerini iyileştirmelerinin yanı sıra tüketici sağlığı üzerinde olumlu etkilerinden dolayı da dikkat çekmiş ve bakteri grupları arasında GRAS (genel olarak güvenli kabul edilen) statüsüne sahip olduklarından endüstride kullanımları yaygın hale gelmiştir. Son yıllarda LAB tarafından sentezlenen EPS'nin hem sağlığı olumlu yönde etkilemesi hem de gıdaların yapısal ve tekstürel özelliklerini iyileştiren doğal biyopolimerler olması oldukça dikkat çekmiştir. Aynı zamanda söz konusu özelliklerinden dolayı çok yönlü fonksiyonel bir mikrobiyal metabolit olan EPS, gıda, ilaç, kozmetik, tekstil gibi birçok alanda kullanılmaya başlanmıştır. Bu durum mikrobiyal kaynaklı EPS'lere olan ilginin artmasını sağlamıştır.

Mikrobiyal polisakkaritler bitki ve hayvan kaynaklı polisakkaritlere kıyasla tekrarlanabilir üretim parametreleri, daha kısa sürede elde edilmeleri, kalitesi ve nihai ürünün yüksek verimi gibi birçok avantaja sahiptir. EPS'ler mikrobiyal polisakkaritlerin bir çeşididir. Mantarlar ve bakteriler tarafından hücre içi ya da hücre dışı sentezlenebilirler. LAB'lerin çeşit ve miktar bakımından en iyi EPS üreticileri olduğu bilinmektedir.

LAB tarafından üretilen EPS'lerin bazıları, canlılarda immüno-modülatör, anti-tümör, anti-biyofilm ve antioksidan aktiviteleri gibi sağlık üzerine faydaları bulunmaktadır. Bununla birlikte, sağlık üzerine etkileri genel olarak konakçı-bakteri ilişkisine dayanır ve karakteristiğine bağılı olarak bağılıklık sistemi üzerine etkisi olabilmektedir. EPS'lerin birçoğu uzun karbonhidrat zincirlerinden oluştuğundan

kısa zincirlere kıyasla daha yavaş metabolize edilerek, kolon bölgelerinde daha uzun süre kalmaktadır. Kolondaki bir ya da sınırlı sayıdaki bakterinin büyüme ve gelişmesini sağlayarak prebiyotik olarak fonksiyon gösterdiği ve bağırsak mikrobiyotasını modifiye ederek sağlığı olumlu yönde etkilediği bilinmektedir.

LAB tarafından üretilen EPS'ler insan sağlığı üzerine olumlu etkileri ve bunun yanında destekleyici olarak kullanılabilen doğal bir biyopolimer olması nedeniyle oldukça önemli metabolitlerdir. Yapılan bu tez çalışmasında geleneksel bir gıdamız olan tarhananın fermantasyonunda bulunan LAB arasında EPS üreticisi olduğu belirlenen *L. plantarum* suşlarından EPS üretilip saflaştırıldıktan sonra sağlık üzerine etkileri incelenmiştir.

1.1 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının amacı, geleneksel fermente gıdamız olan tarhanadan izole edilmiş *L. plantarum* suşlarından EPS üretimi, üretilen EPS'nin saflaştırılması ve söz konusu EPS'lerin pro-inflamatuar, anti-inflamatuar, prebiyotik, antioksidan aktivite özellikleri, alfa glukozidaz inhibitör aktiviteleri ve kolesterol seviyesinin azaltılması üzerindeki etkilerinin araştırılarak tüketici sağlığına katkısının belirlenmesidir.

1.2 Literatür özeti

1.2.1 Laktik Asit Bakterileri ve Genel Özellikleri

İlk kez 19. yy. sonlarında sütte fermantasyona ve koagülasyona yol açan bakteriler LAB olarak isimlendirilmiş ve *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Lactobacillus* ve *Carnobacterium* cinsleri içerisinde sınıflandırılmışlardır (Axelsson 2004). LAB, sağlık ve beslenmedeki faydaları ve fermentatif kabiliyetlerinden dolayı endüstriyel öneme sahiptirler. Anaerobik özellikte olmalarına rağmen oksijene duyarlı değildirler ve oksijen olsa da olmasa da üreyebilirler bu özelliklerinden dolayı fakültatif anaerob olarak adlandırılırlar. Gram

pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmeyen, düşük GC içeriğine sahip (%50'den az), zorunlu olarak fermentatif olup karbonhidratların fermantasyonunda son ürün olarak önemli miktarda laktik asit üretirler. Basil veya kok şeklinde bulunabilirler. 10-45°C arası sıcaklıklarda gelişebilen ve yüksek tuz konsantrasyonlarını, asit veya alkaliyi tolere edebilen heterojen bir mikroorganizma grubudur. Bu grubun üyeleri porfinler ve sitokromlar içermedikleri için elektron taşınmasına bağlı fosforilasyon yapamazlar. Dolayısıyla sadece substrat düzeyinde fosforilasyon ile enerji elde ederler (Tannock 2004, Evren ve diğ. 2006, Madigan ve Martinko 2012, Sauer ve diğ. 2017).

Orla-Jensen 1919'da, LAB'nin ilk sınıflandırmasını morfolojisi, ekolojisi ve özellikle optimal üreme sıcaklıkları (10-45°C) olmak üzere başlıca fizyolojik özelliklerine dayanarak *Thermobacterium*, *Streptobacterium*, *Microbacterium*, *Betacoccus*, *Tetracoccus*, *Streptococcus* şeklinde gruplandırarak yapmıştır (Holzapfel ve diğ. 2001). Günümüzde bakterilerin taksonomisindeki değişimler, bakterinin genotipik tanımlanması ve DNA'sındaki nükleotit oranları (GC içeriği) ile belirlenmektedir. Ayrıca izole edilen genlerinin elektroforetik özellikleri, DNA:DNA hibridizasyonu, RNA'nın yapısı ve sıralanması 16S rRNA gen dizisi gibi moleküler özellikler taksonomide kullanılan önemli tekniklerdir. Bu teknikler sayesinde yapılan sınıflandırmalarda doğru ve hızlı sonuç alınması büyük yarar sağlamaktadır. Böylece son yıllarda yapılan genetik çalışmalar sonucu ortaya çıkan sınıflandırmada gıdalarda önemli olan başlıca LAB cinsleri: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenecoccus*, *Vagococcus* ve *Weissella*'dır. Yeni oluşturulmuş LAB cinsleri ise; *Carnobacterium*, *Weissella*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Atopobium* ve *Albiococcus*'dur (Stiles ve Holzapfel 1997, Endo ve Okada 2005, Tangüler ve Erten 2006, Çetinkaya ve Ayhan 2012, Bulut-Albayrak 2017). Son yıllarda artan teknolojiye bağlı olarak genomu tamamen sekanslanan LAB sayısı 100'ü aşmıştır ve söz konusu çalışmalar bu bakteri grubunun üyelerinin fonksiyonel özelliklerinin anlaşılması için çok önemli mesafeler kat edilmesini sağlamıştır (Fanning ve diğ. 2012^a, Dertli ve diğ. 2013).

LAB türleri kendi içlerinde farklı olarak homofermentatif ve heterofermentatif fermentasyon olmak üzere iki farklı yol ile karbonhidratları fermente ederler. Homofermentatif LAB, glukozu Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)

yolu ile fermente ederek çoğunlukla laktik asit üretir. Heterofermentatif LAB ise EMP yolunun önemli enzimlerinden aldolaz enzimine sahip olmadığından, söz konusu bakteriler glukozu Pentoz-Fosfat (PP) yolu ile katabolize ederek laktik asit beraberinde etanol ve karbondioksit (CO₂) de oluştururlar. Diğer yandan her iki yolu da kullanabilen fakültatif heterofermentatif LAB'de vardır. Örneğin; *L. plantarum* glukozu homofermentatif olarak metabolize ederken, pentozları laktat ve asetata PP yolu ile hidrolize etmektedir. *Lactobacillus casei* de glukozu homofermentatif, ribozu ise heterofermentatif olarak metabolize etmektedir (Çon ve Gökalp 2000, Holzapfel ve diğ. 2001). LAB insan ve hayvan gastrointestinal sistemini de içeren birçok farklı ortamda temel mikroorganizma grubu olarak yer alır. LAB organik asitler, hidrojen peroksit, reuterin ve bakteriyosin gibi çok çeşitli antimikrobiyal bileşikler de üretebilir. Bunun dışında bu bakteriler EPS sentezleyerek çeşitli fonksiyonel özellik de gösterir (Broadbent ve diğ. 2003, Leroy ve Vuyst 2004, Tannock 2004, Claesson ve diğ. 2007, Walter 2008, Bulut-Albayrak 2017).

LAB'nin genetiği, biyokimyası ve fizyolojisi üzerine yeni bilgiler elde edilmesiyle bu bakterilerin fermente gıdaların üretiminde starter kültür olarak kullanımı yaygınlaşmıştır (Blagojev ve diğ. 2012). Genel bir tanımla starter kültür "kontrollü koşullarda standart kalitede bir ürün elde etmek için gıda sanayinde kullanılan mikroorganizmalardır". Starter kültür, belirli bir amaca yönelik olarak kullanılır. Bazı gıdalarda işlevi asit geliştirmek iken, bazı gıdalarda aroma geliştirme esastır. Probiyotik ürünlerde olduğu gibi bazı gıdalarda da temel işlev doğrudan sağlıktır. LAB tarafından karbon kaynağının laktik aside dönüştürülmesiyle ürün pH'sı düşer, bozulma ve patojen mikroorganizmaların gelişimi engellenir. Asitleşmeye ilaveten, antimikrobiyal bileşikler, lezzet ve aroma bileşikler, B grubu vitaminleri, biyoaktif peptitler, düşük kalorili şekerler ve EPS'ler üretilerek fermente ürünlerin işlevselliğine, organoleptik özelliklerine katkıda bulunabilir (Gaspar ve diğ. 2013). Bu grubun birçok üyesi farklı konakçılarda kolonize olabilirler. Konakçı mikroflorada baskın hale gelerek zararlı mikroorganizmaların gelişimine engel olurlar. Günümüzde probiyotik olarak adlandırılan organizmaların büyük çoğunluğu LAB grubu üyesidir. Probiyotikler Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) tanımı ile belirli miktarlarda vücut içerisine alındıklarında konakçısına sağlık faydası sağlayabilen canlı mikroorganizmalardır. Ayrıca bu türler erken kolonizasyon göstererek bağırsak mikrobiyotasını modifiye edebilirler ve çeşitli antimikrobiyal

bileşenler üreterek zararlı mikroorganizmaların uzaklaşmalarını sağlayabilirler (FAO/WHO 2006, Fanning ve diğ. 2012^a, Dertli ve diğ. 2013).

LAB'nin GRAS (Genel Olarak Güvenilir Kabul Edilen) statüsünde tanımlanmaları ve Avrupa Birliği'nce QPS (Güvenliğin Nitelikli Varsayımı) olarak tarif edilmeleri ve tüketici tercihlerinin daha doğal gıda koruyucular için artan talepleri nedenleri ile biyokontrol ajanları olarak kullanımlarına ilişkin yoğun bir ilgi ortaya çıkmıştır (Crowley ve diğ. 2013). Son yıllarda dikkati çeken fonksiyonel özelliklerden birisi de LAB'lerin EPS üretimidir (De Vuyst ve Degeest 1999, Broadbent ve diğ. 2003, Kumar ve diğ. 2007). Çünkü söz konusu bakteriler tarafından polisakkaritlerin üretimi, gıdaların hem reolojik ve tekstürel özelliklerinin geliştirilmesi, hem de tüketici sağlığının iyileştirilmesi yönünde çeşitli fonksiyonlar sağlamaktadır (Welman ve Maddox 2003, Ryan ve diğ. 2014, Mende ve diğ. 2016). LAB tarafından EPS üretimi son yirmi yıldır araştırmacıların dikkatini çekmiş, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* ve otuzdan fazla *Lactobacillus* türünün EPS ürettiği ve bu polimerlerin gıda sanayisinde kıvamlaştırıcı, sağlamaştırıcı, emülsifiyer, yağ ikame edici ve diğer önemli konularda kullanılması söz konusu olmuştur (Broadbent ve diğ. 2003, Badel ve diğ. 2011).

1.2.1.1 *Lactobacillus* Cinsi Bakterilerinin Genel Özellikleri

Laktobasiller tipik olarak çubuk (basil) şeklinde bakterilerdir. İnce, uzun ya da kıvrık kısa şekillerde bulunabilirler (Madigan ve Martinko 2012). Gram pozitif, spor oluşturmeyen, katalaz negatif özelliktedirler. Bu soydaki bakteriler 2-53°C'de (optimum 37-45°C) gelişme gösterirler. Oksijeni kullanma özelliğine göre aerotolerant ya da anaerob olup, %5 CO₂'li ortamda gelişme gösterebilirler. Hafif asidik ortamda hızlı çoğalarak *Streptococcus*'lardan daha çok asit oluştururlar. Laktobasiller asidik koşullara diğer laktik asit bakterilerinden çok daha dirençlidirler ve 4.0 gibi düşük pH değerlerinde rahatlıkla çoğalabilirler. Kromozomlarındaki DNA baz kompozisyonlarında % 33-55 oranda GC ihtiva ederler (Holzapfel ve diğ. 2001, Settanni ve Corsetti 2008, Madigan ve Martinko 2012).

Laktobasiller gelişebilmeleri için zengin besin ortamlarına özellikle aminoasit, peptit, vitamin, yağ asidi veya yağ asidi esterleri ile fermente

edebilecekleri besin maddelerine ihtiyaç duyarlar. Oldukça farklı çevrelerde gelişebilir ve genel olarak fermente gıdalarda, süt ve ürünlerinde, bitkilerde, insan ve hayvan bağırsağında bulunurlar. Fermente gıdaların birçoğunda starter kültür olarak kullanılırlar (Holzapfel 2001, Salminen ve diğ. 2004).

Laktobasillerin fermentatif özellikleri dikkate alınarak; obligat homofermentatifler, fakültatif heterofermentatifler ve obligat heterofermentatifler olmak üzere bir sınıflandırma yapılmış ve söz konusu sınıflandırma Tablo 1.1'de verilmiştir. Obligat homofermentatifler ile fakültatif heterofermentatifler grubunda yer alan bakterilerin çoğu ve obligat heterofermentatif grubunda bulunan bazı bakteriler fermente gıdalarda kullanılmaktadır. Obligat heterofermentatifler ise vakum ambalajlanmış gıdalarda gaz oluşturabilirler (Axelsson 2004).

L. plantarum doğada birçok alanda dağılmış olarak bulunan fakültatif heterofermentatif laktik asit bakterisidir (Siezen ve diğ. 2010). Çeşitli ortamlara uyum sağlayabilmekte ve LAB grubu arasında en büyük genoma (~ 3.3 Mb) sahip olduğu için değişik kaynaklardan izole edilebilmektedir (Martino ve diğ. 2016). Katalazlar, peroksidazlar ve redüktazların yanı sıra yüksek bir oksidatif stres ile başa çıkmak için çeşitli özelliklere sahiptir (Abdelazez ve diğ. 2018). Bunların yanı sıra gastrointestinal sistemdeki asit ve safra stresi gibi fiziksel ve kimyasal engellere, vajinal ve ürogenital yollar da dahil olmak üzere çeşitli zorlu koşullara karşı son derece toleranslıdır (Jose ve diğ. 2015).

L. plantarum'un birçok açıdan insan sağlığına faydaları mevcuttur. Probiyotik olarak kullanılabilir, bağışıklık sistemini düzenler, kolesterol seviyesini düşürür, bağırsak mikroorganizmalarının stabil dengesini korur ve tümör dağılımını engelleyebilir. 1970'lerin sonunda, *L. plantarum* potansiyel bir immünolojik destekleyici (adjuvan) olarak tanımlanmıştır. Günümüzde birçok çalışma *L. plantarum*'un immün homeostaziye olumsuz etkilemeden, doğrudan mukozal immün yanıtı arttırdığını ortaya koymuştur. Bu özellikler, antijen iletiminde kullanılmak üzere *L. plantarum*'a olan ilgiyi arttırmıştır. Diğer yandan, *L. plantarum*'un rekombinant suşlarının pro-inflamatuar özelliklerinden dolayı aşı antijeni olarak kullanılmak üzere etkili mukozal uygulama araçları olduğu varsayılmaktadır (Bron ve diğ. 2012, Fredriksen ve diğ. 2012, Abdelazez ve diğ. 2018).

Tablo 1.1: *Lactobacillus* türlerinin metabolik karakterlerine göre sınıflandırılması (Axelsson 2004)

Obligat homofermentatif	Fakültatif heterofermentatif	Obligat heterofermentatif
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acetotolerans</i>	<i>L. brevis</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. alimentarius</i>	<i>L. buchnerii</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	<i>L. bifermentis</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. hilgardii</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>L. homohiochii</i>	<i>L. parabuchneri</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	<i>L. parakefir</i>
<i>L. kefiranofaciens</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. sanfrancisco</i>
<i>L. kefiraganum</i>	<i>L. pentosus</i>	<i>L. reuteri</i>
<i>L. mali</i>	<i>L. sakei</i>	<i>L. vaccinostercus</i>

1.2.2 Ekzopolisakkaritler (EPS)

Polisakkaritler dünyadaki en önemli biyolojik polimerlerdendir (Ateş 2015) ve doğada oldukça yaygın şekilde bulunurlar. Bu polimerlerin canlılar için başlıca enerji depo materyali (örn, glikojen) olmasının yanısıra özellikle bakteri hücre duvarı bileşenleri olan peptidoglikan, lipopolisakkarit, lipooligosakkarit, teikoik asit, lipoteikoik asit ve EPS'lerin yapısında yer alması gibi birçok hayati fonksiyonu bulunmaktadır. Örneğin teikoik asit, teikuronik asit, lipopolisakkarit ve peptidoglikan gibi bakteri hücre duvarı bileşenleri polisakkaritlerden oluşmaktadır (Sutherland 2007, Badel ve diğ. 2011, Zeidan ve diğ. 2017).

EPS'ler düz veya dallanmış tekrarlı şeker ve şeker türevlerini içeren uzun zincirli, yüksek molekül ağırlığına sahip ve temel olarak hücre çeperi dışında bulunacak şekilde üretilen polimerlerdir. Bu şeker birimleri farklı oranlarda ağırlıklı olarak ya glukoz, galaktoz, fruktoz ve ramnozdan ya da bunların kombinasyonlarından oluşmaktadır (Sutherland 2001, Welman ve Maddox 2003, İsmail ve Nampoothiri 2010). Birçok prokaryotik ve ökaryotik mikroorganizma hücre duvarlarının bileşiminde bulunmayan hücre dışı EPS olarak adlandırılan polisakkaritler üretme kabiliyetindedirler (Sutherland 2001). Bitkiler, algler, mantarlar ve bakteriler tarafından da EPS üretilmektedir. GRAS statüsüne sahip gıda

sınıfı LAB tarafından üretilen EPS, bitki ve hayvan kaynaklı EPS'nin bir alternatifi olarak kullanılabilir (Dilna ve diğ. 2015). Bakteriler teknolojik ve endüstriyel uygulamalar için EPS üretiminden sorumlu temel organizmalardır (Ateş 2015). *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve *Weissella* cinslerinin EPS üreticisi oldukları bilinmektedir (Patel 2012).

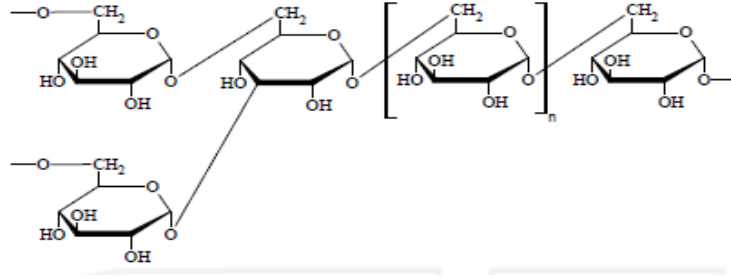
LAB'ler tarafından üretilen EPS'ler, hücreyi ozmotik stres, düşük su aktivitesi, fagositoz, bakteriyofajlar, toksik bileşikler ve makrofajlara karşı koruyucu işlevlere sahiptir. Diğer yandan, EPS'ler hücre tanımada, yüzeylere tutunma ve probiyotikler gibi mikrobiyal ekosistemlerin bağırsak florasında kolonizasyonunu kolaylaştıran biyofilmlerin oluşmasında kilit öneme sahiptir. Ayrıca üretilen EPS'ler, üreticisi LAB tarafından enerji kaynağı olarak da kullanılabilir (Ruas-Madiedo ve diğ. 2002, Badel ve diğ. 2011, Dertli ve diğ. 2016, Zeidan ve diğ. 2017, Kanmani ve diğ. 2018).

Bu biyopolimerler hücrede kovalent bağlarla sıkı bir şekilde bağlanmış hücre etrafında kapsül oluşturan kapsüller EPS (CPS) veya hücreye gevşek şekilde bağlı olarak hücre yüzeyi ile elektrostatik etkileşimler vasıtasıyla ilişkili olan ve çoğunlukla ortama salınarak yapışkan bir özellik kazandıran (slime) EPS (SPS) olarak iki formda bulunabilir. CPS ve SPS, hücre yüzeyine bağlanma şekillerinde farklılık olan ekzoselüler polisakkaritlerdir. EPS üreticisi LAB türleri EPS üretimlerini çoğunlukla SPS formunda gerçekleştirirken, bazı türler ise hem CPS hem de SPS formunda üretebilmektedir. CPS, SPS'den daha iyi su tutma kapasitesine sahip iken, salgı formunda olmasından dolayı SPS'nin daha yüksek viskoziteye sahip olduğu bilinmektedir (Patel ve diğ. 2010, Yang ve diğ. 2010, İsmail ve Nampoothiri 2010, Freitas ve diğ. 2014, Zeidan ve diğ. 2017). Yang ve diğ. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada; Çin lahanası turşusu olan kimchi'den iki EPS formunu da üretebilen *L. rhamnosus* JAAS8 suşu izole edilmiştir. Söz konusu suş tarafından üretilen hücre yüzeyini çevreleyen mevcut kapsüller polisakkarit (CPS) ve yapışkan polisakkaritin (SPS) biyosentezleri ayrı ayrı incelenmiştir. Sonuç olarak; gelişme ortamında bulunan SPS biyosentezinin logaritmik büyüme safhası boyunca arttığı, sonrasında söz konusu artışın durağan safhada azaldığı ve sonunda viskozite etkisinde belirli oranda azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun fermantasyon ortamında yer alan glikohidrolazların EPS'yi monomerlere hidrolize etmesinden kaynaklandığı belirtilmiştir. Bununla birlikte üretilen CPS'nin etkilenmediği aksine

fermantasyon işlemi sırasında veriminin sürekli arttığı belirlenmiştir. Besin maddelerinin tükenmesi, asitliğin artması, tuz varlığı gibi olumsuz çevre koşullarının CPS oluşumunu teşvik ettiği görülmüştür. Söz konusu bu durum hücrel koruma ile ilişkilendirilmiş, koruma ve direnç özelliklerinden dolayı sağlık açısından probiyotik olarak kullanımının ön koşulunu oluşturduğu görülmüştür. Bu çalışmadan elde edilen sonuca benzer olarak; *L. helveticus*, *L. delbrueckii* ve *S. thermophilus* gibi diğer birçok EPS üreten LAB'nin durağan safhada EPS veriminde benzer azalmalar olduğu bulunmuştur.

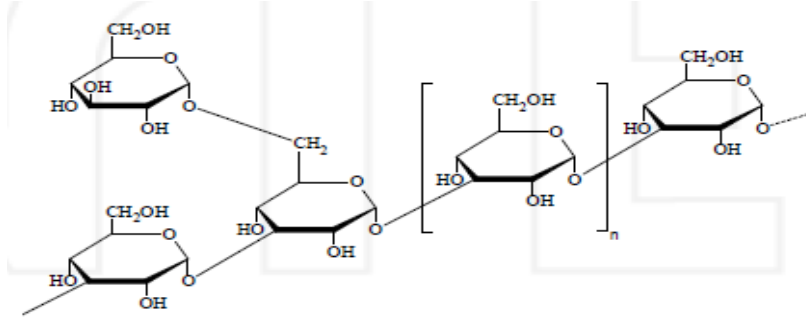
LAB tarafından üretilen EPS'ler; yapısal olarak tek tip monosakkaritlerin tekrarlanan birimlerinden oluşan homopolisakkaritler (HoPS) ve iki veya daha fazla monosakkaritten oluşan bir ünitenin düzenli tekrarlayan birimlerinden oluşan heteropolisakkaritler (HePS) olmak üzere iki alt sınıfa ayrılmaktadır (Harutoshi 2013, Dertli ve diğ. 2016). HoPS, glikoz, fruktoz gibi tek tip monosakkarit içerir ve α -D-glukanlar (deskranlar, mutanlar, alternanlar), β -D-glukanlar, fruktanlar (levan, inülin) ve poligalaktan olmak üzere dört gruba ayrılır (Ruas-Madiedo ve diğ. 2002). HoPS'lar arasındaki temel farklılık esas olarak ana zincirdeki bağlar, molekül ağırlıkları ve dallanma yapılarının özellikleri nedeniyle ortaya çıkmaktadır (Harutoshi 2013). Genellikle molekül ağırlıkları 10^4 ile 10^6 Da aralığında değişmektedir. *Leuconostoc* ve *Weisella* suşları başlıca ve önemli miktarda HoPs üreticileridir (Karaca ve diğ. 2010, Badel ve diğ. 2011, Kajala ve diğ. 2015).

HoPS'ların üretilmesi için fermentasyon ortamında sükroz substrat olarak kullanılır ve monosakkarit üniteleri bakteri hücresi duvarında bulunan glikoziltransferaz tarafından oluşturulduktan sonra biyosentez gerçekleştirilir. Alfa-glukanlar, α -(1-6) ve α -(1-3) bağlı glikozidik birimlerinden oluşmaktadır. *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* tarafından dekstransükraz enziminin aktivitesi ile sükrozdan üretilen dekstranlar α -(1-6) ve α -(1-3) glikozidik bağlarını içerir. Dekstran çözeltilerinin viskozitesi konsantrasyon, sıcaklık ve moleküler ağırlık fonksiyonlarına bağlı olarak değişir, sahip oldukları glikozidik bağların serbest dönüşümü sayesinde esnek bir yapıya sahiptir ve suda oldukça iyi çözünürler. (Ruas-Madiedo ve diğ. 2002, Rehm 2010, Ahmad ve diğ. 2015).



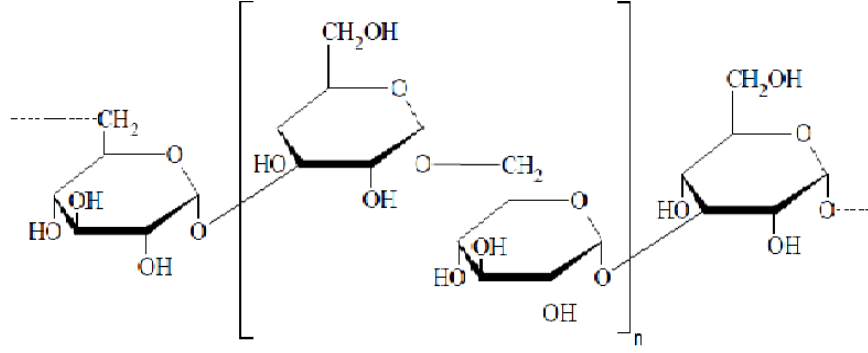
Şekil 1.1: Dekstran'ın yapısı (Harutoshi 2013)

Streptococcus mutans ve *Streptococcus sobrinus* tarafından üretilen mutanlar bir glukandır, dekstrandan farklı olarak α -(1-3) bağlarını yüksek oranda içerir bundan dolayı suda çözünmezler. Mutanlar mikroorganizmaların dişlere tutunmasını kolaylaştırdıklarından diş çürüklerinin bir nedeni olarak düşünülmektedir (Ruas-Madiedo ve diğ. 2002, Harutoshi 2013, Leemhuis ve diğ. 2013).



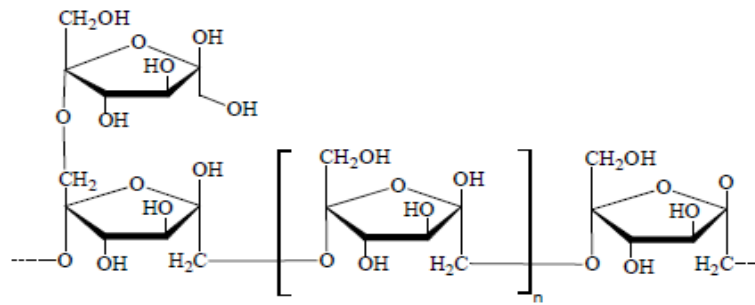
Şekil 1.2: Mutan'ın yapısı (Harutoshi 2013)

Alternan, *Leuconostoc mesenteroides* suşları tarafından yapılarında α -(1,6) ve α -(1,3) glikozidik bağları içeren bir glukandır. *Leuconostoc mesenteroides* suşlarının sahip olduğu alternan-sükraz enzim aktivitesi ile üretilmektedirler. Alternanların diğer polisakkaritlerden farklı olarak düşük viskozite yüksek çözünürlük gibi ayırıcı bir özelliği vardır. Ekstraselüler alternan enzimi alternanları oligosakkaritlere indirger. Alternanlar şekerlerin glisemik indeks gücünü düşürmek ve ayrıca gıdalarda prebiyotik katkı amaçlı olarak da kullanılırlar (Patel ve diğ. 2012, Zannini ve diğ. 2016).

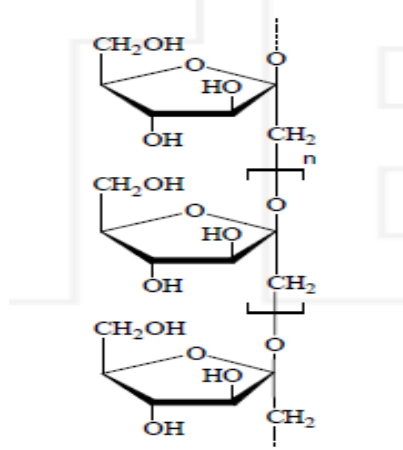


Şekil 1.3: Alternan'ın yapısı (Harutoshi 2013)

Beta-glukanlar ise *Pediococcus* spp. ve *Streptococcus* spp. tarafından üretilen β -(1-3) bağlı glikozidik birimlerinden oluşmaktadır (Ruas-Madiedo ve diğ. 2002). Fruktanlar; *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Leuconostoc mesenteroides*, *L. sanfranciscensis*, *L. reuteri* gibi LAB suşları tarafından üretilen levan ve inülin gibi β -(2,6) ve β -(2,1) bağlı fruktoz moleküllerinden oluşmaktadır. Levan sükras enzimi, fruktozdan levani karakterize eden β -(2-6) glikozidik bağlarla D-fruktozil birimlerinin transferini katalizler. Yağda ve suda yüksek çözünürlük, güçlü yapışkanlık, iyi biyoyumluluk ve film oluşturma yeteneği gibi pek çok ayırt edici özellikleri vardır. Bu özelliklere sahip bir HoPS olarak gıdalarda, yemlerde, kozmetiklerde, ilaçlarda ve kimya endüstrisinde yeni bir fonksiyonel biyopolimer olarak önemli bir potansiyele sahiptir. Ayrıca prebiyotik, anti-tümör ve kolesterol düşürme etkilerinden dolayı da son yıllarda oldukça dikkat çekmektedir. İnülin β -(2,1) glikozidik bağlar içeren fruktooligosakkaritlerdir. Sindirilemediklerinden bağırsak kanalında prebiyotik fonksiyon göstermelerinin yanı sıra bağırsak pH'sını düşürür ve patojen bakterilerin tutunmasını da engellerler (Monsan ve diğ. 2001, Mozzi ve diğ. 2006, Patel ve diğ. 2012, Ateş 2015).



Şekil 1.4: Levan'ın yapısı (Harutoshi 2013)



Şekil 1.5: İnülin'in yapısı (Harutoshi 2013)

Heteropolisakkaritler (HePS) kimyasal yapıları, molekül ağırlıkları, verim ve işlevsellikleri bakımından oldukça farklılıklar gösterir. Ağırlıklı olarak D-glikoz, D-galaktoz ve L-ramnozdan oluşan tekrarlayan polimerize birimlerdir. Bunların yanı sıra N-asetilglukozamin, N-asetilgalaktozamin veya glukuronik asit, bazen fosfat, asetil ve gliserol de bulunabilir (Badel 2011). HePS'lerin sentezi HoPS'lerden farklı olarak hücre içinde glikoziltransferaz aktivitesi ile gerçekleşir, daha sonra hücre dışı polimerizasyon için izoprenoid glikozil taşıyıcı prekürsör lipidlerle taşınarak hücrenin etrafını sararlar (Mozzi ve diğ. 2006, Nwodo ve diğ. 2012). *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ve *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus* ve *S. thermophilus* başlıca HePS üreten bakteri türleridir (De Vuyst ve diğ. 2001).

1.2.3 LAB'ler Tarafından Üretilen EPS'nin Sağlıkla İlişkisi

LAB tarafından üretilen doğal biyopolimerler olan EPS'lerin insan sağlığı açısından da son derece önemli olduğu bilinmektedir. Antioksidan, prebiyotik, anti-tümör, immüno-modülasyon, antiinflamatuvar, proinflamatuvar ve kolesterol düşürücü aktiviteler gibi sağlık üzerine olumlu etkilere sahip olduklarından gıda endüstrisinde değerli bileşenler olarak kabul edilirler (Patel ve diğ. 2010, Patel ve diğ. 2014, Ryan ve diğ. 2014, Zannini ve diğ. 2016, Kim ve diğ. 2017, Abid ve diğ. 2018, Bengoa ve diğ. 2018).

1.2.3.1 EPS'lerin Prebiyotik Etkileri

Probiyotikler, belirli miktarlarda alındıklarında konakçısına bir sağlık yararı sağlayabilen canlı mikroorganizmalardır. Prebiyotikler ise bağırsak mikrobiyotasında bulunan yararlı mikroorganizmaların gelişimini ve stabilitesini sağlayarak konakçı sağlığını olumlu yönde etkileyen ve sindirilemeyen maddelerdir. Bunlar genellikle polimerizasyon dereceleri 2 ile 20 monomer arasında değişen oligosakkaritlerdir. Söz konusu prebiyotikler probiyotikler tarafından metabolize edilerek patojen mikroorganizmalara karşı bağışıklık geliştirirler. Prebiyotiklerin temeli oligosakkaritlere dayanır. Galaktooligosakkaritler (GOS) ve fruktooligosakkaritler (FOS) önemli prebiyotikler olarak bilinmektedir. LAB tarafından üretilen poli ve heterooligosakkaritler potansiyel prebiyotiklerdir. Uzun karbonhidrat zincirlerine sahip olan EPS'ler kısa zincirli olanlardan daha yavaş metabolize edileceğinden gastrointestinal sistemde daha uzun süre kalarak prebiyotik etki yapabildiği düşünülmektedir. Ayrıca EPS'lerin probiyotik mikroorganizmalar tarafından üretilen kısa zincirli yağ asitleri ile birlikte sindirim sisteminde iyi bir prebiyotik etki gösterdiği de bildirilmiştir (Tsuda ve Miyamoto 2010, İsmail ve Nampoothiri 2010, Badel ve diğ. 2011, Harutoshi 2013, Saad ve diğ. 2013). Söz konusu prebiyotik etki probiyotik suşların EPS'leri parçalayabilen enzimlere sahip olmasından ileri gelmektedir (Dal Bello ve diğ. 2001, O'Connor ve diğ. 2005). *L. plantarum* tarafından üretilen bir HoPS olan α -D glukon tipi EPS'nin prebiyotik aktivite gösterdiğini ortaya koyan bir çalışmada, *in vitro* ortamda hazırlanmış yapay mide suyunda probiyotik bakterilerin iyi gelişme gösterdikleri tespit edilirken, probiyotik olmayan *Enterobacteriaceae* gibi bakterilerin zayıf gelişme gösterdiği rapor edilmiştir (Das ve diğ. 2014). Diğer yandan *L. sanfranciscensis*'den üretilen bir HoPS olan levan tipi EPS'nin bifidojenik etkisinin olduğu bildirilmiştir (Dal Bello ve diğ. 2001). Bilindiği gibi, *Bifidobacterium* türlerinin çoğalmaları ve aktivitelerini sürdürebilmeleri için "bifidus ya da bifidojenik faktörler" olarak bilinen N-asetilglukozamin gibi amino şekerlere, fruktooligosakkaritler ve laktuloz gibi karbonhidratlara ihtiyaç vardır (Yılmaz-Ersan ve diğ. 2016). *Weissella cibaria*, *Weissella confusa*, *L. plantarum* ve *Pediococcus pentosaceus* tarafından üretilen EPS'lerin probiyotik olan *Bifidobacterium bifidum* tarafından karbon kaynağı olarak kullanılabilmesinin yanısıra mide asidi ve bağırsak, pankreatik amilazının hidrolizine karşı yüksek direnç göstermelerinden dolayı aynı bakterilerin bağırsak florasında

sayılarının artmasını sağlamaktadır. Nitekim; yukarıda adı geçen türler tarafından üretilen EPS'lerin oldukça iyi prebiyotik aktivite gösterdikleri rapor edilmiştir (Hongpattarakere ve diğ. 2012).

EPS'ler vücuda yeterli miktarlarda alındığında canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanan probiyotik mikroorganizmaların büyümesini teşvik ederek, konakçı sağlığı üzerinde olumlu etkiler yaratır ve bağırsak mikrobiyotasını pozitif yönde modüle eder (Das ve diğ. 2014, Caggianiello ve diğ. 2016). Prebiyotik karbonhidratları fermente edebilme yeteneği hem tür hem de substrata özgü bir özellik olduğundan prebiyotik ve probiyotikleri bir arada bulunduran sinbiyotik ürünlerin insan sağlığı üzerinde daha fazla olumlu etkileri olduğu öne sürülmektedir (Gopal ve diğ. 2001, Kaplan ve Hutkins 2003, Huebner ve diğ. 2007, Kekkonen ve diğ. 2007, Das ve diğ. 2014). Sinbiyotik ürünler, probiyotik mikroorganizmaların prebiyotik içeren ürünlerde gelişmelerinin teşvik edildiği, sağlık ve beslenme metabolizmasını düzenleyici ve iyileştirici potansiyeli yüksek fonksiyonel gıdalardır (Yılmaz-Ersan ve diğ. 2016). LAB tarafından üretilen EPS'lerin prebiyotik olarak kullanıldığı uygulamalar sınırlı olduğundan, EPS üreten bir LAB suşunun fermente gıdalarda doğrudan starter olarak kullanılması, sinbiyotik ürünlerin gelişmesine katkıda bulunabilir (Tsuda ve Miyamoto 2010). EPS'lerin prebiyotik özellikler göstermesinin yanısıra bağırsak florasında LAB türlerinin kolonizasyonunu kolaylaştırması, zorlu sindirim koşullarına direnç göstermesi ve konak bağışıklık sistemini güçlendirmesi gibi probiyotik açıdan önemli fonksiyonları vardır (Lebeer ve diğ. 2007, Salazar ve diğ. 2009, Fanning ve diğ. 2012^a, Hidalgo-Cantabrana ve diğ. 2012). Yapılan bir çalışmada *L. sanfranciscensis* tarafından üretilen levan tipi EPS'nin prebiyotik özellikleri incelenmiştir. Sonuç olarak; sağlıklı insanların dışkı örneklerinden alınan bakteriler tarafından tek karbon kaynağı olarak kullanılan levanın fermantasyonu sonucunda bifidobakterlerin sayısı artmış ancak laktobasillerin sayısında azalma gözlenmiştir. Bifidojenik etki *in vitro* olarak tespit edilmiş ancak model sistemde prebiyotik etki değerlendirilememiştir (Badel ve diğ. 2011). Probiyotik bakterilerin bağırsak florasında tutunabilme ve kümeleşebilme yetenekleri söz konusu ortamlarda kolonize olabilmeleri açısından oldukça önemlidir. Bu durum konakçı-bakteri ilişkisi ile doğrudan alakalı olup EPS'nin sağlık üzerinde yararlar gösterebilmesini de etkilemektedir. EPS'nin söz konusu ilişkideki anahtar rolü, kimyasal yapı ve karakteristiğine bağlı olarak bağışıklık

sistemi üzerinde farklı etkilerde bulunmasıdır (Hidalgo-Cantabrana ve diğ. 2012). Örneğin yapılan bir çalışmada yüksek moleküler ağırlığa sahip EPS üreten *L. casei* subsp. *shirota* ile daha az EPS üreten EPS mutant suşlar fare makrofaj hücrelerindeki sitokin üretimleri açısından karşılaştırılmış ve doğal türün sitokin oluşumundaki uyarısı, mutant türlere göre daha fazla bulunmuştur. Bu sonuç EPS'nin immün sistemi etkileyici özellikte olduğunu göstermiştir (Yasuda ve diğ. 2008). Benzer olarak bu etki EPS üreten ve üretmeyen *L. plantarum* ve *L. rhamnosus* RW-9595M suşlarında da tespit edilmiştir (Bleau ve diğ. 2010, Remus ve diğ. 2012).

1.2.3.2 EPS'lerin Antioksidan Aktiviteleri

Son yörüngesinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron bulunduran atom veya moleküller serbest (reaktif) radikaller olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikaller eşlenmemiş elektron bulundurduklarından dolayı kararsız yapıda olup diğer maddelerle reaksiyona girerek kararlı duruma geçme eğilimindedirler. Reaktif oksijen maddeleri (ROS) arasında; süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil ($\cdot OH$), peroksil (ROO), lipid peroksil ve alkoksil ($RO\cdot$) radikalleri bulunmaktadır (Kaur ve Kapoor 2001, Xu ve diğ. 2011^a, Karabulut ve Gülay 2016^a). Hidroksil ve süperoksit anyon radikalleri oksijen metabolizmasından elde edilen yüksek oranda reaktif moleküllerdir. Bunlar genellikle biyolojik reaksiyonların yan ürünleridir. Endojen ya da ekzojen kaynaklı olabilirler. Endojen kaynaklı olarak en önemli üretim yeri mitokondri iken; ekzojen kaynaklı üretimi ise UV ışınlar ve çeşitli kimyasal maddelerdir. ROS'lerin düşük yoğunluklarda bulunmaları halinde hücre fizyolojisinde yararlı etkilerinden söz edilebilir ancak yoğunlukları arttığı durumlarda lipidlere, hücre membranlarına, karbonhidratlara, proteinlere, DNA ve nükleotid koenzimler üzerinde yapısal bozukluklara neden olarak zararlı etkilere yol açabilirler (Finkel ve Holbrook 2000, Melov ve diğ. 2000, Liu ve diğ. 2011, Karabulut ve Gülay 2016^a). Söz konusu zararların başında yaşlanmanın hızlanmasında etkisi olduğu gibi kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, bağışıklık sisteminde zayıflama ve gastrointestinal hastalıklar başta olmak üzere birçok hastalıklara sebep olmaktadır (Pan ve Mei 2010, Zhang ve diğ. 2013, Seo ve diğ. 2015). Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve kararlı hale getirme

yeteneğine sahip maddelere “antioksidan” adı verilir. Antioksidan maddeler mevcut radikallerle reaksiyona girerek bunların daha zararlı formlara dönüşmelerini ve yeni serbest radikal oluşumunu önleyerek ya da oksijen radikalini yakalayan ve radikal zincir reaksiyonlarını kırarak etki gösterirler (Ou ve diğ. 2002, Koca ve Karadeniz 2003). Antioksidanlar da reaktif oksijen türleri gibi endojen veya ekzojen kaynaklıdırlar. Serbest radikallerin artmasıyla, endojen antioksidanlar yetersiz kalabilmekte ve bu durum ekzojen antioksidanların dışarıdan alınmasını gerektirmektedir (Karabulut ve Tülay 2016^b).

Hemen hemen tüm organizmalar antioksidan savunma ve onarım sistemlerine sahip olsalar da bu sistemler ROS'nin neden olduğu hasarı önlemekte yetersiz kalmaktadırlar. Bu nedenle, ROS'lerin oluşturabileceği hasarlardan korunmak amacıyla gıdalara sıklıkla ekzojen kaynaklı bütillendirilmiş hidroksitoluen (BHT) ve bütillendirilmiş hidroksianizol (BHA) gibi birçok sentetik antioksidan ilave edilmektedir. Sentetik antioksidanların oksidasyon sürecini yavaşlatmada oldukça başarılı olduğu kanıtlanmış olsa da sağlık açısından yaratabileceği olumsuz yan etkileri ve toksisiteleri büyük endişe kaynağı oluşturmaktadır. Nitekim söz konusu sentetik antioksidanların bazı ülkelerde gıdalarda kullanımı kanserojenik etkisi olabileceği şüphesinden dolayı yasaklanmış veya sınırlandırılmıştır. Bu nedenle, insan vücudunu serbest radikallerden korumak ve birçok kronik hastalığın ilerlemesini geciktirmek amacıyla doğal, toksik olmayan antioksidanlara daha fazla önem verilerek kullanımları yaygınlaşmaya başlamıştır (Pan ve Mei 2010, Wang ve diğ. 2011, Sevim 2011, Zhang ve diğ. 2013). Son yıllarda yapılan araştırmalar mikrobiyal kaynaklardan izole edilen bazı polisakkaritlerin antioksidan aktivite özelliklerinin beraberinde düşük sitotoksositeye sahip olduğunu göstermiştir. LAB tarafından üretilen EPS'lerin söz konusu sentetik antioksidanların yerine kullanılabilmesi fikri son yıllarda yapılan birçok çalışmanın odağını oluşturmuştur (Valentao ve diğ. 2002, Li ve diğ. 2014, Xing ve diğ. 2015).

Dilna ve diğ. (2015) probiyotik özelliği olan *L. plantarum* RJF4 tarafından üretilen, glikoz ve mannoz şekerlerinden oluşan bir HePS EPS'nin antioksidan özelliklerini incelemişlerdir. Kontrol olarak kullanılan askorbik aside nazaran söz konusu EPS'nin daha iyi antioksidan özelliklere sahip olduğunu ve ayrıca bu durumun yanı sıra kolesterol seviyesini düşürme ve α -amilaz enzimini inhibe etme kabiliyetine de sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Seo ve diğ. (2015) yaptıkları bir

çalışmada probiyotik *L. plantarum* YML009 tarafından üretilen EPS'nin gıda katkı maddesi olarak veya doğrudan ilaç olarak kullanımını araştırmışlar, söz konusu suşun antioksidan aktivitesi incelendiğinde önemli ölçüde yüksek antioksidan kapasiteleri olduğunu tespit etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlar, *L. plantarum* YML009'dan üretilen EPS'nin var olan veya biriken ROS'lerinin temizlenmesinde ve antioksidan aktivitesinin pozitif yönde regülasyonunda etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca sadece ROS birikimi riskini azaltmakla kalmayıp, aynı zamanda süperoksit anyonunu ve hidrojen peroksiti de indirgemesinde dolayı doğal bir antioksidan olduğu, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasara ve hastalıklara karşı önemli bir rol oynayabileceği bildirilmiştir. Pan ve Mei (2010) tarafından fermente bir ürün olan kimchi'den izole edilmiş *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12 suşunun ürettiği fruktoz ve ramnoz şekerlerinden oluşmuş HePS EPS'nin hem *in vitro* hem de *in vivo* ortamda antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Araştırma sonucuna göre; *in vitro* şartlarda yüksek değerlerde antioksidan aktivitesi gösterdiği, EPS konsantrasyonu arttıkça söz konusu bu antioksidan aktivitesinin de fark edilir oranda arttığı rapor edilmiştir. *In vivo* ortamda ise farelere yapılan EPS uygulaması, lipid peroksidasyonu seviyesini önemli ölçüde inhibe etmiş, CAT (H₂O₂ ayrışmasına bağlı olarak absorbans azalışı) ve SOD (ksantin oksidaz sistemi ile oksidasyonunu inhibe etme kabiliyeti) da dahil olmak üzere antioksidan aktivitelerini artırmıştır. Nitekim, araştırmacılar çalışmalarından elde ettikleri verilere göre EPS'nin lipid peroksidasyon riskini azalttığını ve toplam antioksidan aktivitesini pozitif yönde etkilediğini önermiştir. Zhang ve diğ. (2013) geleneksel fermente Çin tofusundan izole edilmiş *L. plantarum* C88 tarafından üretilen galaktoz ve glikoz şekerlerinden oluşan bir HePS EPS'nin, *in vitro* ortamda kolon adeno karsinoma hücresi olan Caco-2 doku hücrelerinde H₂O₂ yaralanmalarına karşı belirgin bir antioksidan aktivite gösterdiğini rapor etmiştir. Ayrıca malondialdehit (MDA) oluşumunu inhibe ettiği, EPS konsantrasyonuna paralel olarak SOD ve toplam antioksidan aktivitesini artırdığını da ortaya koyan söz konusu çalışmada EPS'nin, ROS'lerin hücre ortamından uzaklaştırılması, antioksidan aktivitelerin regülasyonu ve lipid peroksidasyonu önlenmesinde önemli etkilere sahip olduğu ortaya konulmuştur. Aynı çalışmada kullanılan EPS'nin, doğal bir ajan olarak fonksiyonel gıdalarda kullanılabileceği önerilmektedir.

1.2.3.3 EPS'lerin Süperoksit Anyon Süpürme Aktiviteleri

Süperoksit anyon radikali biyolojik makromoleküllerle reaksiyona giren ve doku hasarına neden olan aktif serbest radikallerin öncülerindedir. Hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve singlet oksijeni gibi diğer ROS'lerin oluşumunda da önemli rol oynamaktadır. Dahil oldukları reaksiyonlarda indirgen veya yükseltgen olarak davranabilirler. Süperoksit anyon radikal üretimi enzimatik veya enzimatik olmayan elektron transferleri sonucunda gerçekleşebilmektedir (Kaur ve Kapoor 2001, Liu ve diğ. 2009, Sevim 2011).

EPS'nin süper oksit anyon süpürme aktivite mekanizması; ortamda bulunan süperoksit radikal iyonları ile birleşerek kararlı radikaller oluşturması ve böylece serbest radikal zincir reaksiyonunu sona erdirmesi ile gerçekleşmektedir (Wang ve diğ. 2009, Lin ve diğ. 2009, Zhang ve diğ. 2016).

1.2.3.4 EPS'lerin Hidroksil Radikali Süpürme Aktiviteleri

ROS'ler arasında hidroksil radikali, en reaktif tür olmasından dolayı seri bir şekilde lipid radikalleri oluşturarak lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonlarını başlatır. Canlı hücrelerdeki tüm biyomakromoleküllerle reaksiyona girebilir ve biyomoleküllerin oksidatif hasarlanmalarına neden olurlar. Söz konusu bu durum gıda sistemlerinde veya hücrelerde antioksidan etkinliğinin sağlanabilmesi için ortamlardan hidroksil radikallerinin uzaklaştırılmasını gerektirmektedir. Hidroksil radikali, geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır (Milardovic ve diğ. 2006, Liu ve diğ. 2007, Peng ve diğ. 2009, Huang ve diğ. 2012, Özcan ve diğ. 2015).

Çeşitli doğal polisakkaritlerin hidroksil radikali süpürme aktivitesi ile ilgili yapılan çalışmalarda, söz konusu polisakkaritlerin Fe^{+2} ve Cu^{+2} gibi şelatlama iyonları ile birleşerek hidroksil radikallerinin oluşumunu engellediği ve buna bağlı olarak gerçekleşecek hidrojen veya elektron ayrılma mekanizmalarını inhibe ettiği öne sürülmüştür (Pan ve Mei 2010, Xu ve diğ. 2011^a, Li ve Shah 2014).

1.2.3.5 EPS'lerin Serbest Radikal Süpürme Aktiviteleri

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali, antioksidanların serbest radikal süpürücü aktivitelerini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan stabil formda serbest nitrojen radikaldır (Huang ve diğ. 2005, Zhang ve diğ. 2013). Zhang ve ark. (2013) geleneksel fermente bir ürün olan Çin tofusundan izole edilen *L. plantarum* C88 tarafından üretilmiş galaktoz ve glikoz şekerlerinden oluşan bir HePS EPS'nin *in vitro* ortamda 4 mg/ml EPS konsantrasyonda %52,23 DPPH serbest radikal süpürme aktivitesinin olduğunu tespit etmişlerdir. Xu ve diğ. (2010) *Bifidobacterium animalis*'den elde edilen EPS ile yaptıkları bir çalışmada, DPPH serbest radikal süpürme aktivitesinin kontrol grubu olan askorbik asit ile eşdeğer oranda olduğunu ve söz konusu EPS'nin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak DPPH radikal süpürme aktivitesinin de arttığını bildirmişlerdir. Muhtemel aktivitenin EPS içindeki diğer antioksidan bileşenlerin varlığına bağlı olabileceği ve söz konusu bileşiklerle etkileşime girerek sinerjik olarak güçlü antioksidan aktivite sergilediklerini düşünmüşlerdir. Bu çalışmada *Bifidobacterium animalis* EPS'sinin doğal bir ajan olarak fonksiyonel gıdalarda potansiyel uygulamaya katkıda bulunabileceği önerilmiştir. Ayrıca polisakkarit yapısındaki karbon atomlarındaki artan yük yoğunluğuna bağlı olarak radikalleri süpürme aktivitesinin artabildiği çalışmalarda belirtilmiştir (Seo ve diğ. 2015, Kim ve Shin 2015).

1.2.3.6 EPS'lerin İmmün Modülasyon Özellikleri

Kanser hastalığının gittikçe yaygınlaştığı günümüz koşullarında özellikle kolorektal kanser tüm dünyada kansere bağlı ölümlerin önde gelen başlıca nedenidir. EPS'ler doğal anti tümör aktivitesi ile çeşitli kolon kanseri hücre hatlarının proliferasyonu üzerindeki inhibitör etkilerinden dolayı hastalığın önlenmesine yardımcı olabileceğinden son yıllarda yapılan birçok çalışmanın odağını oluşturmuştur (Li ve diğ. 2015, Karunanithi ve Levi 2018, El-Deeb ve diğ. 2018).

Kanser, bazı etkilerle değişime uğramış hücrelerin kontrolsüz hücre proliferasyonu ile oluşarak tümör adı verilen kitle oluşumuna yol açan ve vücut içerisinde gerek lokal gerek uzak noktalara yayılabilen kompleks hastalıklar grubudur. Tümörlerin bazıları iyi huylu olup, hızlı büyümelerine rağmen sadece

buldukları yerde kalırlar. Bunların cerrahi işlemlerle alınması sonucu söz konusu problem ortadan kalkar. Bazı tümörler ise kötü huylu olup, hücreleri buldukları yerden ayrılarak kan yoluyla vücudun diğer bölgelerine taşınır ve buralara yerleşerek çoğalırlar. Normal şartlar altında hücreler belli bir kontrol altında ihtiyaca göre bölünerek çoğalırlar. Hücreler bir taraftan programlı ölüm (apoptoz) ile yok olurken, diğer taraftan da büyüme faktörlerinin etkisiyle çoğalırlar. Büyüme faktörleri normalde DNA'daki çeşitli genlerin aktivitesi sonucu oluşan proteinlerdir. Bahsedilen genler mutasyona uğrayarak hücrelerin aşırı büyümesine sebep olurlarsa dokularda kanser oluşur (Pavlopoulou ve diğ. 2015, Anonim 2016). Tümör hücreleri, normal hücrelerde bulunmayan aşırı büyüme hızı, lokal invazyon, diferansiasyon, kalıcı anjiyogenez, anaplazi ve metastaz gibi bir takım farklı özellikler gösterirler (El-Deeb ve diğ. 2018).

Cerrahi ve radyoterapi lokal tedavi yöntemleri olup, onların arkasından kemoterapi ve immünoterapi gibi sistemik tedaviler uygulanmaktadır. Kemoterapi çoğu kanser hastalıklarında temel tedaviyi temsil eder. Kemoterapi uygulamasında kullanılan anti tümör ajanların güçlü bir aktiviteye sahip olmasına rağmen, sitotoksik ilaçlarla yapıldığından dolayı birçok yan etkileri (bulantı, kusma, yorgunluk, hematopoetik baskılama ve immünotoksisite gibi) bulunmaktadır (Wang ve diğ. 2014). Ayrıca uygulanan kemoterapötik ajanların çoğu aktif bölünen hücreleri hedef aldığından sağlıklı hücre kanserli hücre ayırımı yapamaz ve sağlıklı hücre hasarına yol açar. Bunların yanı sıra uygulanan ilaca özgü kazanılmış dirençler, lokal nüks ve uzak metastaz riski kolon kanseri kemoterapisinde uygulamalarını sınırlandırmıştır. Normal sağlıklı hücreleri etkilemeden seçici olarak kanser hücrelerini öldürebilen veya en azından terapötik dozları düşürmek ve geleneksel anti tümör ilaçlarının verimliliğini arttırmak için adjuvan (destekleyici, tamamlayıcı) olarak görev yapabilen hedefe yönelik terapilere ihtiyaç vardır. Bu nedenle LAB gibi güvenli doğal kaynaklardan üretilen EPS'nin sağlık üzerine olumlu etkileri, kolon kanserinin önlenmesi ve tedavisi için sentetik anti tümör ajanları yerine alternatif olarak kullanılabileceği birçok çalışmada ön görülmüştür (Zhao ve diğ. 2012, Gunnarsson ve diğ. 2013, Karunanithi ve Levi 2018, El-Deeb ve diğ. 2018).

Polisakkaritlerin anti tümör aktivitesi, monosakkarit kompozisyonu, moleküler ağırlık, polimerik omurganın yapısı, yan zincirler ve hatta dallanma noktalarının sayısı gibi birçok faktörden etkilenmektedir. Ayrıca mannoz ve glukoz

kalıntılarının varlığı ve tekrarlama ünitesinde dallanma noktalarının mevcut olması gibi diğer yapısal özellikler anti tümör aktivitelerini arttırmada etkilidir (Jianga ve diğ. 2014).

Wang ve diğ. (2014) geleneksel fermente bir ürün olan Çin Pao Cai'den izole edilmiş *L. plantarum* 70810 suşu tarafından üretilen CPS'nin HepG-2 (karaciğer kanseri hücresi), BGC-823 (mide kanseri hücresi) ve HT-29 (kolon kanseri hücresi) hücrelerine karşı *in vitro* ortamda anti tümör aktivitelerini konsantrasyona ve zamana karşı incelemiştir. *In vitro* ortamda yapılan anti tümör aktivitesi analizleri sonucunda CPS'nin HepG-2, BGC-823 ve özellikle HT-29 tümör hücreleri üzerinde kullanılan EPS konsantrasyonuna ve zamana bağlı olarak önemli bir anti tümör aktivitesi gösterdiği rapor edilmiştir. Elde edilen veriler *L. plantarum* 70810 tarafından üretilen CPS'nin kanser hastalarında doğal kaynaklı anti tümör ilaç takviyesi olarak kullanılmaya uygun olabileceğini ortaya koymuştur.

Zhang ve diğ. (2016) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise Finlandiya'ya ait geleneksel fermente bir süt ürünü olan viili'den izole edilmiş *L. plantarum* ZDY2013 suşu tarafından hem normal EPS hem de sülfatlanmış bir gruba sahip olan EPS üretilerek saflaştırılmıştır. Çalışmanın devamında üretilen iki farklı türdeki EPS grubunun antioksidan aktiviteleri ve Caco-2 hücreleri üzerinde *Bacillus cereus* enterotoksinlerin neden olduğu sitotoksitesisi incelenmiştir. Nitekim; sülfatlanmış EPS'nin normal EPS'ye nazaran daha yüksek radikal süpürme aktivitesine sahip olduğu ve mevcut sitotoksitesinin önlenmesinde sülfatlanmış EPS'nin patojenik *B. cereus* toksinlerine karşı antagonistik etkisinin daha güçlü olduğu belirlenmiştir. Sülfatlanmış EPS'nin *B. cereus* toksinlerine karşı gösterdiği etki mekanizmasının oksidatif hasarı azaltma kabiliyeti ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Elde edilen sonuçlar ile *L. plantarum* ZDY2013 suşundan üretilen EPS'nin terapötik amaçlı kullanımlar için umut verici bir aday olabileceğini ve EPS'nin biyolojik aktivitelerini iyileştirmek için sülfonasyonun etkili bir strateji olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Choi ve diğ. (2006) yaptıkları çalışmada *L. acidophilus* 606'dan üretilen polisakkaritlerin HT-29 hücrelerinde etkili anti tümör aktivitesi ve uyarılmış apoptoz etkisi gösterdiğini ortaya koymuştur. Ewaschuk ve diğ. (2006) *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum* ve *Streptococcus thermophilus*'un HT-29 ve Caco-2 hücrelerinin canlılığını azalttığını ve apoptozisi uyardığı bildirmişlerdir. Bu bilimsel veriler ışığında yapılan bir başka çalışmada ise

EPS'nin HT-29 apoptozisini uyardığı ve dolayısıyla insan kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir (Liu ve diğ. 2011). *L. plantarum* 17C suşunun kolorektal kanser hücresi HT-29'a karşı güçlü bir anti tümör etkisine sahip olduğu bulunmuştur (Haghshenas ve diğ. 2015). Bebek dışkılarından izole edilmiş 138 adet *Lactobacillaceae* takımı türüne ait suşun içerisinde 10 tanesinin HT-29 hücrelerine karşı anti-proliferatif etkinliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Söz konusu çalışmada *Lactobacillaceae* suşlarında hücre duvarının bileşiminin HT-29 hücrelerinde apoptozisi teşvik eden başlıca faktör olduğu anlaşılmıştır (Riaz Rajoka ve diğ. 2017).

EPS'nin anti tümör aktivite özelliğinin yanı sıra bağışıklık sistemini düzenleyici etkileri de çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Vinderola ve diğ. 2006, Harutoshi 2013, Wang ve diğ. 2014). Bu çalışmalarda araştırılan en önemli parametreler arasında IL-6, IL-10, IL-12 ve TNF- α gibi sitokinler üzerinde EPS'nin etkisi sayılabilmektedir. Söz konusu parametreler EPS kimyasal yapısına bağlı olarak EPS direnç sistemi üzerinde baskılayıcı veya uyarıcı etkiler gösterebilmektedir (Hidalgo-Cantabrana ve diğ. 2012, Caggianiello ve diğ. 2016). EPS'nin immün sistemi üzerindeki modüle edici aktivitesi, esas olarak IL-6, IL-10 IL-1 β ve TNF- α üretimini indüklemesi ve yarattığı fagositoz etkisi ile ortaya çıkmaktadır. Özellikle vücudumuzda ROS gibi yüksek seviyedeki serbest radikallerin zararlı hale gelmesi anında söz konusu etki oluşmaktadır (Liu ve diğ. 2011, Patten ve diğ. 2014).

El- Deeb ve diğ. (2018) *L. acidophilus* DSMZ 20079'dan saflaştırdıkları EPS'nin, farklı kanser hücre hatları üzerindeki anti-tümör ve immünomodülatör etkilerini, özellikle Caco-2 hücre hattına selektif sitotoksik etkisini değerlendirmişlerdir. Söz konusu çalışmada EPS uygulamasından sonra MCF7 (meme kanseri hücresi) ve Caco-2 hücrelerinin canlılık inhibisyonu sırasıyla %71,86 ve 80,65 olarak bulunurken; hücresel proliferasyon inhibisyonu da sırasıyla %78,95 ve 87,27 bulunmuştur. Bu oranların tedavi edilmeyen hücrelerden önemli ölçüde farklı olduğu görülmüştür. Araştırmacılar aynı çalışmada EPS tarafından hücrelerde immün cevabın uyarıldığını ve tüm hücre tiplerinde bulunan bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B inflamatuvar yolunun inaktive edildiğini rapor etmişlerdir. Kanser hücrelerinin mevcut terapötik uygulamalarına yeni yöntemler sağlamanın yanı sıra apoptotik mekanizmalarla tümör hücreleri üzerinde doğrudan sitotoksik etki uyguladığı ortaya koyulan bu çalışmada, *L. acidophilus*'dan üretilen EPS'nin kolon

kanseri üzerindeki etkilerinin çok umut verici olduğu düşünülmektedir. Ancak *in vivo* çalışmalarda EPS ve konakçı bağışıklık sistemi arasındaki olası etkileşimleri tanımlamanın da gerekli olduğu belirtilmiştir.

Liu ve diğ. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada probiyotik olan *L. paracasei* subsp. *paracasei* NTU101 ve *L. plantarum* NTU102 suşlarından elde edilen EPS'lerin *in vitro* ortamda antioksidan ve immün modülasyon aktiviteleri incelenmiştir. Söz konusu suşlardan üretilen EPS'lerin konsantrasyona bağlı olarak Raw 264.7 hücre hattında (IL-6, TNF- α ve IL-1 β dahil) sitokin üretimini indüklediği ve immün modülatör aktivitesi mekanizmasında aktif rol alan Toll benzeri antijen önleyici hücreleri uyarak sitokin oluşumunu indüklediği belirlenmiştir. Ayrıca aynı çalışmadan elde edilen veriler, EPS'lerin makrofajların üretimini artırarak fagositoz uyarılmasına aracılık etmede anahtar faktörler olabileceğini de düşündürmüştür. Probiyotik bakterilerin immün düzenleyici etkileri, hücre içerisinde sitokin üretimini indüklemeye veya geliştirme kapasiteleri ile ilgilidir. Liu ve diğ. (2011) *L. casei shirota* suşunun yararlı aktivitesinin bir kısmının IL-12 ve TNF- α üretimini uyarma yeteneğinden kaynaklandığını ifade etmiştir.

1.2.3.7 EPS'lerin Kolesterol Seviyesi Azaltma Üzerine Etkileri

Kolesterol insan vücudunda hayati öneme sahip olup, tüm hücre zarlarının bileşeni, safra tuzları ve steroid hormonlarının öncülü olarak görev alır. Ancak kandaki kolesterol seviyesinin yükselmesi kardiyovasküler hastalıkların (KVH) oluşmasında en önemli risk faktörüdür. WHO tarafından KVH'lerin dünya çapında ölümlerin %31'inden sorumlu olduğunu ve 2015 yılında dünyada 17,7 milyon insanın ölüm nedeninin KVH olduğu açıklanmıştır. Önümüzdeki yirmi yıl içinde önde gelen ölüm nedenleri arasında olmaya devam edeceğini bildirilmiştir ve 2030 yılına kadar, KVH'ler dünya çapında yaklaşık 23,3 milyon insanı etkileyeceği tahmin edilmektedir. Ayrıca WHO 40 ve üzeri yaşlarda olan insanların kan serumunda bulunan kolesterolün %10'luk bir azalmanın kalp hastalığı oluşma ihtimalini %50 oranında azaltabileceğini bildirmiştir (WHO 2017). Bu nedenle kan serumundaki kolesterol seviyesinin düşürülmesi hastalıkların önlenmesi bakımından büyük önem taşımaktadır. İlaç tedavisi, diyet düzenlemesi ve mevcut yaşam tarzında alınan önlemler kan kolesterol seviyelerini düşürmede etkili ama yetersiz kalmaktadır

(Ahire ve diğ. 2012, Tsai ve diğ. 2014). Bunun üzerine son yıllarda, kandaki yüksek kolesterol seviyelerinin düşürülmesinde yeni yaklaşımlar söz konusu olmuş ve probiyotik bakterilerin kullanımına yönelinilmiştir. Konu üzerinde birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışma yapılmış ve özellikle belirli *Lactobacillus* türlerini içeren probiyotik ürünlerin kandaki yüksek kolesterol seviyelerini azalttığı bildirilmiştir (Alp ve Ertürkmen 2017). Probiyotiklerin hipokolesterolemik etkileri üzerine yapılan çalışmalardan birinde, uygun suş (lar) ile fermente edilen süt ürünlerinin, kan dolaşımındaki kolesterol seviyesinde azalmaya neden olabileceği sonucuna varılmıştır (Pereira ve Gibson, 2002). Laktobasillerin önemli bir metaboliti olan EPS'lerin özellikle kolesterol düşürücü potansiyelleri araştırılmıştır (Ruas-Madiedo ve diğ. 2009, Tsai ve diğ. 2014, Lynch ve diğ. 2018).

Nakajima ve diğ. (1992)'nin yaptıkları bir çalışmada EPS üretimi olan ve olmayan iki *L. lactis* subsp. *cremoris* suşunun kolesterolü bağlama yetenekleri araştırılmıştır. EPS üretebilen suşun, üretemeyen suşa kıyasla daha fazla kolesterolü bağlayabildiği sonucuna varılmış, bu durum polisakkaritlerin diyet lifi etkisi göstermesi ile ilişkilendirilmiş ve fazla kolesterolün üretilmiş EPS'ye bağlanarak dışkı yolu ile atıldığı düşünülmüştür. Dilna ve diğ. (2015)'nin yaptıkları çalışmada çürümüş Jack meyvesinden izole edilmiş *L. plantarum* RJF₄ tarafından üretilen, glukoz ve mannoz birimlerinden oluşan bir HePS EPS'nin kolesterol seviyesini düşürebilme yeteneğini incelemiştir. Yapılan analizler sonucunda *L. plantarum* RJF₄'den elde edilen EPS ilavesiyle serum kolesterol seviyesinin %42,24 oranında azaltılabildiği ve bu azalmanın adsorpsiyon yoluyla gerçekleştirildiği vurgulanmıştır. Aynı çalışmada dekstranlardan oluşan EPS'nin kullanılması halinde mevcut kolesterol fazlalığının giderilemediği bildirilmiştir. Sasikumar ve diğ. (2017)'in yaptığı çalışmada Jack meyvesinden izole edilmiş *L. plantarum* BR2 suşu tarafından üretilen EPS'nin kolesterol düşürme yeteneği incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; EPS ilavesi ile serum kolesterol seviyesinde %47,5 oranında azalma olduğu belirlenmiştir. Ancak EPS'nin kolesterol düşürme mekanizmasının tam olarak açıklanamadığı çalışmada, bazı EPS üreten probiyotik suşların serbest safra asitlerini bağlayarak vücuttan atılımı arttırabileceği ve söz konusu serbest safra tuzları vücuttan atıldığı için de karaciğer tarafından yeni safra asitleri sentezine yol açarak kandaki kolesterol seviyesini düşürdüğü düşünülmüştür. Böylece EPS'nin gıdalara

ilave edilmesi ile kandaki kolesterol seviyesinin bir dereceye kadar düşürülmesine yardımcı olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Yapılan birçok çalışmada genel olarak EPS'nin serum kolesterolü düşürücü yeteneğinin vücuttaki mekanizması hakkında kesin olarak bilgi verilememiş, çeşitli olası mekanizmalar önerilmiştir. Bunlar; EPS'nin kolesterol düşürücü özelliğinin, EPS tarafından kolesterol adsorpsiyonundan kaynaklanabileceği (Wang ve diğ. 2009, Dilna ve diğ. 2015) veya safra tuzunu serbest asitlere parçalayarak bağırsak kanalında çözünürlük ve emilim düzeylerini artırmak suretiyle intestinal sistemden daha hızlı ve kolay uzaklaştırılmasını sağlayabilecekleri düşünülmüştür. EPS'nin serbest safra asitlerini veya kolesterolü bağlayarak vücuttan uzaklaştırılmasına yardımcı olduğu ve böylece serbest safra tuzlarının vücuttan atılması ile mevcut kolesterolden yeni safra asitlerinin sentezinin kandaki kolesterol konsantrasyonunu düşürebileceği önerilen mekanizmalar arasındadır (Welman 2009, Sasikumar ve diğ. 2017, Bhat ve Bajaj 2018).

1.2.3.8 EPS'lerin Alfa-Glukozidaz İnhibitör Aktiviteleri

Diabetes mellitus (DM), insan vücudunda insülin yokluğu, eksikliği veya periferik etkisizliği sonucu ortaya çıkan, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında bozukluklar ile seyreden, tüm dünyada görülme sıklığı gittikçe artan kronik bir metabolizma hastalığıdır. Kan şekeri seviyesinin yönetimi, bu hastalığın tedavisinde belirleyici özelliktir. Biguanidler, insülin sekretagogları ve α -glukozidaz inhibitörleri gibi oral hipoglisemik ilaçların kullanılmasıyla söz konusu hastalık kontrol altına alınabilmektedir (Lin ve Sun 2010, Cengiz-Ecemiş ve Atmaca 2012, Kazeem ve diğ. 2013).

Alfa-glukozidaz enzimler (glukoamilaz, sükröz, maltaz, dekstrinaz ve izomaltaz) kompleks karbonhidratların parçalanmasından sorumlu temel enzimler olup ince bağırsağın fırçamsı yüzeyinde bulunurlar. Kompleks karbonhidratlar ince bağırsakta amilaz enzimi aktivitesi ile oligosakkaritlere ayrışır, sonrasında oligo ve disakkaridler de monosakkaritlere ayrıştırılırlar. Monosakkaritler de bağırsak duvarından kolayca emilip kana geçerler. Normalde karbonhidratlar primer olarak hızlı bir şekilde distal duodenum ve proksimal jejunumdan absorbe olurlar. Alfa

glukozidaz inhibitörleri, yarışmacı olarak tersinir bir şekilde enzime bağlanarak, karbonhidrat absorpsiyonu ve emilimini geciktirir ve gastrointestinal yol boyunca ilerlemesini sağlar. Enzim inhibisyonunun net sonucu karbonhidratların emilimindeki gecikmedir. Alfa glukozidaz inhibitörleri glukozun emilimini etkilemez, ancak emilme yerini gastrointestinal sistemde daha distale kaydırır. Bu gecikme malabsorpsiyona neden olmaz, aksine β hücrelerine insülin salınımını artırması için zaman kazandırarak hem tip 1 hem de tip 2 DM'de tokluk aşamada plazma glukozunda azalmaya neden olur (Bayraktar 2001, Manohar ve diğ. 2002, Kim ve Nho 2004, Cengiz-Ecemiş ve Atmaca 2012).

Tokluk hiperglisemi düzeylerini düşürmenin etkili yolu, gastrointestinal glikoz emiliminde α -glukozidaz inhibitörleri tarafından karbonhidrat sindirim enzimlerinin inhibisyonunu geciktirerek olabileceği öngörülmüştür. Bu sebepten çeşitli sentetik α -glukozidaz inhibitörleri, mevcut sentetik ilaçlara göre daha fazla etki ve daha az yan etki ile alternatif bir ilaç olarak kullanılabilen bitki ekstraktları ve laktik asit bakterilerini içeren gıdaların α -glukozidaz inhibitörleri üzerinde etkilerini belirlemek için artan sayıda araştırma yapılmıştır (Mccue ve diğ. 2005, Ogunwande ve diğ. 2007, Jong-Anurakkun ve diğ. 2007). Yapılan araştırmalar sonucunda, bazı çalışmalarda α -glukozidaz inhibitör aktivitesinin, LAB'ler tarafından üretilen EPS'lerden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Ramchandran ve Shah 2009, Chen ve diğ. 2014, Sasikumar ve diğ. 2017).

Ramchandran ve Shah (2009) tarafından yapılan çalışmada, EPS üreten bir kültürün, belirli bir seviyede inülin (%3) varlığında EPS olmayan bir üretim kültürüne karşı α -glukozidaz inhibitör aktivitelerini incelemişlerdir. Alfa-glukozidaz inhibitör aktivitesi EPS içeren yoğurttaki daha belirgin olduğu sonucuna ulaşmışlardır. EPS'lerin tam olarak etki mekanizmaları bilinemediğinden mekanizmanın enzimin aktif yerine bağlanması için substrat ile rekabet ettiğini ve böylece oligosakkaritlerin disakkaritlere parçalanmasını önlediği düşünülmüştür.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

Bu çalışmada Pamukkale Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Kültür Koleksiyonunda (PUFECC) saklanan ve Zehir (2017) tarafından EPS üreticisi oldukları belirlenen tarhana kaynaklı 6 adet *L. plantarum* izolatları kullanılmıştır. Söz konusu izolatlar MRS (Merck, Almanya) sıvı besiyerinde 30 °C’de 18 saat geliştirilmiştir. Her suşun çalışma stokları %30 gliserol içeren ortamda -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

2.2 Metot

2.2.1 *L. plantarum* Suşlarından EPS Üretimi ve Saflaştırılması

EPS üretimi için, *L. plantarum* suşları (PFC308, PFC309, PFC310, PFC311, PFC312 ve PFC313) fermentör (Minifors, İsviçre) sisteminde modifiye BHI besiyerinde kesikli sistemde 30°C’de ve 100 rpm hızında karıştırılarak 18 saat süreyle geliştirilmiştir. EPS üretimi için kullanılan modifiye BHI besiyeri bileşimi Tablo 2.1’ de verilmiştir. *L. plantarum* suşları fermentöre ilave edilmeden önce 5 mL BHI besiyerinde 18 saat 30 °C’de geliştirilmiş, ardından 2 L besiyerinde yetecek hacimde (20 mL) hücreler tekrar çoğaltılmıştır. Fermantasyon ortamı 5 M NaOH ve 5 M HCl kullanılarak fermentörün otomatik sistemi ile pH 6.0’a ayarlanmıştır.

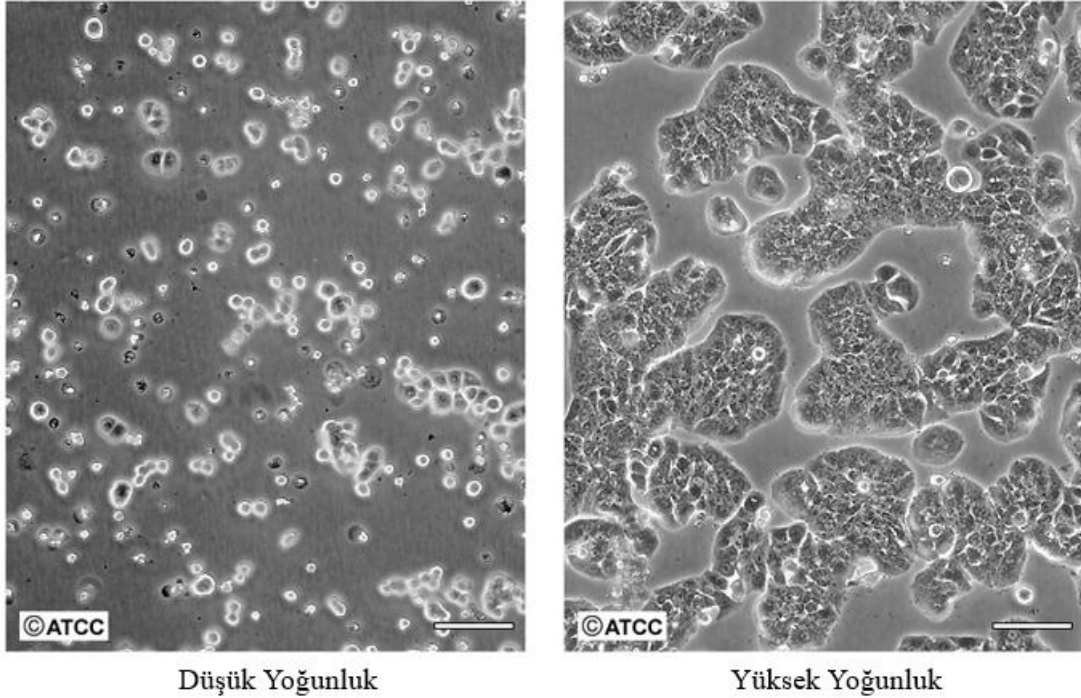
Tablo 2.1: Modifiye BHI besiyeri (1 litre için)

Bileşenler	Miktarları (g)
BHI Besiyeri	37
Sükroz	20
D-Glikoz	8
Sodyum Asetat	5
Tween 20	1
MgSO ₄	0.2

18 saat süre sonunda geliştirilen bakteriyel kültürlerden EPS'nin izolasyonu Dertli ve diğ. (2013) tarafından belirtilen yönteme göre yapılmıştır. İlk olarak hücreler 30 dakika, 4°C, 7200 ×g'de santrifüj (Hitachi, CR22N, Japonya) ile bakteri biyokütlesi ve supernatant ayrılmıştır. Ardından supernatant alınarak eşit miktarda soğuk etanol ilave edilerek EPS 4°C'de 1 gece bekletilerek çöktürülmüştür. Bir gece sonunda örnekler 30 dakika 4°C'de 7200 ×g'de santrifüj işlemi uygulanmış, bu kez süpernatant uzaklaştırılarak çöken EPS 50 ml dH₂O'da (çözünmenin zor olduğu durumlarda 50°C'de hafif bir ısıtma işlemi yapılmıştır.) çözüldükten sonra 2 katı kadar soğuk etanol ilave edilerek bir gece daha 4°C'de bekletilmiştir. Süre sonunda çöken EPS tekrar santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılarak pellet 30 ml dH₂O'da çözüldükten sonra üzerine %100'lük trikloroasetikasitten (TCA) son hacminde %15 olacak şekilde eklenmiş ve 4°C'de 4 saat hafif çalkalama (WiseShake SHO-1D) işleminden sonra EPS'den safsızlık ve proteinleri ayırmak için örnekler 30 dakika 4°C'de 7200 ×g'de santrifüj işlemi uygulanmıştır. Bu işlemin ardından supernatant alınmış ve 5M NaOH ile pH'ı 7.0'e (Isolab, Almanya) ayarlandıktan sonra üzerine 5 katı kadar soğuk etanol ilave edilmiştir. Ardından liyofilizatör kaplarına eşit miktarda dağıtılıp -80 °C'de 1 gece bekletildikten sonra 200 mTorr vakum altında liyofilize (Modulyo, Thermo Scientific, ABD) işlemine tabii tutularak EPS'ler elde edilmiştir.

2.2.2 EPS'lerin pro-inflamatuar TNF- α , IL-12 ve anti-inflamatuar IL-10, IL-4 sitokinleri Uyaran İmmün Modülasyon Özelliklerinin Belirlenmesi

EPS'lerin immünomodülatif özellikleri insan kolorektal adenokarsinom hücre hattı olan HT-29 hücreler kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: HT-29 hücre hattının (ATCC No: HTB-38) düşük ve yüksek yoğunluktaki mikroskop görüntüsü

2.2.2.1 Hücre Hattının Temini ve Çoğaltılması

HT-29 hücre hattı, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın, "American Tissue Type Culture Collection" (ATCC, ABD)'dan temin ettiği stoktan kullanılmıştır. HT-29 (ATCC® HTB-38™, ABD) hücre hattı %10 fetal sığır serumu (Gibco, ABD) ve %1 Penisilin-Streptomisin (Gibco, ABD) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media, Gibco, ABD) besiyerinde, 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ içeren inkübatörde geliştirilmiştir.

2.2.2.2 Hücrelerin Açılması, Pasajlanması, Sayılması ve Dondurulması

-80°C'de donmuş halde kriyo tüplerde bulunan HT-29 hücre hattı dışarı çıkartılarak 37°C'ye ayarlanmış su banyosuna yerleştirilmiş ve donmuş haldeki hücrelerin çözünmesi sağlanmıştır. Çözünen kriyo tüpler, %70'lik alkol ile silinerek "sınıf II biyolojik güvenlik kabini" içerisine alınmıştır. 15 ml'lik steril santrifüj tüpleri içerisine 5 ml DMEM besiyeri eklenmiş ve kriyo tüpler içerisindeki HT-29 hücreleri mikropipet yardımıyla 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Tüpler oda

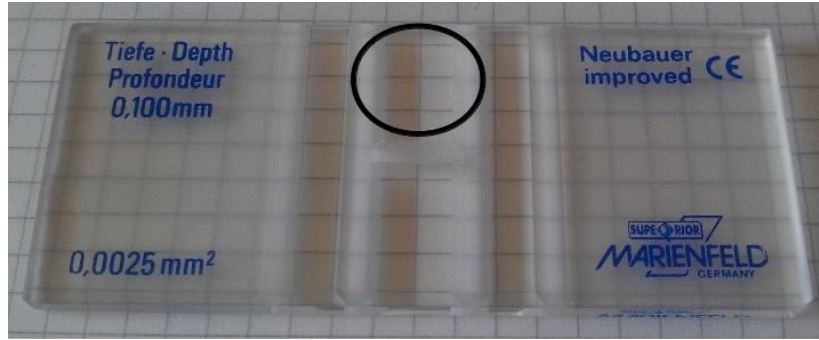
sıcaklığında, 1500 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj (Hettich, ALMANYA) edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra %70'lik alkol ile silinen tüpler kabin içerisine alınmış ve süpernatant kısımları atılarak, hücrelerin bulunduğu pellet kısım bırakılmıştır. Pelletin miktarına bağlı olarak, pelletin üzerine 1-3 ml arasında DMEM besiyeri eklenmiş ve homojenize edilmiştir. Homojenize edilen hücreler, içerisine 10 ml DMEM eklenen 100 x 20 mm'lik hücre kültür petripleri içerisine mikropipet yardımı ile ekilmiştir. Petri kapağının üst kısmına hücre hattı, pasaj numarası ve tarihi yazılarak etiketleme işlemi yapılmıştır. Hücrelerin bulunduğu petri kapları 37°C ve %5 CO₂'li nemli inkübatöre (NuAire, ABD) yerleştirilmiştir.

HT-29 hücre hattı adherent yani petri tabanına tutunan hücre hattı olduğundan, karbondioksit inkübatörü içerisinde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler tabana tutunduktan sonra her gün düzenli olarak invert mikroskop altında canlılık ve yoğunluk durumları kontrol edilmiştir. Yeterli yoğunluğa erişmemiş hücreler tekrar karbondioksit inkübatörüne kaldırılarak kültür işlemine devam edilmiştir. Petri kaplarındaki HT-29 hücreleri %80-85 yoğunluğa ulaştıktan sonra pasaj işlemine tabi tutulmuştur.

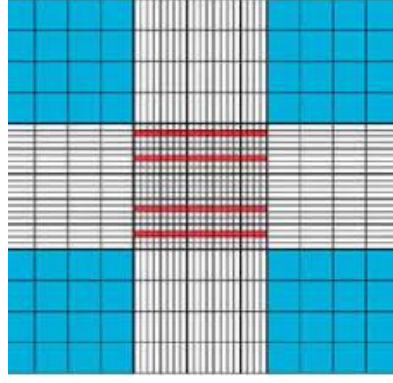
Pasajlama işleminde; karbondioksit inkübatöründen alınan hücrelerin besiyerleri çekilerek uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin üzerine 5 ml Fosfat Buffer Salin (PBS) (Gibco, ABD) eklenmiştir. Kısa bir süre PBS içerisinde bekletilen hücrelerden, PBS uzaklaştırılarak hücreler üzerine 1 ml %0,05'lik Tripsin-EDTA (Gibco, ABD) ilave edilmiştir. Enzimin aktivite gösterebilmesi için petripler karbondioksitli inkübatöre kaldırılmıştır. Yaklaşık olarak 2-3 dakikalık inkübasyonun ardından hücrelerin petri tabanından kalkıp kalkmadığı kontrol edilmiş ve hücreler kalktıktan sonra petripler tekrar kabin içerisine alınarak tripsin aktivitesini ortadan kaldırmak amacıyla hücrelerin bulunduğu petrilere 4 ml DMEM besiyeri eklenmiştir. Mikropipet yardımıyla hücrelerin tamamen petri tabanından kalkması sağlandıktan sonra hücreler 15 ml'lik steril santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Santrifüj sonrasında kabin içerisine alınan tüplerin süpernatant kısımları uzaklaştırılmış ve pelletin yoğunluğuna göre 3-10 ml DMEM besiyeri eklenerek hücreler mikropipet yardımıyla homojenize edilmiştir. Bu aşamadan sonra diğer deneyler için hücrelerin sayım işlemi gerçekleştirilmiştir. Eğer sayım işlemi yapılmayacaksa hücreler dondurulma işlemine tabi tutulmuştur.

HT-29 hücrelerinin sayım işlemi “Tripan Mavisi” dışlama yöntemine göre yapılmıştır. Bu yöntemin ana mantığı; canlı hücrelerin membran yapısı bütün olduğundan tripan mavisi ile boyanamamakta ve invert mikroskop altında parlak renkte görünmekte, ölü hücrelerde hücre membran bütünlüğü bozulduğundan dolayı boya hücre içerisine aldığından invert mikroskop altında ölü hücreler mavi renkte görünmektedirler. Homojenize edilmiş HT-29 hücrelerinden 50 µl alınarak, 1.7 ml’lik mikrosantrifüj tüpü içerisine aktarıldıktan sonra aynı tüp içerisine 50 µl Tripan Mavisi boyası eklenerek mikropipet yardımı ile homojenize edilmiştir. Elde edilen bu karışımdan 10 µl alınarak, hücre sayım işlemlerinde sıklıkla kullanılan Neubauer lamı (Marienfeld-Superior, ALMANYA) üzerine aktarılmıştır (Şekil 2.2). Lamın üzeri lamel ile kapatılarak, invert mikroskopta 10X büyütmede hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Neubauer lamı alan görüntüsü Şekil 2.3’ gösterilmiştir. Neubauer lamının 4 büyük karesi içerisindeki hücreler sayılarak ortalaması alınmış ve 1 ml’deki hücre sayısı aşağıdaki formül baz alınarak hesaplanmıştır.

Hücre sayısı (hücre/ml) = Hücre sayısı x 10.000 / Alan Sayısı x Dilüsyon Faktörü



Şekil 2.2: Neubauer hücre sayım lamı



Şekil 2.3: Neubauer lamı alan görüntüsü. Hücre sayım işleminde mavi renklerle gösterilen 4 büyük karedeki hücreler sayılır ve toplam sayı 4'e bölünerek ortalama değer alınmaktadır.

Hücreleri saydıktan sonra 1.8 ml'lik kriyo tüplerde yaklaşık 1×10^6 hücre olacak şekilde, pelletimizin miktarına bağlı olarak, 1:9 oranında “Dimetil Sülfoksit (DMSO):DMEM” karışımı hazırlanarak pellet üzerine aktarılmıştır. Pellet homojenize edildikten sonra hücreler kriyo tüp içerisine aktarılmış ve bu kriyo tüpler içerisinde izopropanol bulunan saklama kutularına alınarak -80°C de saklanmışlardır.

2.2.2.3 Enzim-bağlı İmmünoabsorbent Analizi (ELIZA) Yöntemi ile IL-4, IL-10, IL-12 ve TNF- α Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan *L. plantarum* PFC308, PFC309, PFC310, PFC311, PFC312 ve PFC313 suşlarından üretilen EPS'ler 1 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde DMEM kullanılarak ayarlanmıştır. HT-29 hücreleri pasajlanarak sayılmış ve 6-kuyucuklu hücre kültür kaplarına, kuyucuk başına 400.000 hücre olacak şekilde ekilerek 3 ml DMEM besiyerinde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından hücre kültür kaplarının tabanına tutunan hücrelerin üzerine yukarıda belirtilen her bir EPS, HT-29 hücrelerine 50 ve 100 μg olacak şekilde uygulanmış ve hücreler 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol grubuna sadece DMEM besiyeri eklenmiştir. 24 saatlik inkübasyon süresinden sonra, 6-kuyucuklu plakalarda bulunan besiyerleri 15 ml'lik santrifüj tüplerine toplanmış ve toplanan besiyerleri ELIZA deneyi gerçekleştirilene dek -20°C 'de saklanmıştır.

IL-4, IL-10, IL-12 ve TNF- α miktarlarını belirlemek için gerekli ELIZA kitleri ticari olarak temin edilmiştir (Sunlong Biotech, ÇİN). Her bir kit içerisinde bulunan ekipmanlar aynı olup, sadece standart konsantrasyonları bakımından farklılık göstermektedir. Kitin içerisinde bulunan ekipmanlar Tablo 2.2’de özetlenmiştir.

Tablo 2.2: Bir ELIZA kiti içerisinde bulunan ekipmanlara ait bilgiler

	Kit ile sağlanan ekipmanlar	96 reaksiyon	Saklama Koşulu
1	Mikroeliza stripleri	1 Adet	2-8°C
2	Standart*	0,5 ml x 1 şişe	2-8°C
3	Standart dilüent	1,5 ml x 1 şişe	2-8°C
4	HRP-konjugant reaktifi	6 ml x 1 şişe	2-8°C
5	Örnek dilüenti	6 ml x 1 şişe	2-8°C
6	Kromojen solüsyon A	6 ml x 1 şişe	2-8°C
7	Kromojen solüsyon B	6 ml x 1 şişe	2-8°C
8	Stop solüsyonu	6 ml x 1 şişe	2-8°C
9	Yıkama solüsyonu	20 ml (30X) x 1 şişe	2-8°C

*Standart konsantrasyonu her bir ELIZA kiti için farklılık göstermektedir.

Her bir ELIZA kiti içerisindeki stok standart konsantrasyonu aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (Tablo 2.3). Stok standartlardan, standart dilüent ile aşağıdaki tabloda bulunan standart çalışma konsantrasyonları ilgili her bir kit için hazırlanmıştır.

Tablo 2.3: IL-4, IL-10, IL-12 ve TNF- α ELIZA kitleri için standart konsantrasyonları ve standartlara ait çalışma konsantrasyonları

Kit Adı	Stok Standart Konsantrasyonu	Standart Çalışma Konsantrasyonları				
IL-4	270 pg/ml	180 pg/ml	120 pg/ml	60 pg/ml	30 pg/ml	15 pg/ml
IL-10	135 pg/ml	90 pg/ml	60 pg/ml	30 pg/ml	15 pg/ml	7,5 pg/ml
IL-12	90 pg/ml	60 pg/ml	40 pg/ml	20 pg/ml	10 pg/ml	5 pg/ml
TNF-α	450 pg/ml	300 pg/ml	200 pg/ml	100 pg/ml	50 pg/ml	25 pg/ml

Her bir ELIZA kiti için aşağıdaki protokol uygulanmıştır:

1. Her bir standart, örnek ve kör için 2 kuyucuk olacak şekilde, çalışma çift tekrar olarak gerçekleştirilmiştir.
2. Her bir kitin, A1-A10 ve B1-B10 kuyucuklarına Tablo 2.4’de belirtilen standart çalışma konsantrasyonları 50 µl olacak şekilde mikropipet yardımıyla aktarılmıştır.
3. A11 ve B11 nolu kuyucuklarına herhangi bir şey eklenmeden “kör” olarak bırakılmıştır.
4. Kalan diğer kuyucuklara örnek sayımız kadar 40 µl “örnek dilüent tamponu” ve üzerine 10 µl örnek aktarılmıştır. Örneklerin aktarılması sırasında kuyucukların tabanına değmemeye özen gösterilmiştir. Örnek aktarılma işlemi tamamlanınca, orbital çalkalayıcı üzerinde mikroeliza stripleri nazikçe çalkalanmıştır.
5. Mikroeliza stripleri, kitin içerisinden çıkan şeffaf etiket ile kapatılarak 37°C’de 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
6. İnkübasyon esnasında, 30X konsantrasyonda bulunan “yıkama tamponu” 1X konsantrasyona dilüe edilmiştir.
7. İnkübasyonun ardından, striplerin üzerindeki şeffaf etiket çıkarılarak, kuyucuklardaki sıvı dökülerek 1X konsantrasyondaki yıkama tamponundan yaklaşık 300 µl kuyucuklara ilave edilmiş ve 30 saniye oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Ardından yıkama tamponu tekrar dökülmüştür. Bu işlem, kuyucukların iyi şekilde yıkanması için 5 kez tekrar edilmiştir.
8. Kör için ayrılan kuyucukların dışında, standartların ve örneklerin bulunduğu kuyucuklara 50 µl HRP-konjuge reaktifi eklenmiştir.
9. Mikroeliza stripleri 5. basamaktaki işlem tekrar edilerek inkübasyona bırakılmıştır.
10. İnkübasyonun ardından mikroeliza stripleri 7. basamaktaki işlem tekrar edilerek yıkanmıştır.
11. Kör, standart ve örneklerin bulunduğu kuyucukların her birine önce 50 µl “Kromojen A”, sonrasında 50 µl “Kromojen B” solüsyonu eklenmiştir. Mikroeliza stripleri, orbital çalkalayıcıda nazikçe, kısa bir süre için

çalkalanmış ve 37°C'de 30 dakika karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Etkili bir renk değişiminin olması için bu aşama karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir.

12. İnkübasyonun ardından her bir kuyucuğa 50 µl “Stop Solüsyonu” eklenerek reaksiyonun sonlanması sağlanmıştır. Stop solüsyonu eklendikten sonra kuyucukların içerisinde oluşan mavi renk, sarı renge dönüşmüştür.
13. Reaksiyon sonlandırıldıktan sonra 15 dakika içerisinde mikroeliza striplerinin 450 nanometrede ELIZA okuyucu cihazında okutulma işlemi gerçekleştirilmiştir.
14. Elde edilen absorbans değerleri excel dosyasına aktarılmıştır. İlk olarak standart ve örneklerden elde edilen absorbans değerlerinden körlerin bulunduğu absorbans değerleri çıkartılarak normalizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra standartlardan elde edilen absorbans değerleriyle, “Standart Eğim Grafiği” çizilmiştir. Bu grafikten elde edilen “ $y = ax + b$ ” eğim denkleminde örnekler için absorbans değerlerine karşılık gelen konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır.

2.2.3 EPS'lerin Prebiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi

EPS'lerin prebiyotik özelliği, probiyotik suşların gelişimi üzerine etkisinin incelenmesi ile belirlenmiştir (Wang ve diğ. 2014). Bu amaçla *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082, *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079, *Lactobacillus rhamnosus* GG ve *Lactobacillus casei* subsp. *shirota* kullanılmıştır. Bifidobakter ve LAB türleri Tablo 2.4' de içeriği verilen MRS Broth ortamında anaerobik koşullar altında, 37°C'de geliştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak %0,5 glikoz içeren MRS besiyeri ve negatif kontrol olarak şeker içermeyen MRS besiyeri kullanılmıştır. İlgili türler tek karbon kaynağı olarak %0,5 EPS içeren besiyerine inkübe edilerek, hücre yoğunluğu değişimi 600 nm'de 48 saat boyunca her 15 dakikada bir olmak üzere çoklu plaka okuyucuda (Multiscan, Thermo Scientific, ABD) tespit edilmiştir.

Tablo 2.4: MRS besiyeri (1 litre için)

Bileşenler	Miktarları (g)
Pepton	10
Lab-Lemco' tozu	8
Maya özütü	4
Glikoz	20
Sorbitan mono-oleat	1
Dipotasyum hidrojen fosfat	2
Sodyum asetat	5
Triamonyum sitrat	2
Magnezyum sülfat	0.2
Manganez sülfat	0.05

2.2.4 EPS'lerin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi

EPS'lerin radikal süpürme aktivitesi Zhang ve diğ. (2013) tarafından belirtilen yöntemle göre belirlenmiştir. Buna göre farklı konsantrasyonlardaki (0,5, 1,0 ve 2,0 mg ml⁻¹) EPS'ler, 2 ml etanollü DPPH radikal solüsyonuna (0,2 mM) katılmıştır. Söz konusu karışım kuvvetlice karıştırılmış ve oda sıcaklığında karanlık koşulda 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra, 8000 xg'de 10 dakika santrifüj (Hettich Universal 30 RF) sonucu elde edilen üst sıvının optik yoğunluğu 517 nm'de (Multiscan Go, Thermo Scientific, ABD) ölçülmüştür. EPS'lerin radikal süpürme aktivitesi;

DPPH süpürme (%)=[(A₀-A₁) / A₀] \times 100 eşitliği ile hesaplanmıştır.

A₀: Örnek içermeyen DPPH solüsyonu,

A₁: Farklı konsantrasyonda örnek içeren solüsyonu ifade etmektedir.

EPS'lerin hidroksil radikali süpürme etkisi fenton reaksiyonları ile belirlenmiştir. Buna göre, 1 ml brilliant yeşili (0,435 mM), 2 ml FeSO₄ (0,5 mM), 1,5 ml H₂O₂ (%3 w/v) ve farklı konsantrasyonlarda 0,5, 1,0 ve 2,0 mg ml⁻¹ EPS içeren karışım 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Ardından 4000 xg'de 5 dakika santrifüj edilerek 624 nm'de optik yoğunluğu ölçülmüştür. EPS'lerin hidroksil radikali süpürme aktivitesi;

OH süpürme (%)= $[(A_0-A_1) / (A-A_1)] \times 100$ eşitliği ile hesaplanmıştır.

A₀: Farklı konsantrasyonlarda örnek içeren solüsyonu,

A₁: Örnek içermeyen solüsyonu,

A: Fenton reaksiyonlarını içeren ama örnek içermeyen solüsyonu ifade etmektedir.

EPS'lerin süperoksit anyon süpürme aktivitesi Li ve diğ. (2014) tarafından belirtilen yöntemle göre belirlenmiştir. Kısaca, 1 ml fosfat tamponu (50 mM, pH 8,34) ve farklı konsantrasyonlardaki 0,5, 1,0 ve 2,0 mg ml⁻¹ EPS'ler karıştırılarak 25°C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. Takiben, 0,2 ml pyrogallol (3 mM) ilave edilerek karışımın optik yoğunluğu 325 nm'de 10 saniyede bir olmak üzere 5 dk. boyunca ölçülmüştür. Süperoksit anyonu süpürme aktivitesi;

Süperoksit süpürme (%)= $[(\Delta A_0-\Delta A_1) / \Delta A_0] \times 100$ eşitliği ile hesaplanmıştır.

ΔA_0 : Örnek içermeyen solüsyonlarda 10 saniyede bir absorbans farkı,

ΔA_1 : Farklı konsantrasyondaki solüsyonların 10 saniyedeki absorbans farkını ifade etmektedir.

2.2.5 EPS'lerin Alfa-glukozidaz İnhibitör Aktivitelerinin Belirlenmesi

EPS'lerin alfa-glukozidaz inhibitör aktiviteleri Kazeem ve diğ. (2013) tarafından belirtilen yöntemle göre belirlenmiştir. Enzim (*Saccharomyces cerevisiae* kaynaklı, Sigma, ABD) ve substrat olan 4-nitrophenly α -D-glucopyranoside (pNPG) (Sigma, ABD) çözeltileri 20 mM fosfat tamponu (pH 6.9) içerisinde hazırlanmıştır. 100 μ L α -glukozidaz (1.0 U mL⁻¹) ve 50 μ L EPS'nin farklı konsantrasyonları (0,5, 1,0 ve 2,0 mg ml⁻¹) ile 10 dakika 37 °C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra reaksiyonu başlatmak için 20 mM fosfat tamponu içinde çözüldürülmüş olan 50 μ L 3.0 mM substrat (pNPG) eklenerek 20 dakika 37 °C'de inkübe edildikten sonra 2 mL 0.1 M Na₂CO₃ eklenmiş ve söz konusu reaksiyon durdurulmuştur. pNPG'den salınan sarı renkli paranitrofenol 405 nm'de ölçülmüştür.

α -glukozidaz inhibitör aktivitesi (%) = $[(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$ eşitliği ile hesaplanmıştır.

A_{kontrol}: örnek içermeyen solüsyonu

$A_{\text{örnek}}$: farklı konsantrasyonlardaki örnek içeren solüsyonunu ifade etmektedir.

2.2.6 EPS'lerin Kolesterol Seviyesini Düşürme Yeteneklerinin Belirlenmesi

EPS'nin kolesterol seviyesini düşürme yeteneği Soh ve diğ. (2003) tarafından belirtilen yöntemle göre belirlenmiştir. %0.1 EPS ve 30 µg kolesterol içeren 1 mL reaksiyon karışımı 25°C'de 20 dakika inkübe edildikten sonra karışıma 50 µL hekzadesil trimetil amonyum bromit eklenmiştir. Hemen ardından karışım 12500 g'de santrifüjlenmiş ve süpernatantın optik yoğunluğu 500 nm'de ölçülmüştür. Kolesterol düşürme yeteneği; (%)= $(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} * 100$ eşitliği ile hesaplanmıştır.

A_{kontrol} : EPS içermeyen kolesterol solüsyonu

$A_{\text{örnek}}$: %0,1 EPS içeren kolesterol solüsyonunu ifade etmektedir.

2.2.7 İstatistiksel Analiz

Çalışmada Minitab “16.0 Statistical Software” paket programında one-way ANOVA testi kullanılarak, *L. plantarum* suşlarından elde edilen EPS'lerin söz konusu aktivitelere etkilerinin konsantrasyonlar arası farklılıkları için istatistiki analizleri yapılmıştır. Örnekler arasındaki farkı karşılaştırmak amacıyla da Tukey's testi uygulanmıştır ($p < 0.05$).

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 *L. plantarum* Suşları Tarafından EPS Üretimi ve Saflaştırılması

L. plantarum PFC308, 309, 310, 311, 312 ve 313 suşlarından üretilen EPS'lerin sağlık üzerine etkilerini araştırmak için suşlar 2.2.1 kısmında anlatıldığı gibi geliştirilmiştir. 2 L'lik biyoreaktör hacminde, modifiye BHI besiyeri ortamında 18 saat boyunca pH 6'da geliştirilmiş ve üretilen EPS'ler saflaştırıldıktan sonra liyofilize edilmiştir (Şekil 3.1 ve 3.2). Biyoreaktör ortamında üretilen EPS'lerin biyokütle miktarları Tablo 3.1'de gösterilmiştir. Her suşa ait EPS miktarı farklı olup, en yüksek EPS üretimi *L. plantarum* PFC308 suşu tarafından gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1: PFC308 suşunun fermentörde üretimi



Şekil 3.2: PFC308 suşunun liyofilize görüntüsü

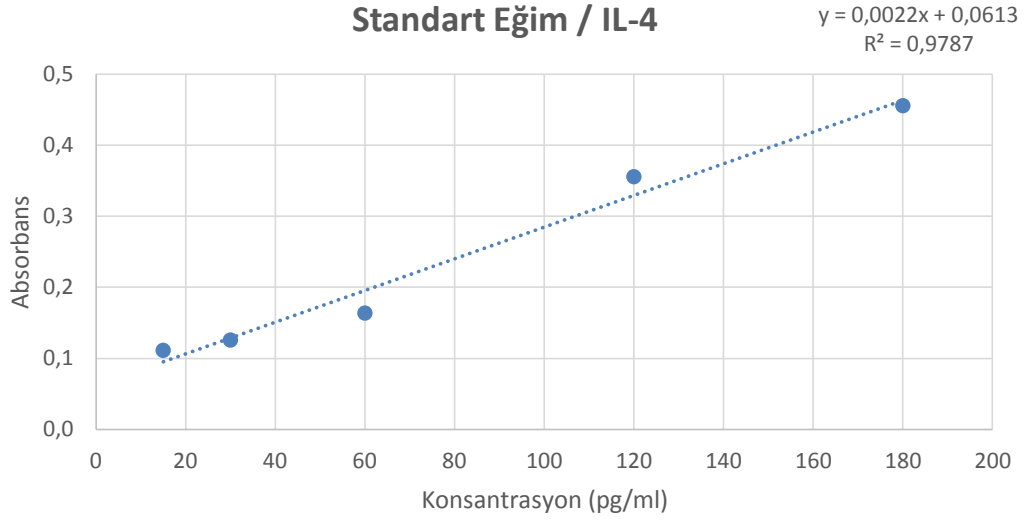
Tablo 3.1’de görüldüğü gibi en fazla miktarda EPS *L. plantarum* PFC308 suşu tarafından üretilmiştir. Birçok çalışmada LAB türlerinden farklı miktarlarda EPS üretilmiş ve bugüne kadar tespit edilen EPS üretim miktarları $59\text{--}636\text{ mg L}^{-1}$ arasında değişmiştir (Pham ve diğ. 2000, Zhang ve diğ. 2016, Bai ve diğ. 2016, Wang ve diğ. 2017, Kim ve diğ. 2017, Behera ve diğ. 2018). Bu çalışmada *L. plantarum* PFC308, 309, 310, 311, 312 ve 313 suşlarından üretilen EPS’lerin miktarları literatür verileri ile kıyaslandığında söz konusu aralığın arasında olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 3.1: Biyoreaktör ortamında *L. plantarum* PFC308, 309, 310, 311, 312 ve 313 suşları tarafından üretilen EPS’lerin miktarları

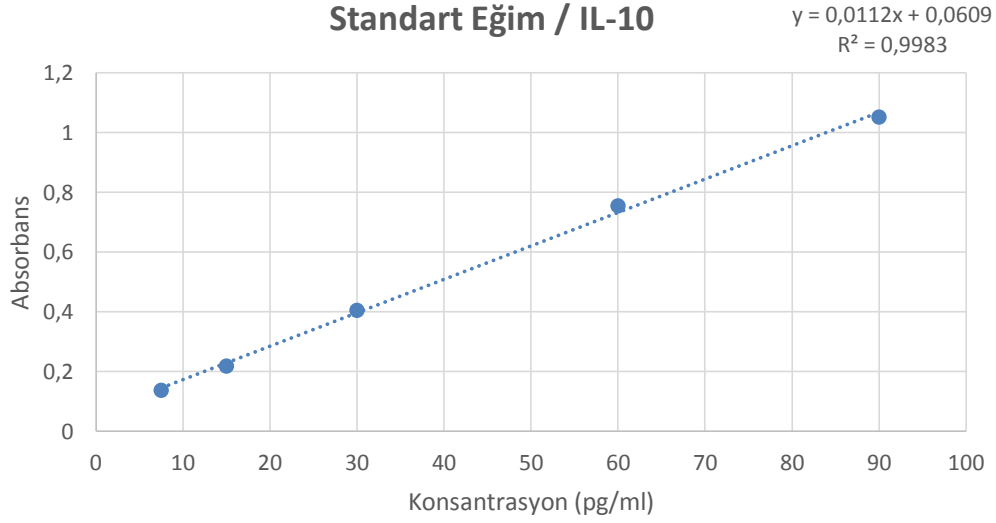
İzolatlar	EPS Miktarı (mg L^{-1})
PFC308	377
PFC309	309
PFC310	372
PFC311	239
PFC312	178
PFC313	187

3.2 *L. plantarum* Suşlarından Üretilen EPS'lerin Enzim-bağlı İmmünoabsorbent Analizi (ELIZA) Yöntemi ile IL-4, IL-10, IL-12 ve TNF- α Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

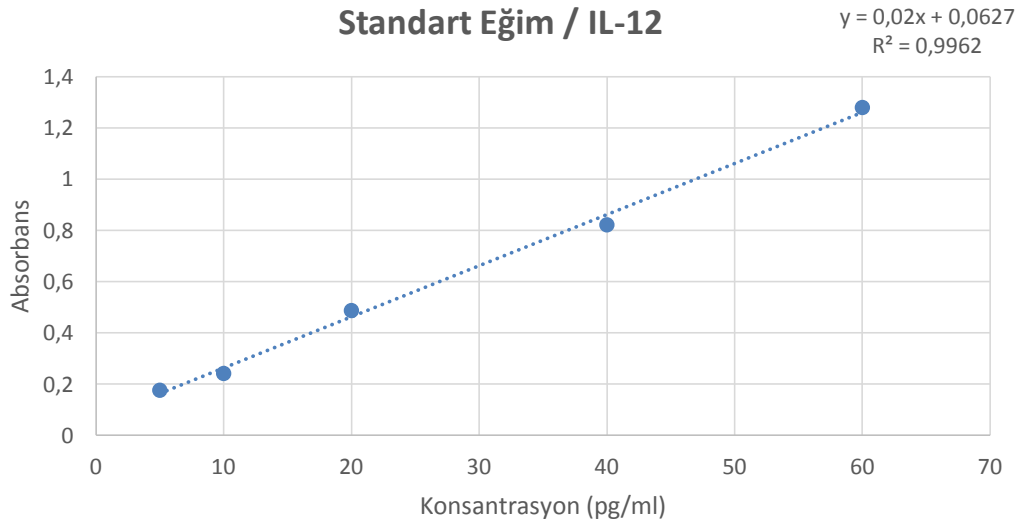
L. plantarum PFC308, 309, 310, 311, 312 ve 313 suşlarından üretilen EPS'lerin HT-29 hücrelerinde sitokin üretimi ve konsantrasyonlarının belirlenmesi için Bölüm 2.2.2.3'de verilen ELIZA protokolleri uygulanmıştır. Her bir ELIZA kiti içerisindeki stok standart konsantrasyonları ve standartlara ait çalışma konsantrasyonları kullanılarak standart eğim grafikleri hesaplanarak oluşturulmuştur. Bu standart eğim grafikleri Şekil 3.3, 3.4, 3.5 ve 3.6'da verilmiştir.



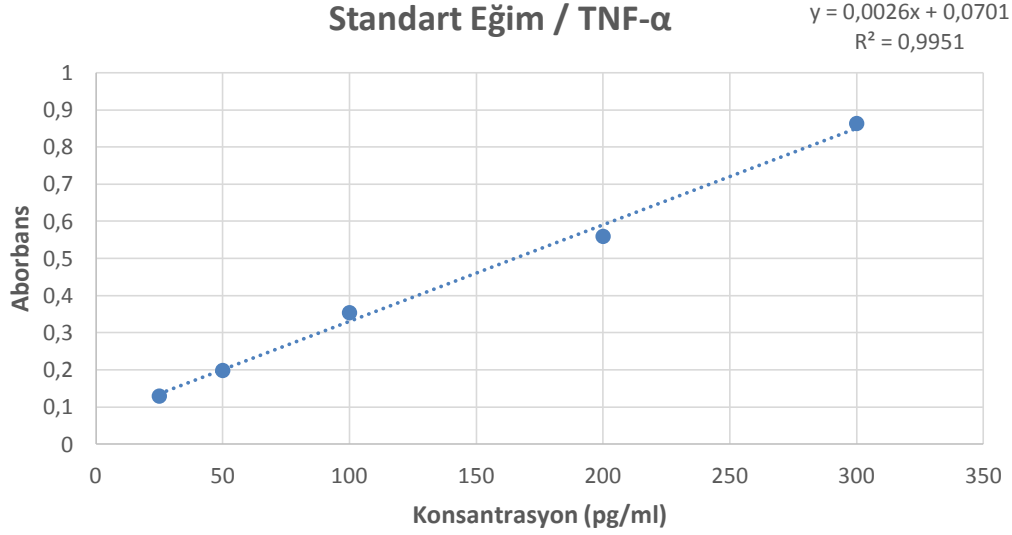
Şekil 3.3: IL-4 ait standart eğim grafiği



Şekil 3.4: IL-10 ait standart eğim grafiği

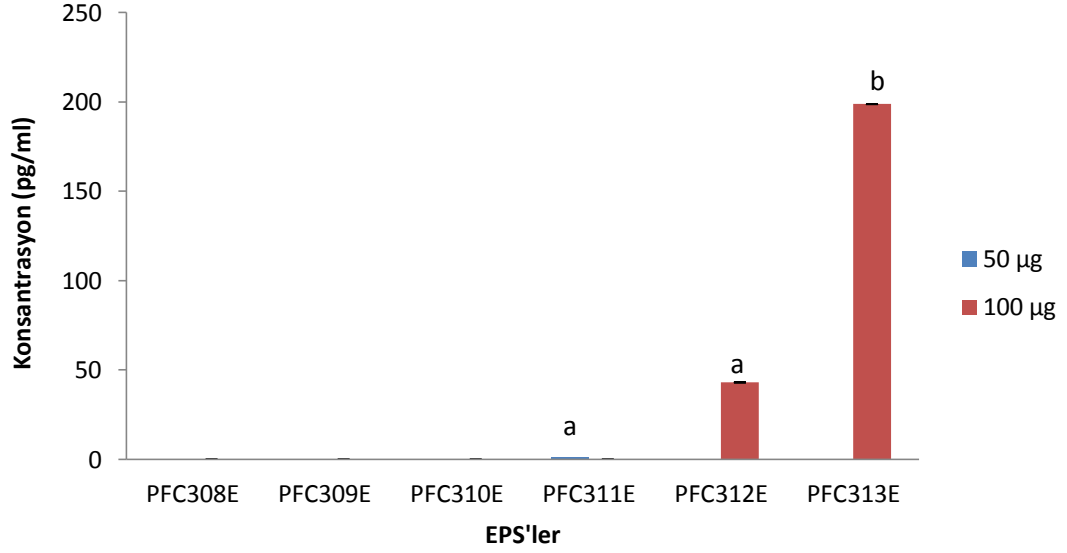


Şekil 3.5: IL-12 ait standart eğim grafiği

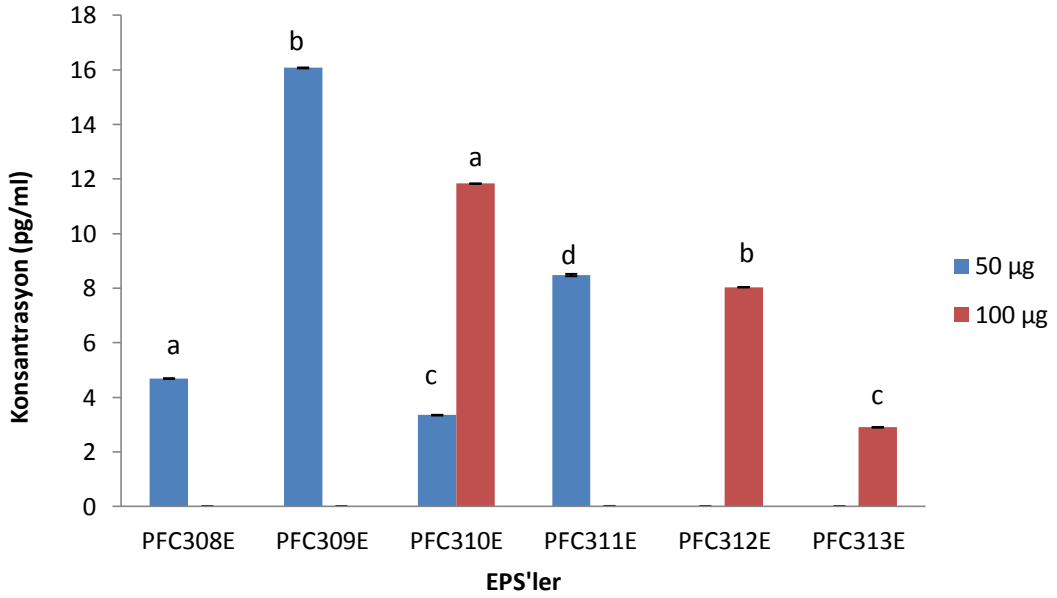


Şekil 3.6: TNF- α ait standart eğim grafiği

Şekil 3.7 ve 3.8’de, *L. plantarum* PFC308, 309, 310, 311, 312 ve 313 suşlarından üretilen EPS’lerin farklı konsantrasyonlarındaki, HT-29 hücrelerinin anti-inflamatuar sitokin (IL-4 ve IL-10) üretim miktarları gösterilmiştir. 50 μg EPS konsantrasyonunda HT-29 hücreleri tarafından IL-4 sitokin üretilmemiştir. EPS’lerin konsantrasyonu 100 μg ’a çıkarıldığında PFC312E ve PFC313E EPS’lerinde önemli miktarda ($p < 0,05$) IL-4 sitokini üretilmiştir. Çalışma kapsamında kullanılan EPS’ler 50 veya 100 μg konsantrasyonların herhangi birinde HT-29 hücrelerinden IL-10 sitokin üretimini uyarmayı başarmıştır. Buna göre en yüksek sitokin üretimi 50 μg konsantrasyonda PFC309E’de tespit edilmiştir. İlginç olarak PFC308E, PFC309E ve PFC311E EPS’lerinin sadece 50 μg konsantrasyonda HT-29 hücrelerinden IL-10 üretimi teşvik edilmiştir. Benzer şekilde PFC312E ve PFC313E EPS’lerinin ise sadece 100 μg konsantrasyonunda benzer uyarım görülmüştür. Ancak PFC310E’de hem 50 hem de 100 μg konsantrasyonlarında HT-29 hücrelerinden IL-10 üretilmiştir. Bu sonuçlar PFC308E, PFC309E ve PFC311E EPS’lerinin 100 μg konsantrasyonunun doz aşımı olmasından dolayı HT-29 hücrelerini baskıladığı ya da inhibe ettiğine işaret etmektedir. Diğer taraftan, PFC312E ve PFC313E EPS’lerinin 50 μg konsantrasyonunda HT-29 hücrelerinde IL-10 sitokin üretiminin oldukça düşük olduğu şeklinde yorumlanabilir.



Şekil 3.7: EPS varlığında HT-29 hücrelerinde IL-4 sitokin üretim miktarı



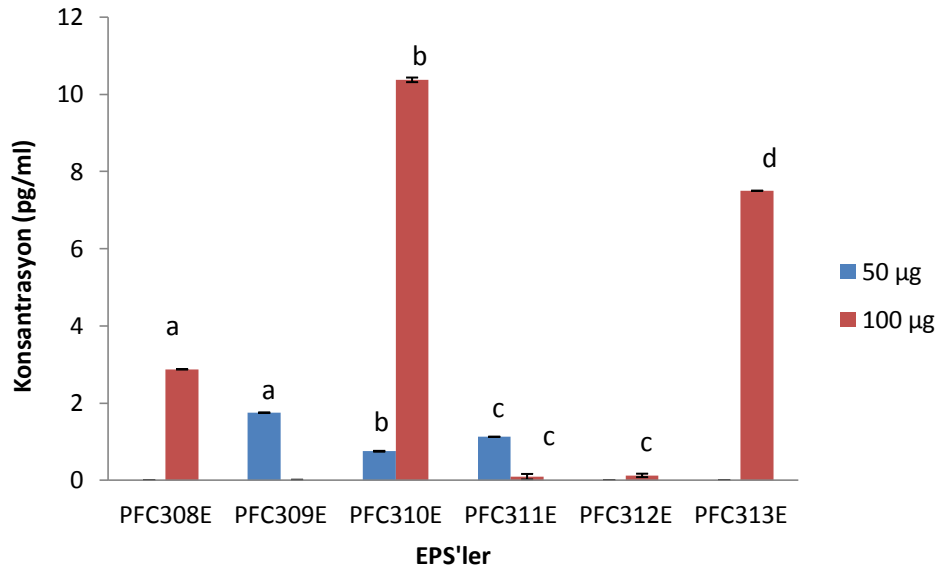
Şekil 3.8: EPS varlığında HT-29 hücrelerinde IL-10 sitokin üretim miktarı

Şekil 3.9 ve 3.10'da *L. plantarum* PFC308, PFC309, PFC310, PFC311, PFC312 ve PFC313 suşlarından üretilen ve farklı konsantrasyondaki (50 ve 100 µg) EPS'lerin HT-29 hücrelerinde pro-inflamatuar sitokin (IL-12 ve TNF-α) üretimine etkisi gösterilmiştir. HT-29 hücrelerinde IL-12 sitokini, PFC308E, PFC312E ve

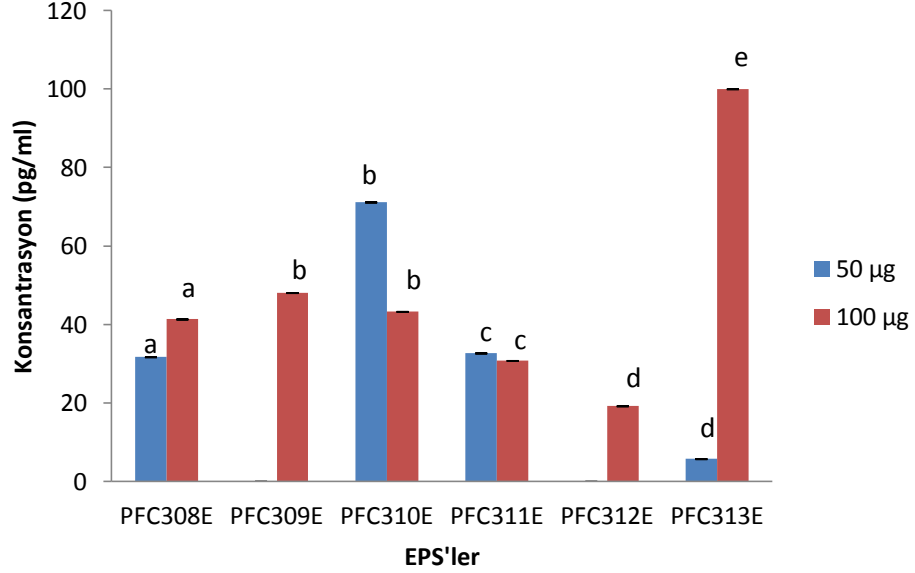
PFC313E EPS'lerinin 100 µg konsantrasyonunda, PFC309E EPS'nin ise sadece 50 µg konsantrasyonunda üretilmiştir. PFC310E'nin her iki konsantrasyonunda HT-29

hücresinde artan sitokin üretimi ve PFC311E'nin her iki konsantrasyonunda azalan sitokin üretimi tespit edilmiştir ($p<0.05$). Kullanılan EPS'ler arasında HT-29 hücresinde en yüksek sitokin üretimi PFC310E'nin varlığında gerçekleşmiştir.

Çalışmada denenen tüm EPS'lerin konsantrasyonlarının mutlaka birisinde HT-29 hücrelerinde TNF- α pro-inflamatuar sitokin uyarımı ve üretimi meydana gelmiştir. PFC309E ve PFC312E EPS'lerinin 100 µg kullanılması durumunda HT-29 hücrelerinde TNF- α pro-inflamatuar sitokin üretimi olurken, diğer EPS'lerin her iki konsantrasyonunda (50 ve 100 µg) sitokin üretimi tespit edilmiştir. Tüm EPS konsantrasyonlarında en yüksek TNF- α pro-inflamatuar sitokin PFC313E'nin 100 µg varlığında üretilmiştir. Diğer yandan PFC308E ve PFC313E'de konsantrasyon artışıyla HT-29 hücrelerinde TNF- α pro-inflamatuar sitokin üretimi artarken, PFC310E ve PFC311E'lerin konsantrasyon artışıyla söz konusu sitokin üretimi azalmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.9: HT-29 hücrelerinde EPS'lerin IL-12 sitokini üzerindeki etkileri



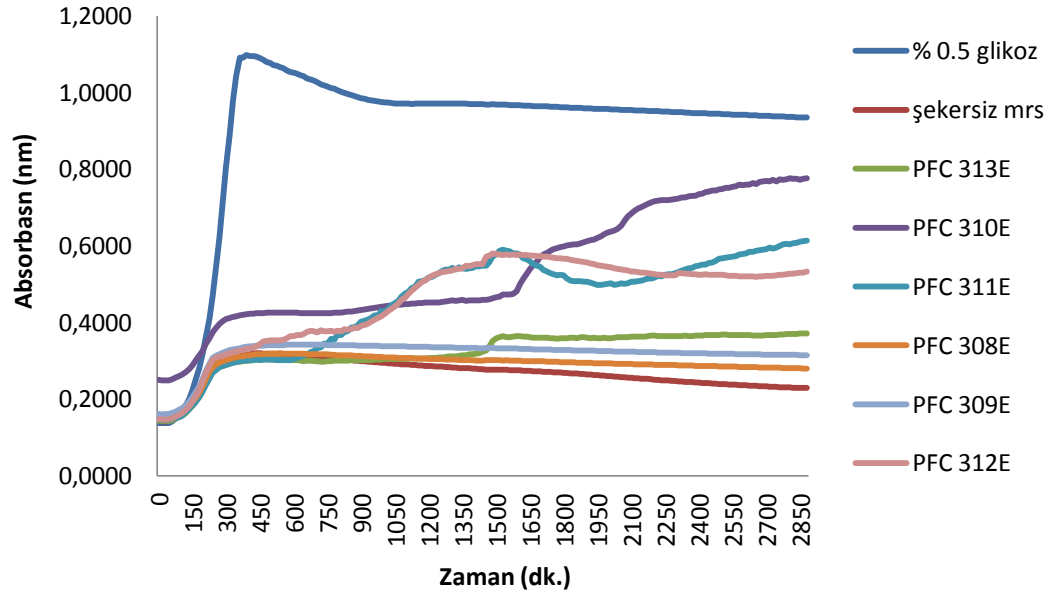
Şekil 3.10: HT-29 hücrelerinde EPS'lerin TNF- α sitokini üzerindeki etkileri

Çalışmada kapsamında kullanılan 6 adet *L. plantarum* suşları tarafından üretilen EPS'lerin HT-29 hücrelerinde anti-inflamatuar ve pro-inflamatuar etkileri genel olarak değerlendirildiğinde, söz konusu EPS'lerin IL-12 ve TNF- α sitokinlerinin daha fazla üretilmesini uyardığı için pro-inflamatuar etkilerinin daha yüksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Buna karşın aynı EPS'lerin HT-29 hücrelerinde IL-4 ve IL-10 üretimini düşük düzeyde uyardığından anti-inflamatuar etkilerinin sınırlı düzeyde olduğu anlaşılmıştır. Düşük konsantrasyonda sitokin uyarımı yönünde en etkili PFC310E ve PFC311E EPS'leri olmuştur. Buna karşın PFC312E ve PFC313E ise herhangi iki konsantrasyondan birisinde mutlaka tüm sitokinleri uyarımayı başarmıştır. Ancak PFC310E ve PFC311E'nin önemli seviyede pro-inflamatuar etkilerinin bulunduğu dikkati çekmektedir. Çalışmada kullanılan EPS'lerin pro-inflamatuar etkilerinin daha başarılı bulunması, bu yapıların makrofaj hücreler üzerinde sitokin uyarıcı etkide bulunduğu işaret etmiştir. Bu özellik sindirim kanalında makrofajların uyarılması açısından oldukça anlamlıdır. Diğer taraftan LAB'ler tarafından üretilen EPS'lerin birçok çalışmada anti-inflamatuar ve pro-inflamatuar etkileri rapor edilmiş (Chabot ve diğ. 2001, Wu ve diğ. 2010, Fanning ve diğ. 2012^b, Nikolic ve diğ. 2012, Patten ve diğ. 2014, Laiño ve diğ. 2016) ve bu çalışmada denenen *L. plantarum* suşları tarafından üretilen EPS'lerin de benzer seviyede ve çeşitlikte HT-29 hücrelerinde sitokin üretimini teşvik etmiştir.

3.3 *L. plantarum* Suşlarından Üretilen EPS'lerin Prebiyotik Etkilerinin Belirlenmesi

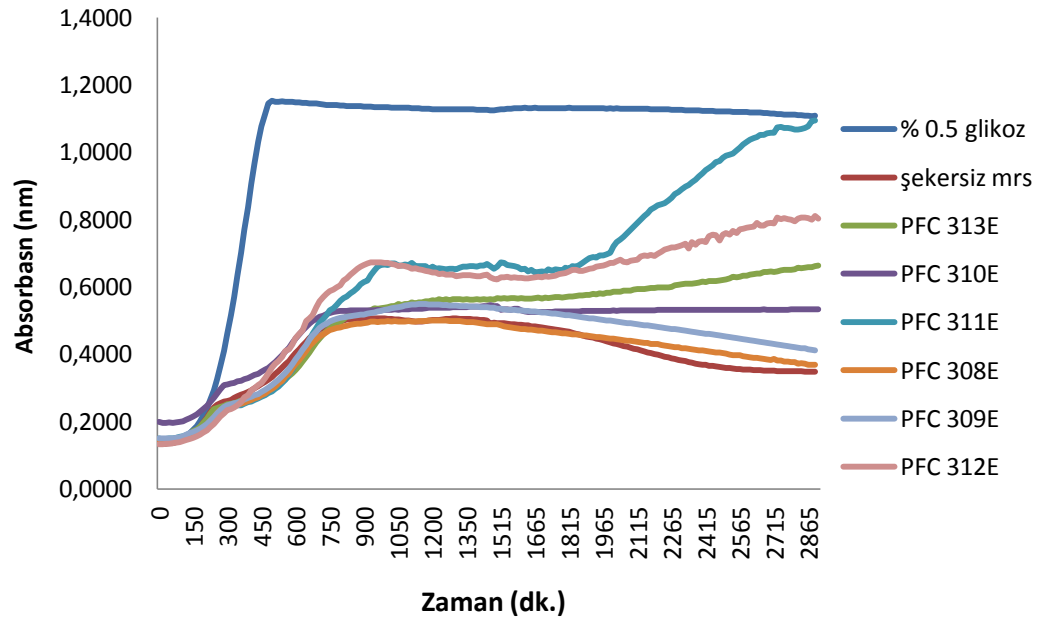
Çalışmada kullanılan *L. plantarum* PFC308, PFC309, PFC310, PFC311, PFC312 ve PFC313 suşlarından üretilen EPS'lerin prebiyotik etkilerini belirlemek için negatif kontrol grubu olarak şekeriz (glukoz içermeyen) MRS besiyeri, pozitif kontrol grubu olarak %0,5 glikoz içeren MRS besiyerleri kullanılmıştır. %0,5 EPS ilaveli, pozitif ve negatif kontrol gruplarına probiyotik olan 4 ayrı suş (*B. bifidum* DSM 20082, *L. acidophilus* DSM 20079, *L. rhamnosus* GG ve *L. casei* subsp. *shirota*) ayrı ayrı inoküle edilmiş, mikropklarlarda 8 tekrarlı olacak şekilde 37 °C'de inkübe edilmiş, 24 ve 48 saat boyunca her 15 dakikada bir hücre yoğunluğu değişimi absorbans (abs) değeri olarak ölçülmüştür.

Çalışmada kullanılan 6 farklı suş ile üretilen EPS'ler *B. bifidum* DSM 20082 tarafından 48 saat boyunca substrat olarak kullanılmış ve *B. bifidum* DSM 20082 'nin gelişme oranını ifade eden abs değerleri Şekil 3.11'de verilmiştir. Söz konusu şekilde de görüldüğü gibi, *B. bifidum* DSM 20082 gelişme ortamındaki PFC310E, PFC311E ve PFC312E EPS'lerini kısmen kullanabilmiş, bunların dışındaki EPS'leri ise karbon kaynağı olarak kullanamamıştır. Bu EPS'ler söz konusu suş tarafından zamana bağlı yavaş yavaş kullanılmış, ancak hücre yoğunluğunun kararlı bir artışı gerçekleşmemiştir. 48 saat inkübasyon sonunda hücre yoğunluğu en fazla PFC310E'nin kullanılması durumunda ulaşılmış, lakin aynı besiyeri ortamında %0.5 glukoz kullanımıyla elde edilen hücre yoğunluğu değerlerine ulaşamamıştır. Bu sonuçlar, çalışma kapsamında denen EPS'ler arasında probiyotik suş olan *B. bifidum* DSM 20082 'nin PFC310E, PFC311E ve PFC312E'yi kısmen enerji kaynağı olarak kullanabildiğine işaret etmiştir.



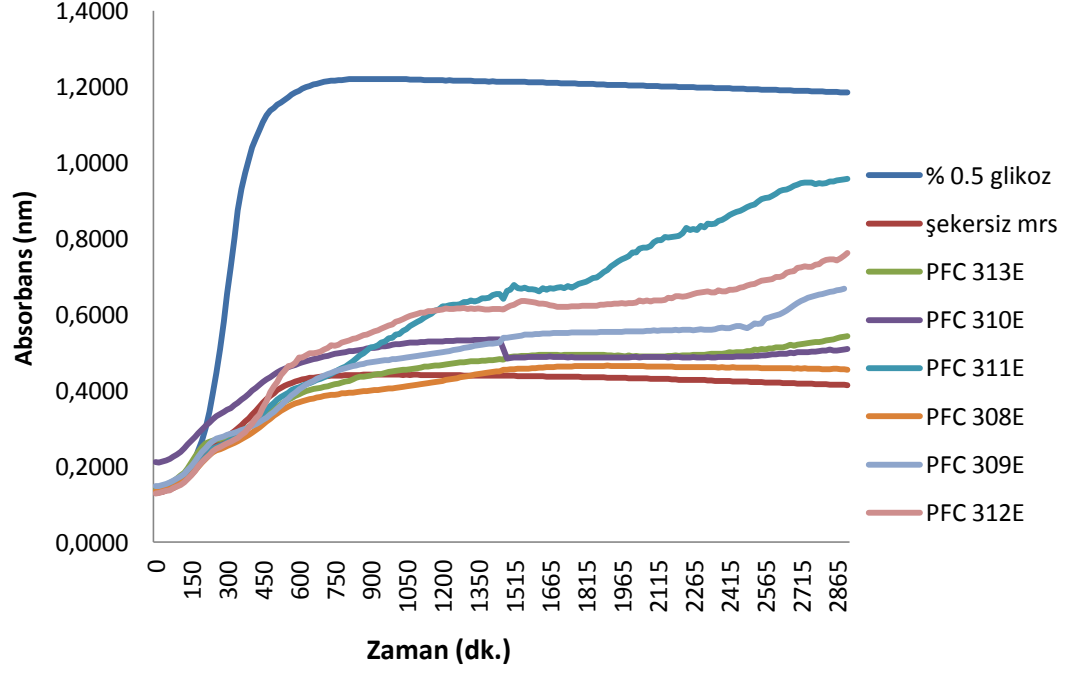
Şekil 3.11: *L. plantarum* PFC308, PFC309, PFC310, PFC311, PFC312 ve PFC313 suşlarından üretilen EPS'leri içeren MRS ortamında *B. bifidum* DSM 20082'nin gelişimi

L. casei subsp. *shirota* probiyotik suşunun, *L. plantarum* PFC308, 309, 310, 311, 312 ve 313 suşlarından üretilen EPS'lerin bulunduğu gelişme ortamında 48 saat inkübe edilmesiyle elde edilen abs değerleri Şekil 3.12'de verilmiştir. Şekil 3.12 incelendiğinde, *L. casei* subsp. *shirota* probiyotik suşu tarafından en iyi kullanılan EPS'nin PFC311E ve kullanılmayanın ise PFC308E ve PFC309E olduğu tespit edilmiştir. PFC311E'e 6. saatten sonra bu probiyotik suş tarafından kullanılmaya başlanmış, 17 ve 30. saatler arasında hücre yoğunluğu yatay ilerlemiş, 30. saatten sonra pozitif kontrolde tespit edilen hücre yoğunluğuna ulaşılmıştır. PFC311E'nin kullanılması durumunda *L. casei* subsp. *shirota* dioksik gelişme eğrisi göstermiştir. PFC312E'nin kullanılması durumunda da benzer gelişim eğrisi izlenmiştir. Ancak gelişim eğrisinin ikinci logaritmik artış bölümünde hücre yoğunluğu sınırlı düzeyde artmıştır. Bunların dışındaki diğer EPS'lerde inkübasyonun geç saatlerinde sınırlı düzeyde hücre yoğunluğu artışı tespit edilmiştir.



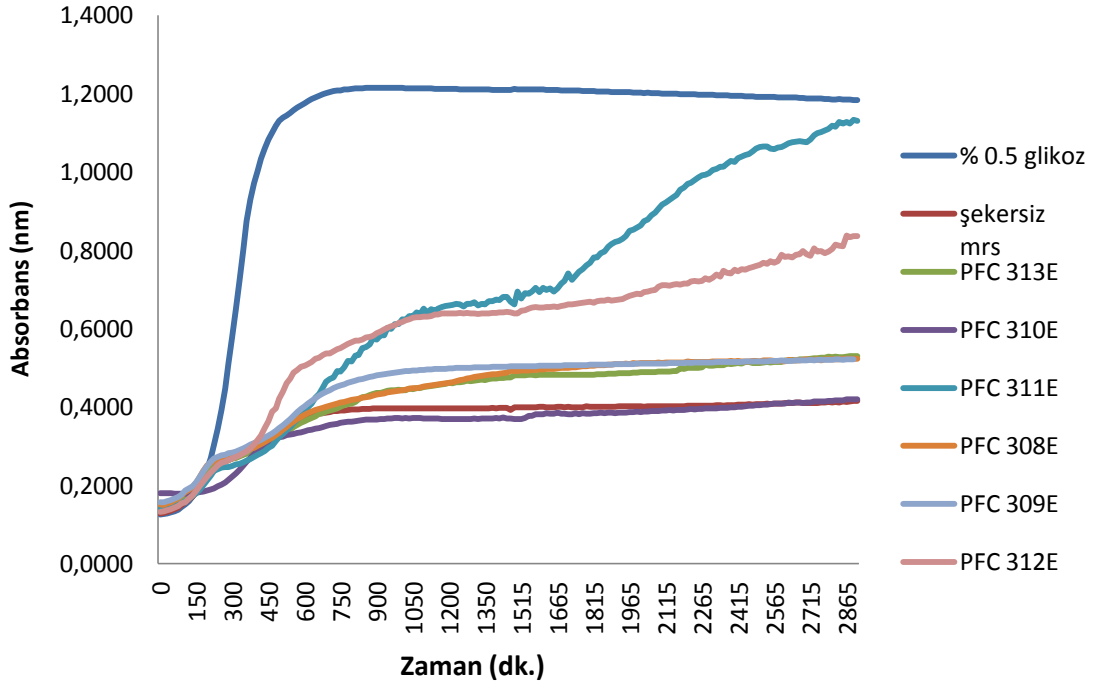
Şekil 3.12: *L. plantarum* PFC308, PFC309, PFC310, PFC311, PFC312 ve PFC313 suşlarından üretilen EPS'leri içeren MRS ortamında *L. casei* subsp. *shirota*'nın gelişimi

L. plantarum suşları tarafından üretilen EPS'lerin *L. rhamnosus* GG probiyotik suşu tarafından kullanılmaları sonucu ölçülen abs değerleri Şekil 3.13'de verilmiştir. Şekil 3.13 incelendiğinde *L. rhamnosus* GG tarafından en iyi kullanılan EPS'nin PFC311E ve en az kullanılanın ise PFC308E olduğu gözlenmiştir. PFC312E ve PFC309E'lerin de 48. saate kadar artan şekilde hücre yoğunluğu abs değeri verdikleri ancak pozitif kontrol seviyesine ulaşamadıkları görülmüştür. PFC313E ve PFC310E'nin ise çok az miktarda kullanıldıkları ve negatif kontrole paralel süreyi tamamladıkları belirlenmiştir.



Şekil 3.13: *L. plantarum* PFC308, PFC309, PFC310, PFC311, PFC312 ve PFC313 suşlarından üretilen EPS'leri içeren ortamda *L. rhamnosus* GG'nin gelişimi

L. plantarum suşlarından üretilen EPS'lerin *L. acidophilus* DSM 20079 probiyotik suşu tarafından kullanılması ile ölçülen hücre yoğunluğu abs değerleri Şekil 3.14'de verilmiştir. Şekil 3.14 incelendiğinde PFC311E'nin *L. acidophilus* DSM 20079'un gelişme ortamında bulunması durumunda bu suşun dioksik gelişme göstermiş, süre sonunda hücre yoğunluğu pozitif kontrol ile aynı düzeye ulaşmıştır. *L. acidophilus* DSM 20079 PFC312E'yi yavaş da olsa kullanarak, hücre yoğunluğunu artırmıştır. Ancak bu EPS'nin kullanılmasıyla pozitif kontrol denemesinde ulaşılan hücre yoğunluğuna erişilememiştir. Buna göre probiyotik bir suş olan *L. acidophilus* DSM 20079'un kısmen PFC311E ve PFC312E'yi kullanabildiği anlaşılmıştır.



Şekil 3.14: *L. plantarum* PFC308, PFC309, PFC310, PFC311, PFC312 ve PFC313 suşlarından üretilen EPS'leri içeren ortamda *L. acidophilus* DSM 20079'un gelişimi.

L. acidophilus DSM 20079, *L. rhamnosus* GG ve *L. casei* subsp. *shirota* probiyotik suşları tarafından karbon kaynağı olarak kullanılabilen EPS, PFC311E iken, *B. bifidum* DSM 20082 probiyotik suşu tarafından en iyi kullanılan EPS'nin PFC310E olduğu tespit edilmiştir. Literatürde de LAB suşlarından üretilen EPS'lerin prebiyotik olarak kullanımının mevcut olduğu birçok çalışma bulunmaktadır (Baruah ve diğ. 2017, Adesulu-Dahunsi ve diğ. 2018^c). Yapılan çalışmalar EPS'lerin yararlı bağırsak bakteri suşlarının selektif olarak gelişimlerini teşvik ettiklerini göstermiştir (Ryan ve diğ. 2014). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile literatür verileri karşılaştırıldığında birbirlerine paralellik gösterdiği görülmüştür (Tsuda ve Miyamoto 2010, Dilna ve diğ. 2015, Zannini ve diğ. 2016, Abid ve diğ. 2018).

Suşlara ve suşların geliştirildiği besiyeri içeriğine bağlı olmak üzere çalışmada kullanılan EPS'lerin söz konusu suşlar tarafından prebiyotik olarak kullanım oranları birbirinden farklılıklar göstermiştir. Bilindiği gibi; bir EPS molekülünün yapısal karmaşıklığı prebiyotik olarak kullanılabilme potansiyelinde önemli rol oynar. Nitekim; HePS'nin HoPS'lere göre bağırsak kanalında parçalanmasının daha zor oluşu prebiyotik olarak kullanımı açısından HePS'leri daha elverişli kılmaktadır

(Anwar ve diğ. 2008). Tablo 3.2’de bazı suşların prebiyotik etkileri verilmiştir (Ryan ve diğ. 2014).

Salazar ve diğ. (2009), *B. longum* subsp. *longum* IPLA E44 ve *B. animalis* subsp. *lactis* IPLA R1 suşlarından EPS üreterek, EPS’lerin gastrointestinal sistemde karbon kaynağı olarak kullanılmaları halinde mikrobiyomda oluşan değişimleri araştırmışlardır. Sonuç olarak EPS’lerin karbon kaynağı olarak kullanılmalarının gastrointestinal sistemde *Lactobacillus*, *Enterococcus* ve *Bifidobacterium* gelişimlerini uyardığı ve bu değişikliğin ise bifidobakteriyel EPS varlığından kaynaklanabileceğini rapor etmişlerdir.

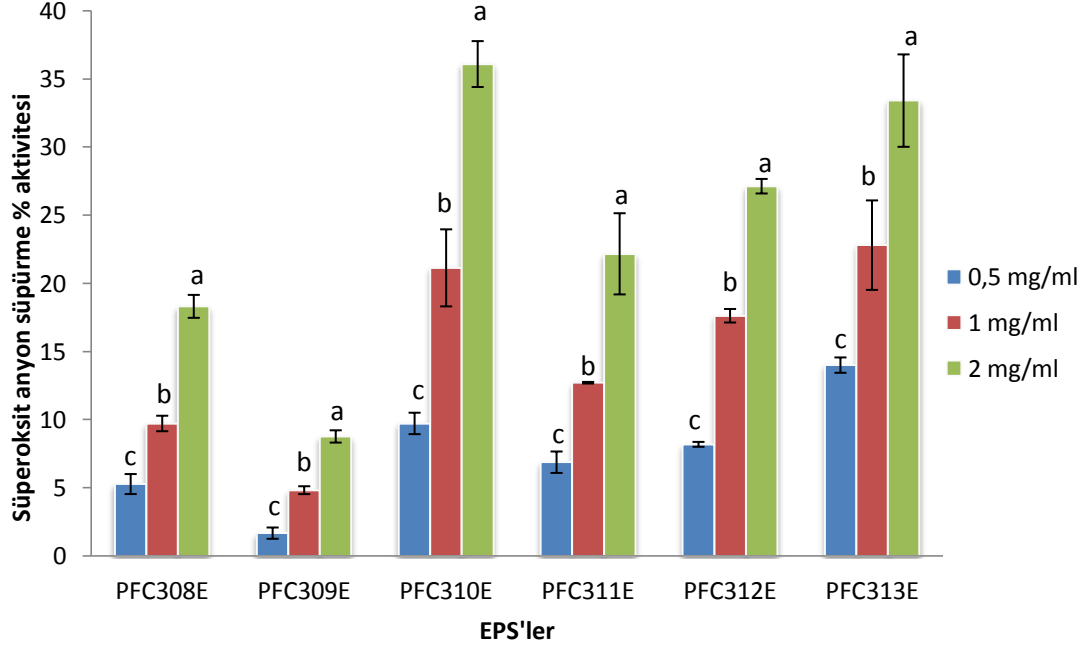
Tablo 3.2: Bazı LAB Suşları Tarafından Üretilen EPS’lerin Prebiyotik Etkisi (Ryan ve diğ. 2014)

Türler	Suşlar	Eps bileşimi	Gelişen bakteri popülasyonu
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	LTH1729	Fru:Glu	<i>Bifidobacteria</i> & <i>Eubacteria</i> biforme
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	IPLA E44	N/K	<i>Bifidobacteria</i> , <i>Lactobacilli</i> , <i>Enterococci</i> , <i>Bacteroides</i> & <i>Prevotella</i>
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	IPLA R1	Glu:Gal:Ram	<i>Bifidobacteria</i> , <i>Lactobacilli</i> , <i>Enterococci</i> , <i>Bacteroides</i> & <i>Prevotella</i> .
<i>Lactobacillus plantarum</i>	301102S	Glu:Man	<i>Pediococci</i> & <i>Lactobacilli</i>
<i>Weissella cibaria</i>	A2		
<i>Weissella confuse</i>	A9		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	A3	N/K	<i>Bifidobacteria</i> , <i>Lactobacilli</i> , ve <i>Clostridia</i> ↓
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	5S4		
<i>Pediococcus parvulus</i>	2.6	(1,3)-β-Glucan	<i>Lactobacilli</i>
Fru fruktoz; Glu glukoz; Gal galaktoz; Man mannoz; Ram ramnoz; ↓ azaltmak; N/K bilinmiyor			

3.4 *L. plantarum* Suşlarından Üretilen EPS'lerin Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi

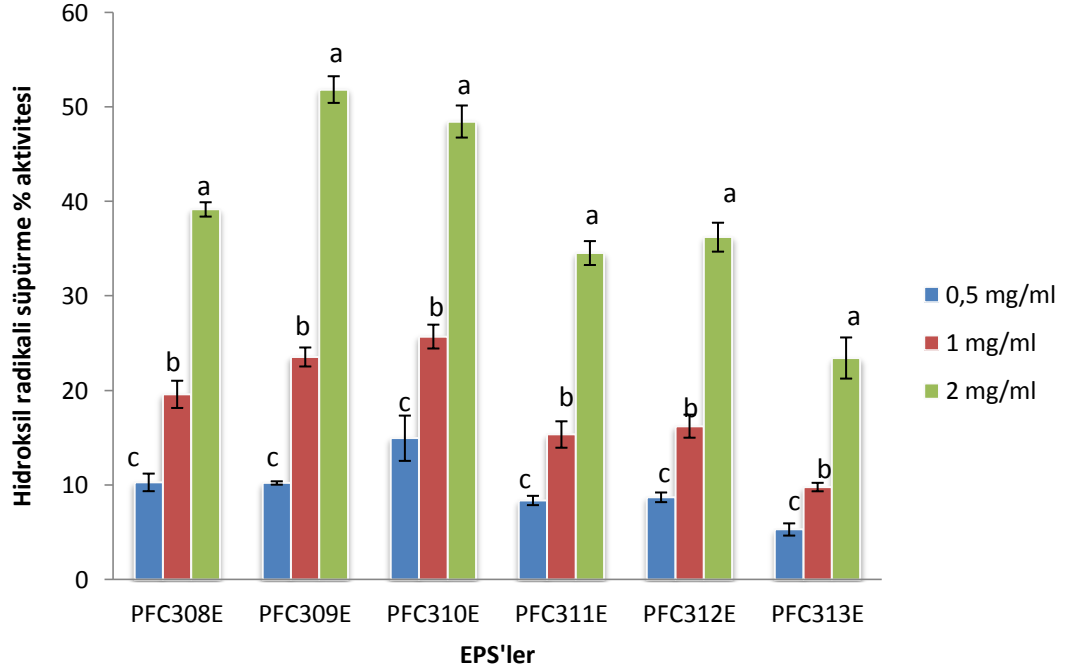
Çalışmada *L. plantarum* PFC308, 309, 310, 311, 312 ve 313 suşlarından elde edilen EPS'lerin antioksidan aktiviteleri, süperoksit anyon süpürme, hidroksil radikali süpürme ve radikal süpürme özellikleri tespit edilerek belirlenmiştir. Yapılan analizlerin sonuçları Şekil 3.15, Şekil 3.16 ve Şekil 3.17'de verilmiştir.

Şekil 3.15'e göre süperoksit anyon süpürme aktivite değerlerinde kullanılan EPS konsantrasyonlarına bağlı olarak farklılık olduğu ($p < 0.05$) ve en yüksek aktivitenin *L. plantarum* PFC310 suşundan üretilen EPS'de (2 mg ml^{-1} konsantrasyon kullanıldığında) %36,11 olduğu belirlenmiştir. Tüm EPS'lerin konsantrasyonun artışı ile birlikte antioksidan aktivitesi de artış göstermiştir. Literatür verileri incelendiğinde EPS'lerin süperoksit anyon süpürme aktivitenin 2 mg/ml konsantrasyonda %6-%72,1 arasında olduğu görülmektedir (Pan ve Mei 2010, Xu ve diğ. 2011^a, Abdhul ve diğ. 2014, Zhang ve diğ. 2016, Riaz Rajoka ve diğ. 2017, Adesulu-Dahunsi ve diğ., 2018^b). Buna göre, *L. plantarum* PFC308, 309, 310, 311, 312 ve 313 suşlarından üretilen EPS'lerin daha önce rapor edilen LAB suşlarından üretilen EPS'lerin süperoksit anyon süpürme % aktiviteleri karşılaştırıldığında birbiri ile uyumlu olduğu görülmüştür.



Şekil 3.15: *L. plantarum* PFC308, 309, 310, 311, 312 ve 313 suşlarından elde edilen EPS'lerin süperoksit anyon süpürme % aktivitesi

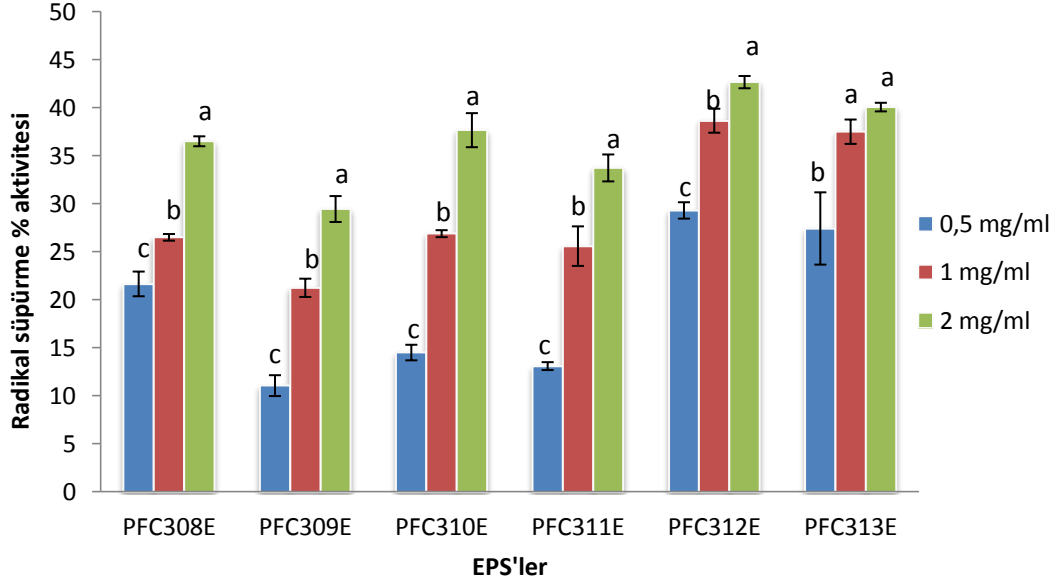
Şekil 3.16'da verilen hidroksil radikali süpürme aktivite değerlerine göre, kullanılan EPS konsantrasyonuna bağlı olarak aktivite değerleri artmış ($p < 0.05$) ve en yüksek hidroksil radikali süpürme aktivitesi (%51,86) *L. plantarum* PFC309'dan elde edilen EPS'nin 2 mg/ml konsantrasyonunda belirlenmiştir. Her suşa ait EPS'lerin konsantrasyonu arttıkça, özellikle konsantrasyon miktarının 2 katına çıkarılmasıyla hidroksil radikali süpürme aktivite değerleri de yaklaşık 2 kat artmıştır. Literatürler incelendiğinde LAB'lerden üretilen EPS'lerin hidroksil radikali süpürme aktivitesi %27,83-79,30 arasında olduğu ve bu aktivitelerin konsantrasyonlara bağımlı olarak değiştiğinin rapor edildiği birçok çalışma mevcuttur (Xu ve diğ. 2011^a, Xu ve diğ. 2011^b, Xing ve diğ. 2015, Riaz Rajoka ve diğ. 2017). Bu verilerle çalışmada elde edilen sonuçlar kıyaslandığında *L. plantarum* PFC308, 309, 310, 311 ve 312 suşlarından üretilen EPS'lerin, 2 mg/ml konsantrasyonda hidroksil radikali süpürme aktivitelerinin literatürle uyumlu olduğu belirlenmiştir. Ancak PFC313E'nin hidroksil radikali süpürme aktivitesi literatürde rapor edilen değerlerin altında bulunmuştur.



Şekil 3.16: *L. plantarum* PFC308, 309, 310, 311, 312 ve 313 suşlarından elde edilen EPS'lerin hidroksil radikali süpürme % aktivitesi

L. plantarum PFC308, 309, 310, 311, 312 ve 313 suşlarından elde edilen EPS'lerin radikal süpürme aktivite değerlerinin verildiği Şekil 3.17 incelendiğinde EPS'lerin konsantrasyonu arttıkça aktivite değerlerinin de arttığı görülmektedir ($p < 0.05$). EPS konsantrasyonuna bağlı olarak en fazla artış PFC310E ve PFC311E'de izlenmiştir. En yüksek radikal süpürme aktivite değerinin *L. plantarum* PFC312'den elde edilen EPS'de %42,67 ve 2 mg/ml konsantrasyonda olduğu belirlenmiştir. Literatürde de EPS'lerin radikal süpürme aktivitelerinin 2 mg/ml konsantrasyonda %6-50,7 aralığında olduğu ve konsantrasyona bağlı bir şekilde artan konsantrasyonla radikal süpürme aktivitesinin arttığı rapor edilmiştir (Xu ve diğ. 2010^b, Ye ve diğ. 2012, Zhang ve diğ. 2013, Li ve diğ. 2014, Zhang ve diğ. 2016, Riaz Rajoka ve diğ. 2017, Adesulu-Dahunsi ve diğ. 2018^a, Adesulu-Dahunsi ve diğ. 2018^b). *L. plantarum* PFC308, 309, 310, 311, 312 ve 313 suşlarından elde edilen EPS'lerin çalışma sonucunda ulaşılan radikal süpürme aktiviteleri ile literatür verileri kıyaslandığında, tüm EPS'lerin radikal süpürme aktiviteleri literatür verileri aralığında olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan EPS'lerimizin arasından en düşük radikal süpürme aktivite değerine sahip olan PFC309E EPS'sinin (%29,46) % aktivitesinin Zhang ve diğ. (2016) *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 den elde ettiği

EPS'nin radikal süpürme aktivitesinden (%6) aynı EPS konsantrasyonunda 4 kat daha yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

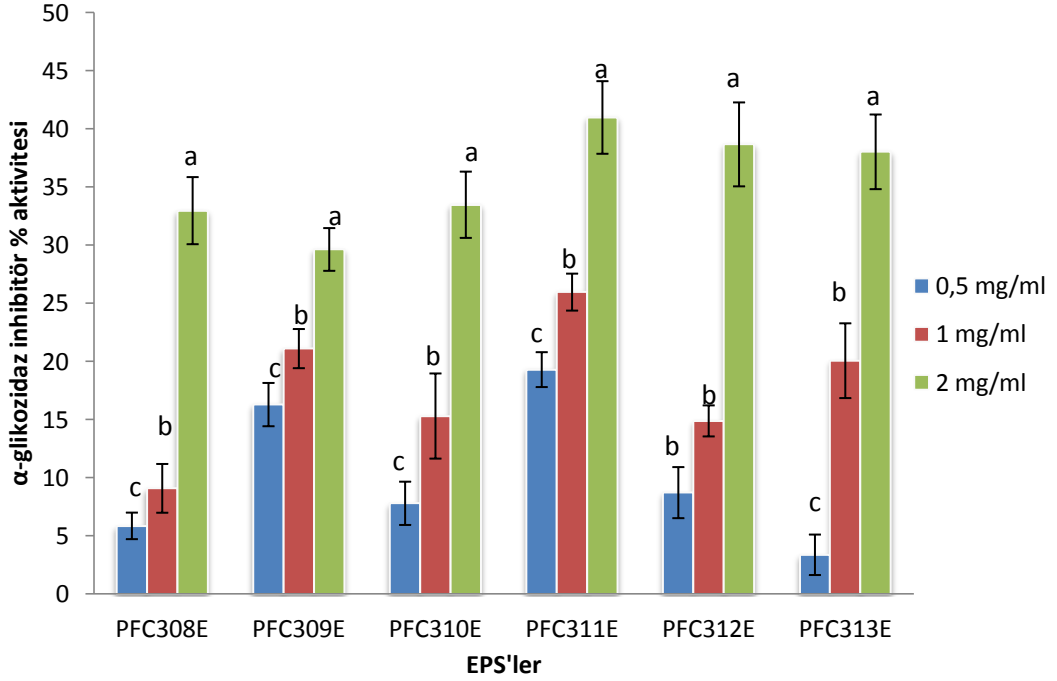


Şekil 3.17: *L. plantarum* PFC308, 309, 310, 311, 312 ve 313 suşlarından elde edilen EPS'lerin radikal süpürme % aktivitesi

3.5 *L. plantarum* Suşlarından Üretilen EPS'lerin Alfa Glukozidaz İnhibitör Aktivitelerinin Belirlenmesi

L. plantarum PFC308, 309, 310, 311, 312 ve 313 suşlarından üretilen EPS'lerin alfa glukozidaz inhibitör aktiviteleri 2.2.5'de verilen metoda göre belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 3.18'de gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan tüm EPS'ler α -glukozidaz enzim aktivitesini çeşitli seviyelerde inhibe etmiştir. EPS örneklerinin tümünde konsantrasyona bağlı olarak söz konusu enzimin inhibisyonunda anlamlı ($p < 0.05$) artış gerçekleşmiştir. EPS'ler arasında en yüksek enzim inhibisyon aktivitesi PFC311E'de meydana gelmiştir. En düşük inhibisyon ise 0.5, 1, 2 mg/ml konsantrasyonlarda sırasıyla PFC313E, PFC308E ve PFC309E'de EPS'lerinin kullanılması durumunda ölçülmüştür. PFC309E ve PFC311E hariç diğer tüm EPS'lerde konsantrasyonun 1'den 2 mg/ml'ye çıkarılması durumunda α -glukozidaz enzim aktivitesi önemli oranda inhibe olmuştur. Literatür incelemesi yapıldığında *Lactobacillus* suşları tarafından üretilen EPS'lerin α -glukozidaz enzim

aktivitesini inhibe ettiği ve en yüksek α -glukozidaz inhibitör aktivite değerinin %67 olduğu görülmüştür (Sasikumar ve diğ. 2017, Oh ve diğ. 2018). Çalışmada kullandığımız suşlardan elde edilen EPS'lerin α -glukozidaz inhibitör aktivitelerinin literatür verilerine göre düşük olduğu belirlenmiştir.

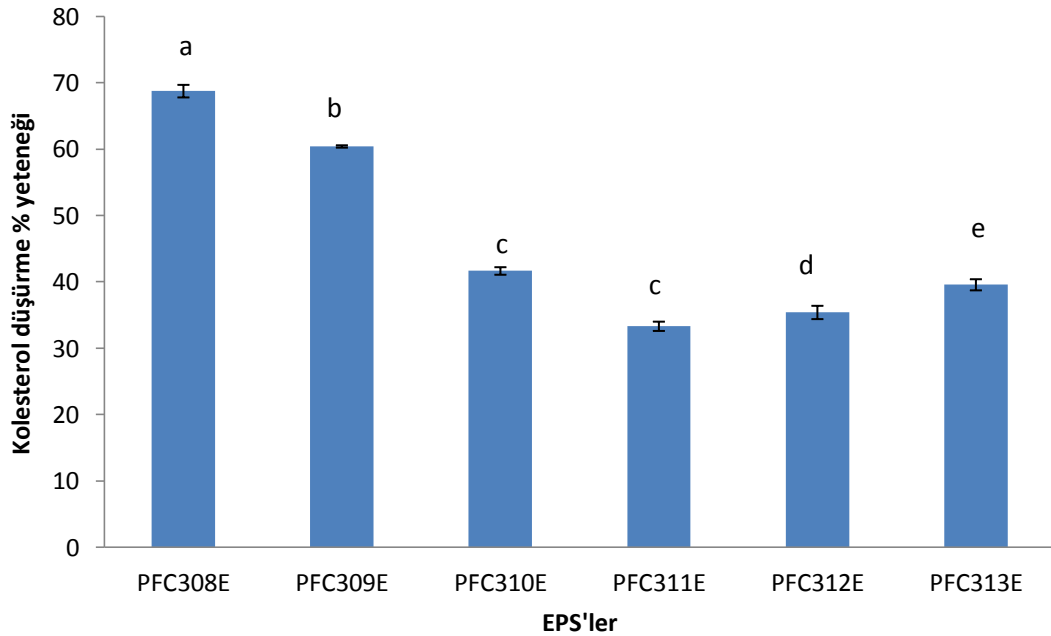


Şekil 3.18: *L. plantarum* PFC308, 309, 310, 311, 312 ve 313 suşlarından elde edilen EPS'lerin alfa glikozidaz inhibitör % aktivitesi

3.6 *L. plantarum* Suşlarından Üretilen EPS'lerin Kolesterol Seviyesini Düşürme Yeteneklerinin Belirlenmesi

L. plantarum PFC308, 309, 310, 311, 312 ve 313 suşlarından elde edilen EPS'lerin kolesterol düşürme yetenekleri bölüm 2.2.6'da anlatılan metotla yapılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.19'da verilmiştir. Yapılan analiz ve hesaplamalar sonucunda, çalışmada kullanılan tüm suşlar tarafından üretilen EPS'lerin kolesterol düşürme yeteneklerinin olduğu belirlenmiş, ancak suşlara bağlı olarak söz konusu kolesterol seviyesini düşürebilme % değerlerinde farklılık olduğu gözlenmiştir. EPS'ler arasında en yüksek PFC308E %68,75 oranında kolesterolü düşürürken, en düşük kolesterol düşürme aktivitesi PFCE311 suşundan üretilen EPS de %33,33 oranı ile tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Diğerlerinde ise sırasıyla PFC309E %60,41,

PFC310E %41,66, PFCE313 %39,58, PFCE312 %35,41 oranında kolesterol seviyesini düşürebildikleri belirlenmiştir. Bu tez çalışmasına benzer şekilde bugüne kadar yapılmış olan birçok çalışmada LAB'lerden üretilen EPS'lerin kolesterol düşürücü özelliğe sahip olduğu vurgulanmıştır (Maeda ve diğ. 2004, Patel ve diğ. 2012, Abdelazez ve diğ. 2018, Wang ve diğ. 2012, Ayyash ve diğ. 2018, Bengoa ve diğ. 2018, Adesulu-Dahunsi ve diğ. 2018^b). Söz konusu çalışmalarda EPS'lerin kolesterol düşürme yeteneklerinin %31-%48,81 arasında değişen oranlarda olduğu görülmüştür (Uchida ve diğ. 2010, Tsai ve diğ. 2014, Sasikumar ve diğ. 2017, Bhat ve Bajaj, 2018). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ise literatür verileri ile kıyaslandığında PFC310E, PFC311E, PFC312E ve PFC313E EPS'lerinin bu aralıkta olduğu ancak PFC308E ve PFC309E EPS'lerinin kolesterol düşürme yeteneklerinin literatür verilerinin üzerinde bir düşürme etkisi gösterdiği görülmektedir. Bu sonuç söz konusu EPS'lerin yapılarının farklılığına ve kolesterol giderimi yönünde kullanılabileceğine işaret etmektedir.



Şekil 3.19: *L. plantarum* PFC308, 309, 310, 311, 312 ve 313 suşlarından elde edilen EPS'lerin kolesterol seviyesini düşürme yetenekleri

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, geleneksel gıdamız olan tarhanadan izole edilen ve EPS üreticisi oldukları bilinen *L. plantarum*'un 6 farklı suşu çalışılmıştır. Yapılan çalışmalarda, GRAS olarak kabul edilen *L. plantarum* suşlarından elde edilen EPS'lerin insan sağlığı üzerine olumlu, iyileştirici ve destekleyici özellikleri vurgulanmıştır. Günümüzde mikrobiyal EPS'lere bu özelliklerinden dolayı ilgi hızla artmaktadır. Bu artan ilgiden ilham alınarak yapılan bu çalışmanın temel amacı doğrultusunda 6 farklı *L. plantarum* suşlarından elde edilen EPS'lerin prebiyotik, antioksidan, kolesterol seviyesine etkisi, α -glukozidaz enzim inhibitör aktivitesi ve HT-29 hücre hattı üzerindeki bağışıklık sitokinlerini indükleme yetenekleri araştırılmıştır. Yapılan bu çalışma kapsamında aşağıdaki sonuçlara ulaşılmış ve öneriler ortaya çıkarılmıştır.

Tarhanadan izole edilen ve EPS üreticisi oldukları bilinen *L. plantarum* PFC308, PFC309, PFC310, PFC311, PFC312 ve PFC313 suşları tarafından üretilen EPS'lerin miktarlarının farklı olduğu belirlenmiştir. Böylece EPS miktarının suşlara bağlı olarak farklılık gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Çalışmada en yüksek miktarda *L. plantarum* PFC308 suşundan EPS elde edilmiştir. Yüksek miktarda EPS kullanımı gerektiren çalışmalarda PFC308 suşu tercih edilebilir özellik göstermektedir.

L. plantarum PFC308, PFC309, PFC310, PFC311, PFC312 ve PFC313 suşlarından üretilen EPS'lerin 4 farklı probiyotik bakteriler tarafından prebiyotik olarak kullanılma oranlarını araştırılmış ve söz konusu suşların prebiyotik olarak kullanılabilmesi sonucuna ulaşılmıştır. *L. acidophilus* DSM 20079, *L. rhamnosus* GG ve *L. casei* subsp. *shirota* probiyotik suşları tarafında en iyi kullanılan EPS'nin PFC311E, *B. bifidum* DSM 20082 probiyotik suşu tarafından ise en iyi kullanılan EPS'nin PFC310E olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar ile prebiyotik olarak tercih edilebilecek veya gıdalara eklenebilecek suşlar olarak *L. plantarum* PFC310 ve PFC311 suşları tercih edilebilir.

Makromoleküllere hasar vererek insan sağlığında tehlike yaratan radikallerin vücuttan süpürülmesi büyük önem taşır. Yaptığımız çalışma sonucunda kullanılan suşlardan elde edilen EPS'lerin antioksidan aktivitelerinin olduğu tespit edilmiştir.

Süperoksit anyon süpürme aktivitesi en yüksek PFC310E, hidroksil radikali süpürme aktivitesinin en yüksek olduğu PFC309E ve radikal süpürme aktivitesinin en yüksek olduğu PFC312E EPS'leri olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlarla yüksek aktivite veren suşların gıdalarda sentetik antioksidanların yerine ikame olarak kullanılabilceği düşünülmüştür.

Çalışmada kullanılan tüm EPS'lerin farklı %'lerde kan serumunda bulunan kolesterol seviyesini düşürme yeteneğine sahip oldukları ve en yüksek kolesterol seviyesini düşürme yeteneğine sahip olan PFC308E EPS'si olarak belirlenmiştir. Günümüzde kan serumundaki %10'luk kolesterol seviyesinde azalmayla kalp hastalığı insidansının önemli miktarda azalacağı bilinmektedir. Bu bağlamda kan serumunda bulunan kolesterol düşürme yetenekleri belirlenen *L. plantarum* suşlarımızdan elde edilen EPS'lerin adjuvan olarak kullanılma ihtimali göz önünde bulundurulabilir.

Literatür verileri ile kullanılan suşlarımızdan elde edilen EPS'lerin alfa glukozidaz inhibitör aktiviteleri kıyaslandığında sonuçlarımızın literatür verilerinin altında kaldığı belirlenmiştir. Ancak buna rağmen kullanılan tüm EPS'lerimizin % inhibitör etkisi gösterdiği ve PFC311E'nin en yüksek inhibitör aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir.

Anti-inflamatuar ve pro-inflamatuar sitokinleri indüklemeye yeteneğinin EPS'lerin konsantrasyonuna ve her suşa göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan EPS'lerin pro-inflamatuar etkilerinin anti-inflamatuar etkiye nazaran daha yüksek etkili oldukları belirlenmiştir. Buna göre özellikle PFC310E ve PFC311E EPS'leri oldukça başarılı EPS'lerdir. Ancak PFC313E'nin ise tüm sitokinleri belirli seviyeye kadar uyurabildiği dikkati çekmektedir.

Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde 6 adet *L. plantarum* suşları tarafından üretilen EPS'lerin çeşitli yönlerden sağlığı iyileştirici etkilerinin farklı düzeyde oldukları görülmüştür. Bu sonuç, söz konusu EPS'lerin yapısal farklılığının fonksiyonel farklılığa neden olduğuna işaret etmektedir. Sonraki çalışmalara ışık tutmak adına EPS yapılarının fonksiyonel özellikler üzerine etkisi araştırılmalıdır. Ayrıca bu çalışmanın sonuçlarına göre PFC310E ve PFC311E EPS'leri prebiyotik, antioksidan, kolesterol seviyesine etkisi, α -glukozidaz enzim inhibitör aktivitesi ve

HT-29 hücre hattı üzerindeki bağışıklık sitokinlerini indükleme yeteneklerindeki başarıları dolayısıyla sağığın korunması ve iyileştirilmesi yönünde önerilebilir.

5. KAYNAKLAR

Abdhul, K., Ganesh, M., Shanmughapriya, S., Kanagavel, M., Anbarasu, K. and Natarajaseenivasan K., “Antioxidant activity of exopolysaccharide from probiotic strain *Enterococcus faecium* (BDU7) from Ngari”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 450-454, (2014).

Abdelazez, A., Abdelmotaal, H., Zhu, Z. T., Fang-Fang, J., Sami, R., Zhang, L. J., Al-Tawaha, A. R. and Meng, X. C., “Potential benefits of *Lactobacillus plantarum* as probiotic and its advantages in human health and industrial applications: a review”, *Advances in Environmental Biology*, 12(1), 16-27, (2018).

Abid, Y., Casillo, A., Gharsallah, H., Joulak, I., Lanzetta, R., Corsaro, M. M., Attia, H. and Azabou S., “Production and structural characterization of exopolysaccharides from newly isolated probiotic lactic acid bacteria”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 719–728, (2018).

Adesulu-Dahunsi, A. T., Jeyaram, K. and Sanni, A. I., “Probiotic and technological properties of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from cereal-based nigerian fermented food products”, *Food Control*, 92, 225-231, (2018^a).

Adesulu-Dahunsi, A. T., Jeyaram, K. and Sanni, A. I., “Production of exopolysaccharide by strains of *Lactobacillus plantarum* YO175 and OF101 isolated from traditional fermented cereal beverage”, *Peer J Preprints*, (2018^b). <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.26579v1>

Adesulu-Dahunsi, A. T., Sanni, A. I. and Jeyaram, K., “Production, characterization and *in vitro* antioxidant activities of exopolysaccharide from *Weissella cibaria* GA44”, *LWT -Food Science and Technology*, 87, 432-442, (2018^c).

Ahire, J., Bhat, A., Thakare, J. M., Pawar, P. B., Zope, D. G., Jain, R. M. and Chaudhari, B. L., “Cholesterol as-similation and biotransformation by *Lactobacillus helveticus*”, *Biotechnology Letters*, 34, 103–107, (2012).

Ahmad, N. H., Mustafa, S., and Che Man, Y. B. “Microbial polysaccharides and their modification approaches: a review”, *International Journal of Food Properties*, 18, 332–347, (2015).

Alp, D. ve Ertürkmen, P., “Probiyotik olarak kullanılan *Lactobacillus spp.* suşlarının kolesterol düşürücü etkileri ve olası mekanizmalar”, *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8(1), 108-113, (2017).

Anonim, “Kanser Nedir?”, *Türk Tibbi Onkoloji Derneği*, (2016).

Anwar, M. A., Kralj, S., van der Maarel M. J. and Dijkhuizen, L., “The probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 produces high-molecular-mass inulin from sucrose by using an inulosucrase enzyme”, *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 3426-3433, (2008).

Ateş, Ö., “Systems biology of microbial exopolysaccharide production”, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3, 200, (2015).

Ayyash, M., Abu-Jdayil, B., Hamed, F. and Shaker, R., “Rheological, textural, microstructural and sensory impact of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus plantarum* isolated from camel milk on low-fat akawi cheese”, *LWT- Food Science and Technology*, 87, 423-431, (2018).

Axelsson, L., *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspect*, New York: Marcel Dekker, 1-66, (2004).

Badel, S., Bernardi, T. and Michaud, P., “New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides”, *Biotechnology Advances*, 29(1), 54-66, (2011).

Bai, L., Wang, L. and Ji, S., “Structural elucidation and antioxidant activities of transactions”, *Chemical Engineering Transactions*, 55, 61-66, (2016).

Baruah, R., Maina, N. H., Katina, K., Juvonen, R. and Goyal, A., “Functional food applications of dextran from *Weissella cibaria* RBA12 from pummelo (*Citrus maxima*)”, *International Journal of Food Microbiology*, 242, 124-131, (2017).

Bayraktar, M., “Oral hipoglisemikler”, *Türkiye Tıp Dergisi*, 8(Ek 1), 35-44, (2001).

Behera, S. S., Ray, R. C. and Zdolec, N., “*Lactobacillus plantarum* with functional properties: an approach to increase safety and shelf-life of fermented foods”, *Hindawi BioMed Research International*, 1-18, (2018).

Bengoa, A. A., Goretti Llamas, M., Iraporda, C., Teresa Duenas, M., Abraham, A. G. and Garrote, G.L., “Impact of growth temperature on exopolysaccharide production and probiotic properties of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir grains”, *Food Microbiology*, 69, 212-218, (2018).

Bhat, B. and Bajaj, B. K., “Hypocholesterolemic and bioactive potential of exopolysaccharide from a probiotic *Enterococcus faecium* K1 isolated from kalarei”, *Bioresource Technology*, 254, 264–267, (2018).

- Blagojev, N., Škrinjar, M., Vesković-Moračanin, S. and Šošo, V., “Control of mould growth and mycotoxin production by lactic acid bacteria metabolites”, *Romanian Biotechnological Letters*, 17(3), 7219-7226, (2012).
- Bleau, C., Monges, A., Rashidan, K., Laverdure, J. P., Lacroix, M., Van Calsteren, M. R., Millette, M., Savard, R. and Lamontagne, L., “Intermediate chains of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M increase IL-10 production by macrophages”, *Journal of Applied Microbiology*, 108, 666-675, (2010).
- Broadbent, J. R., McMahon, D. J., Welker, D. L., Oberg, C. J. and Moineau, S., “Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: a review”, *Journal of Dairy Science*, 86, 407-423, (2003).
- Bron, P. A., Van Baarlen, P. and Kleerebezem, M., “Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa”, *Nature Reviews Microbiology*, 10(1), 66-78, (2012).
- Bulut-Albayrak, Ç., “Antifungal aktivite üreten laktik asit bakterileri”, *Adü Ziraat Dergisi*, 14(1), 79-85, (2017).
- Caggianiello, G., Kleerebezem, M. and Spano, G., “Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 3877–3886, (2016).
- Chabot, S., Yu, H. L., De Leseleuc, L., Cloutier, D., Van Calsteren, M. R., Lessard, M., Roy, D., Lacroix, M. and Oth, D., “Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN- γ in mouse splenocytes”, *Le Lait INRA Editions*, 81(6), 683-697, (2001).
- Claesson, M. J., van Sinderen, D. and O’Toole, P. W., “The genus *Lactobacillus*-a genomic basis for understanding its diversity: mini review”, *FEMS Microbiology Letters*, 269, 22–28, (2007).
- Cengiz-Ecemiş, G. ve Atmaca, H. “Oral antidiyabetik ajanlar”, *Deneysel ve Klinik Tıp Dergisi*, 29, 23-29, (2012).
- Chen, P., Zhang, Q., Dang, H., Liu, X., Tian, F., Zhao, J., Chen, Y., Zhang, H. and Chen, W., “Screening for potential new probiotic based on probiotic properties and α -glucosidase inhibitory activity”, *Food Control*, 35, 65-72, (2014).

Crowley, S., Mahony, J. and van Sinderen, D., “Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives”, *Trends in Food Science and Technology*, 33(2), 93-109, (2013).

Çetinkaya, E. ve Ayhan, K., “Mikrobiyolojide kullanılan bazı moleküler teknikler”, *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 2 (1), 53-62, (2012).

Çon, A. H. ve Gökalp, H. Y., “Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal metabolitleri ve etki şekilleri”, *Türk Mikrobiyol Cem Dergisi*, 30, 180-190, (2000).

Dal Bello, F., Walter, J., Hertel, C. and Hammes, W. P., “*In vitro* study of prebiotic properties of levan-type exopolysaccharides from *Lactobacilli* and non-digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis”, *Systematic and Applied Microbiology*, 24, 232–237, (2001).

Das, D., Baruah, R. and Goyal, A., “A food additive with prebiotic properties of α -d-glucan from *Lactobacillus plantarum* DM5”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 69, 20–26, (2014).

Dertli, E., Colquhoun, I. J., Gunning, A. P., Bongaerts, R. J., Le Gall, G., Bonev, B. B., Mayer, M. J. and Narbad, A., “Structure and biosynthesis of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus johnsonii* FI9785”, *Journal of Biological Chemistry*, 288(44), 31938-51, (2013).

Dertli, E., Mercan, E., Arıcı, M., Yılmaz, M. T. and Sağdıç, O., “Characterisation of lactic acid bacteria from Turkish sourdough and determination of their exopolysaccharide (EPS) production characteristics”, *LWT- Food Science and Technology*, 71, 116-124, (2016).

De Vuyst, L. and Degeest, B., “Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria”, *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 153-177, (1999).

De Vuyst, L., de Vin, F., Vaningelgem, F. and Degeest, B., “Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria”, *International Dairy Journal*, 11, 687-707, (2001).

Dilna, S. V., Surya, H., Aswathy, R. G., Varsha, K. K., Sakthikumar, D. N., Pandey, A. and Nampoothiri, K. M., “Characterization of an exopolysaccharide with potential healthbenefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4”, *LWT- Food Science and Technology*, 64, 1179-1186, (2015).

Endo A. ve Okada S., “Monitoring the lactic acid bacterial diversity during schochu fermentation by pcr-denaturing gradient gel electrophoresis”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99, 216- 221, (2005).

- El- Deeb, N. M., Yassin, A. M., Al- Madboly, L. A. and El- Hawiet, A., “A novel purified *Lactobacillus acidophilus* 20079 exopolysaccharide, LA- EPS- 20079, molecularly regulates both apoptotic and NF- κ B inflammatory pathways in human colon cancer”, *Microbial Cell Factories*, 17-29, (2018).
- Evren, M., Albayram, C. ve Apan, M., “Laktik asit bakterilerinin oluşturduğu antimikrobiyel maddeler”, *Türkiye 9. Gıda Kongresi*, Bolu, (2006).
- Fanning, S., Hall, L. J., Cronin, M., Zomer, A., MacSharry, J., Goulding, D., Motherway, M. O., Shanahan, F., Nally, K., Dougan, G. and van Sinderen, D., “Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection”, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 109, 2108-2113, (2012^a).
- Fanning, S., Hall, L. J. and van Sinderen, D., “*Bifidobacterium breve* UCC2003 surface exopolysaccharide production is a beneficial trait mediating commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection”, *Gut Microbes*, 3, 420–425, (2012).
- Finkel, T. and Holbrook, N. J., “Oxidant, oxidative stress and biology of ageing”, *Nature*, 408, 239–247, (2000).
- Fredriksen, L., Kleiveland, C. R., Hult, L. T., Lea, T., Nygaard, C. S., Eijsink, V. G. and Mathiesen, G., “Surface display of N-terminally anchored invasin by *Lactobacillus plantarum* activates NF- κ B in monocytes”, *Applied And Environmental Microbiology*, 78(16), 5864-7581, (2012).
- Freitas, F., Alves, V. D., Reis, M. A., Crespo, J. G. and Coelho, I. M., “Microbial polysaccharide-based membranes: current and future applications”, *Journal of Applied Polymer Science*, 6, 131-133, (2014).
- Gaspar, P., Carvalho, A. L., Vinga, S., Santos, H. And Neves, A. R., “From physiology to systems metabolic engineering for the production of agnoliolate by lactic acid bacteria”, *Biotechnology Advances*, 31, 764–788, (2013).
- Gao, Q., Qi, L., Wu, T. and Wang, J., “An important role of interleukin-10 in counteracting excessive immune response in HT-29 cells exposed to *Clostridium butyricum*”, *BMC Microbiology*, 12, 100, (2012).
- Gopal, P. K., Sullivan, P. A. and Smart, J. B., “Utilisation of galacto-oligosaccharides as selective substrates for growth by lactic acid bacteria including *Bifidobacterium lactis* DR10 and *Lactobacillus rhamnosus* DR20”, *International Dairy Journal*, 11, 19-25, (2001).

- Gunnarsson, H., Ekholm, A. and Olsson, L. I., “Emergency presentation and socioeconomic status in colon cancer”, *EJSO*, 39, 831-836, (2013).
- Haghshenas, B., Nami, Y., Haghshenas, M., Abdullah, N., Rosli, R., Radiah, D. and Khosroushahi, A. Y., “Bioactivity characterization of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products”, *Microbiologyopen*, 4(5), 803–813, (2015).
- Harutoshi, T., “Exopolysaccharides of Lactic Acid Bacteria for Food and Colon Health Applications”, *Lactic Acid Bacteria – R & D for Food, Health and Livestock Purposes*, chapter 22, 515-538, (2013).
- Hidalgo-Cantabrana, C., López, P., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. G., Suárez, A., Margolles, A. and Ruas-Madiedo, P., “Immune modulation capability of exopolysaccharides synthesised by lactic acid bacteria and bifidobacteria”, *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4, 227–237, (2012).
- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. and Schillinger, U., “Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition”, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73 (2), 365-373, (2001).
- Hongpattarakere, T., Cherntong, N., Wichienchot, S., Kolida, S. and Rastall, R. A., “*In vitro* prebiotic evaluation of exopolysaccharides produced by marine isolated lactic acid bacteria”, *Carbohydrate Polymers*, 87, 846–852, (2012).
- Huang, D., Ou, B. and Prior, R. L., “The chemistry behind antioxidant capacity assays”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856, (2005).
- Huang, S. Q., Ding, S. and Fan, L., “Antioxidant activities of five polysaccharides from *Inonotus obliquus*”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(5), 1183-1187, (2012).
- Huebner, J., Wehling, R. L. and Hutkins, R. W., “Functional activity of commercial prebiotics”, *International Dairy Journal*, 17, 770-775, (2007).
- Ismail, B. and Nampoothiri, K. M., “Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510”, *Archives of Microbiology*, 192, 1049-1057, (2010).
- Jianga, X., Zhang, Z., Chena, Y., Cui, Z., Shi, L. “Structural elucidation and *in vitro* antitumor activity of a novel oligosaccharide from *Bombyx batryticatus*”, *Carbohydrate Polymers*, 103, 434–441, (2014).

- Jong-Anurakkun, N., Bhandari, M. R. and Kawabata, J., “ α -Glucosidase inhibitors from Devil tree (*Alstonia scholaris*)”, *Food Chemistry*, 103(4), 1319-1323, (2007).
- Jose, N. M., Bunt, C. R. and Hussain, M. A., “Comparison of microbiological and probiotic characteristics of lactobacilli isolates from dairy food products and animal rumen contents”, *Microorganisms*, 3(2), 198-212, (2015).
- Kajala, I., Shi, Q., Nyysola, A., Maina, N. H., Hou, Y. and Katina, K., “Cloning and characterization of a *Weissella confusa* dextranucrase and its application in high fibre baking”, *PLoS ONE*, 10(1), 0116418, (2015).
- Kanmani, P., Suganya, K., Kumar, R. S., Yuvaraj, N., Pattukumar, V., Paari, K. A. and Arul, V., “Synthesis and Functional Characterization of Antibiofilm Exopolysaccharide Produced by *Enterococcus faecium* MC13 Isolated from the Gut of Fish”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169(3), 1001, (2013).
- Kanmani, P., Albarracin, L., Kobayashi, H., Iida, H., Komatsu, R., Kober, A. H., Ikeda-Ohtsubo, W., Suda, Y., Aso, H., Makino, S. and Kano, H., “Exopolysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii* OLL1073R-1 modulate innate antiviral immune response in porcine intestinal epithelial cells”, *Molecular Immunology*, 93, 253–265, (2018).
- Kaplan, H. and Hutkins, R. W., “Metabolism of fructooligosaccharides by *Lactobacillus paracasei* 1195”, *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2217-2222, (2003).
- Karabulut, H. ve Gülay, M. Ş., “Serbest radikaller”, *MAKÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1), 50-59, (2016^a).
- Karabulut, H. ve Gülay, M. Ş., “Antioksidanlar”, *MAE Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 1(1), 65-76, (2016^b).
- Karaca, H., Dinçer, E. ve Kıvanç, M., “Metabolik mühendisliğinde laktik asit bakterileri”, *Akademik Gıda* 8(1), 32-38, (2010).
- Karunanithi, S. and Levi, L., “High-fat diet and colorectal cancer: myths and facts”, *Future Oncology*, 14(6), 493–495, (2018).
- Kaur, C. and Kapoor, H. C., “Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium’s health”, *International Journal of Food Science & Technology*, 36, 703-725, (2001).
- Kazeem, M. I., Adamson, J. O. and Ogunwande I. A., “Modes of inhibition of α -amylase and α -glucosidase by aqueous extract of *Morinda lucida* benth

leaf”, *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International*, 1-6, (2013).

Kekkonen, R. A., Ahlroos, T., Suomalainen, T., Tynkkynen, S., Poussa, T., Nevala, R. and Korpela, R., “A combination of galacto-oligosaccharides and *Lactobacillus* GG increases bifidobacteria to a greater extent than *Lactobacillus* GG on its own”, *Milchwissenschaft*, 62, 326-330, (2007).

Kim, D. Y. and Shin, W. S., “Unique characteristics of self-assembly of bovineserum albumin and fucoidan, an anionic sulfated polysaccharide, undervarious aqueous environments”, *Food Hydrocolloids*, 44, 471–477, (2015).

Kim, K., Lee, G., Thanh, H. D., Kim, J. H., Konkit, M., Yoon, S., Park, M., Yang, S., Park, E. and Kim, W., “Exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* LRCC5310 offers protection against rotavirus-induced diarrhea and regulates inflammatory response”, *Journal of Dairy Science*, 101, 1–11, (2017).

Kim, S. D. ve Nho, J. H., “Isolation and characterization of α -glucosidase inhibitor from the fungus ganoderma lucidum”, *The Journal of Microbiology*, 42, 223-227, (2004).

Kitazawa, H., Harata, T., Uemura, J., Saito, T., Kaneko, T. And Itoh, T., “Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*”, *International Journal of Food Microbiology*, 40, 169-175, (1998).

Koca, N. ve Karadeniz, F., “Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri”, *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 16, 32-37, (2003).

Kumar, A. S., Mody, K. and Jha, B., “Bacterial exopolysaccharides-a perception”, *Journal of Basic Microbiology*, 47, 103-117, (2007).

Laiño, J., Villena, J., Kanmani, P. and Kitazawa, H., “Immunoregulatory effects triggered by lactic acid bacteria exopolysaccharides: new insights into molecular interactions with host cells: a review”, *Microorganisms*, 4-27, (2016).

Leemhuis, H., Pijning, T., Dobruchowska, J.M., Van Leeuwen, S. S., Kralj, S., Dijkstra, B. W. and Dijkhuizen, L. “Glucansucrases: threedimensional structures, reactions, mechanism, α -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications”, *Journal of Biotechnology*, 163, 250–272, (2013).

- Lebeer, S., Verhoeven, T. L., Perea Velez, M., Vanderleyden, J. and De Keersmaecker, S. C., “Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG”, *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 6768-6775, (2007).
- Leroy, F. and De Vuyst, L., “Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry”, *Trends in Food Science & Technology*, 15, 67–78, (2004).
- Li, S., and Shah, N. P., “Antioxidant and antibacterial activities of sulfated polysaccharides from *Pleurotus eryngii* and *Streptococcus thermophilus* ASCC1275”, *Food Chemistry*, 165, 262–270, (2014).
- Li, W., Ji, J., Chen, X., Jiang, M., Rui, X. and Dong, M., “Structural elucidation and antioxidant activities of exopolysaccharides from *Lactobacillus helveticus* MB2-1”, *Carbohydrate Polymers*, 15(2), 351-359, (2014).
- Li, W., Tang, W., Ji, J., Xia, X., Rui, X., Chen, X, Jiang, M., Zhou, J. And Dong, M., “Characterization of a novel polysaccharide with anti-colon cancer activity from *Lactobacillus helveticus* MB2-1”, *Carbohydrate Research*, 411, 6-14, (2015).
- Lin, C., Wang, C., Chang, S., Inbaraj, B. S. and Chen, B., “Antioxidative activity of polysaccharide fractions isolated from *Lycium barbarum* Linnaeus”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 45(2), 146–151, (2009).
- Lin, Y. and Sun, Z., “Current views on type 2 diabetes”, *Journal of Endocrinology*, 204(1), 1-11, (2010).
- Liu, C., Wang, C., Xu, Z. and Wang, Y., “Isolation, chemical characterization and antioxidant activities of two polysaccharide from the gel and the skin of *Aloe barbadensis* Miller irrigated with sea water”, *Process Biochemistry*, 42(6), 961–970, (2007).
- Liu, C. F., Hu, C. L., Chiang, S. S., Tseng, K. C., Yu, R. C. and Pan, T. M., “Beneficial preventive effects of gastric mucosal lesion for soy–skim milk fermented by lactic acid bacteria”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(10), 4433-4438, (2009).
- Liu, C. F., Tseng, K. C., Chiang, S. S., Lee, B. H., Hsu, W. H. and Pan, T. M., “Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus* exopolysaccharides”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(2), 2284-2291, (2011).

- Liu, C., Lu, J., Lu, L., Liu, Y., Wang, F. and Xiao, M., “Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1”, *Bioresource Technology*, 101, 5528–5533, (2010).
- Lynch, K. M., Zannini, E., Coffey, A. and Arendt E.K., “Lactic acid bacteria exopolysaccharides in foods and beverages: isolation, properties, characterization, and health benefits”, *Annual Review of Food Science Technology*, 9, 155–176, (2018).
- Madigan, T. M. ve Martinko, J. M., “Prokaryotik çeşitlilik: bacteria”, (eds: Ö. Yeşilada ve C. Çökmüş), *Mikroorganizmaların Biyolojisi*, Ankara: Palme Yayıncılık, 329-419, (2012).
- Maeda, H., Zhu, X., Omura, K., Suzuki, S. and Kitamura, S., “Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation”, *Biofactors*, 22, 197–200, (2004).
- Manohar, V., Talpur, N. A., Echard, B. W., Lieberman, S. and Preuss, H. G., “Effects of a water-soluble extract of maitake mushroom on circulating glucose/insulin concentrations in KK mice,” *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 4(1), 43–48, (2002).
- Martino, M. E., Bayjanov, J. R., Caffrey, B. E., Wels, M., Joncour, P., Hughes, S., Gillet, B., Kleerebezem, M., van Hijum, S. A. and Leulier, F., “Nomadic lifestyle of *Lactobacillus plantarum* revealed by comparative genomics of 54 strains isolated from different habitats”, *Environmental microbiology*, 18(12), 4974-4989, (2016).
- Mccue, P., Kwon, Y. I. and Shetty, K., “Anti-amylase, antiglucosidase and anti-angiotensin I-converting enzyme potential of selected foods”, *Journal of Food Biochemistry*, 29(3), 278–294, (2005).
- Mende, S., Rohm, H. and Jaros, D., “Influence of exopolysaccharides on the structure, texture, stability and sensory properties of yoghurt and related products”, *International Dairy Journal*, 52, 57–71, (2016).
- Melov, S., Ravenscroft, J., Malik, S., Gill, M. S., Walker, D. W., Clayton, P. E., Wallace D. C., Malfroy, B., Doctrow, S. R. and Lithgow G. J., “Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics”, *Science*, 289, 1567–1569, (2000).
- Milardovic, S., Ivekovic, D. S. and Grabaric, B., “A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical”, *Bioelectrochemistry*, 175–180, (2006).

- Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R. M. and Remaud Simeon, M., “Homopolysaccharides from lactic acid bacteria”, *International Dairy Journal*, 11, 675–685, (2001).
- Mozzi, F., Vaningelgem, F., Hebert, E. M., Van der Meulen, R., Moreno, M. R. F., Font de Valdez, G. and De Vuyst, L., “Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers”, *Applied And Environmental Microbiology*, 72(6), 4431–4435, (2006).
- Nikolic, M., López, P., Strahinic, I., Suárez, A., Kojic, M., Fernández-García, M., Topisirovic, L., Golic, N. and Ruas-Madiedo, P., “Characterisation of the exopolysaccharide (EPS)-producing *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 and its non-EPS producing derivative strains as potential probiotics”, *International Journal of Food Microbiology*, 158, 155–162, (2012).
- Nwodo, U. U., Green, E. and Okoh, A. I., “Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects”, *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 14002–14015, (2012).
- O’Connor, E., Barrett, E., Fitzgerald, G., Hill, C., Stanton, C. and Ross, R., “Production of vitamins, exopolysaccharides and bacteriocins by probiotic bacteria”, *Probiotic Dairy Products*, 167–194, (2005).
- Ogunwande, I. A., Matsui, T., Fujise, T. and Matsumoto, K., “ α -Glucosidase inhibitory profile of Nigerian medicinal plants in immobilized assay system,” *Food Science and Technology Research*, 13(2), 169–172, (2007).
- Oh, N. S., Joung, J. Y., Lee, J. Y. and Kim, Y., “Probiotic and anti-inflammatory potential of *Lactobacillus rhamnosus* 4B15 and *Lactobacillus gasseri* 4M13 isolated from infant feces”, *PLoS ONE*, 13(2), e0192021, (2018).
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A. and Deemer, E. K., “Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3122-3128, (2002).
- Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G. ve Yönden, Z., “Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri”, *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6(3), 331-336, (2015).
- Pan, D. and Mei, X., “Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis subsp. lactis* 12”, *Carbohydrate Polymers*, 80, 908–914, (2010).

- Patel, A. K., Michaud, P., Singhanian, R. R., Soccol, C. R. and Pandey, A., “polysaccharides from probiotics: New developments as food additives”, *Food Technology and Biotechnology*, 48(4), 451-463, (2010).
- Patel, A., Prajapati J. B., Holst, O. and Ljungh, A., “Determining probiotic potential of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from vegetables and traditional indian fermented food products”, *Food Bioscience*, 5, 27-33, (2014).
- Patel, S., Majumder, A. and Goyal, A., “Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria”, *Indian Journal of Microbiology*, 52(1), 3–12, (2012).
- Patten, D. A., Leivers, S., Chadha, M. J., Maqsood, M., Humphreys, P. N., Laws, A. P. and Collett, A., “The structure and immunomodulatory activity on intestinal epithelial cells of the EPSs isolated from *Lactobacillus helveticus* sp. Rosyjski and *Lactobacillus acidophilus* sp. 5e2”, *Carbohydrate Research*, 384, 119–127, (2014).
- Pavlopoulou, A., Spandidos D. A. and Michalopoulos, I., “Human cancer databases (review)”, *Oncol Reports*, 33(1), 3-18, (2015).
- Peng, X., Xiong, Y. and Kong, B., “Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance”, *Food Chemistry*, 113, 196-201, (2009).
- Pereira D. I. A. and Gibson, G. R., “Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans”, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 37(4), 259–281, (2002).
- Pham, P. L., Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G. and Cerning, J., “Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation”, *Applied And Environmental Microbiology*, 66(6), 2302–2310, (2000).
- Ramchandran, L. and Shah, N. P., “Effect of exopolysaccharides and inulin on the proteolytic, angiotensin-I-converting enzyme-and a-glucosidaseinhibitory activities as well as on textural and rheological properties of lowfat yogurt during refrigerated storage”, *Dairy Science and Technology*, 89, 583-600, (2009).
- Riaz Rajoka, M. S., Jin, M., Haobin, Z., Li, Q., Shao, D., Jiang, C., Huang, Q., Yang, H., Shi, J. and Hussain, N., “Functional characterization and biotechnological potential of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from human breast milk”, *LWT– Food Science and Technology*, (2017).

- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J. and Zoon, P., “An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria”, *International Dairy Journal*, 12, 163-171, (2002).
- Ruas-Madiedo, P., Salazar, N. and Clara, G., “Biosynthesis and chemical composition of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria”, *See Ullrich*, 279-310, (2009).
- Rehm, B. H., “Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications”, *Nature Reviews Microbiology*, 8, 578–592, (2010).
- Remus, D. M., van Kranenburg, R., van, S., II, Taverne, N., Bongers, R. S., Wels, M., Wells, J. M., Bron, P. A. and Kleerebezem, M., “Impact of 4 *Lactobacillus plantarum* capsular polysaccharide clusters on surface glycan composition and host cell signaling”, *Microbial Cell Factories*, 11, 149, (2012).
- Ryan, P. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Caplice, N. M. and Stanton, C., “Sugar-coated: Exopolysaccharide producing lactic acid bacteria for food and human health applications”, *Food and Function*, 6(3), 679-693, (2014).
- Saad N., Delattre C., Urdaci M., Schmitter J. M. and Bressollier, P., “An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field”, *LWT-Food Science Technology*, 50, 1-16, (2013).
- Salazar, N., Ruas-Madiedo, P., Kolida, S., Collins, M., Rastall, R., Gibson, G., de los Reyes-Gavilan, C. G., “Exopolysaccharides produced by *Bifidobacterium longum* IPLA E44 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IPLA R1 modify the composition and metabolic activity of human faecal microbiota in pH-controlled batch cultures”, *International Journal of Food Microbiology*, 135, 260-267, (2009).
- Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, and Wright, A., “Lactic acid bacteria, microbial and functional aspects”, *Food Science and Technology*, 3, 1-53, (2004).
- Sasikumar, K., Vaikkath, D. K., Devendra, L. and Nampoothiri, K. M., “An exopolysaccharide (EPS) from a *Lactobacillus plantarum* BR2 with potential benefits for making functional foods”, *Bioresource Technology*, 241, 1152–1156, (2017).
- Sauer, M., Russmayer, H., Grabherr, R., Peterbauer, C. K. and Marx, H., “The efficient clade: Lactic acid bacteria for industrial chemical production: a review”, *Trends in Biotechnology*, 35(8), 756-769, (2017).

- Settanni, L. and Corsetti, A., “Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation”, *International Journal of Microbiology*, 121(2), 123-138, (2008).
- Seo, B. J., Bajpai, V. K., Rather, I. A. and Park, Y. H., “Partially purified exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* YML009 with total phenolic content, antioxidant and free radical scavenging efficacy”, *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 4(49), (2015).
- Sevim, D., “Antioksidanlar ve Zeytinyağı”, *Zeytin Bilimi Dergisi*, 1(1), 43-47, (2011).
- Siezen, R. J., Tzeneva, V. A., Castioni, A., Wels, M., Phan, H. T., Rademaker, J. L., Starrenburg, M. J., Kleerebezem, M., Molenaar, D. and Van Hylckama Vlieg, J. E., “Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various environmental niches”, *Environmental Microbiology*, 3, 758-773, (2010).
- Sutherland I. W., “Microbial polysaccharides from gram negative bacteria”, *International Dairy Journal*, 11, 663–674, (2001).
- Sutherland, I. W., “Bacterial exopolysaccharides”, (ed: J. P. Kamerling) *Comprehensive Glycoscience*, Oxford: Elsevier, 521–57, (2007).
- Stiles M. E. ve Holzapfel W. H., “Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy”, *International Journal of Food Microbiology*, 36, 1–29, (1997).
- Soh, H. S., Kim, C. S. and Lee, S. P., “A new *in vitro* assay of cholesterol adsorption by food and microbial polysaccharides”, *Journal of Medicinal Food*, 6(3), 225-230, (2003).
- Tangüler H. ve Erten H., “Gıdalarda bulunan bir laktik asit bakterisi: *Weissella*”, *Türkiye 9.Gıda Kongresi*, Bolu, (2006)
- Tannock, G. W., “A special fondness for *Lactobacilli*”, *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3189-3194, (2004).
- Tsai, C.C., Lin, P. P., Hsieh, Y. M., Zhang, Z. Y., Wu, H. C. and Huang, C. C., “Cholesterol-lowering potentials of lactic acid bacteria based on bile-salt hydrolase activity and effect of potent strains on cholesterol metabolism *in vitro* and *in vivo*”, *The Scientific World Journal*, 10, (2014).
- Tsuda H. and Miyamoto T., “Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus plantarum* and the prebiotic activity of the exopolysaccharide”, *Food Science and Technology Research*, 16 (1), 87 – 92, (2010).

Uchida, M., Ishii, I., Inoue, C., Akisato, Y., Watanabe, K., Hosoyama, S., Toida, T., Ariyoshi, N. and Kitada, M., “Kefiran reduces atherosclerosis in rabbits fed a high cholesterol diet”, *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 17(9), 980-988, (2010).

Valentao, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P. B., Scabra, R. M. and Bastos, M. L. “Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4989–4993, (2002).

Vinderola, G., Perdigón, G., Duarte, J., Farnworth, E. and Matar, C., “Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* on the gut mucosal immunity”, *Cytokine*, 36, 254-260, (2006).

Walter, J., Schwab, C., Loach, D. M., Ganzle, M. G. and Tannock, G.W., “Glucosyltransferase A (GtfA) and inulosucrase (Inu) of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 contribute to cell aggregation, biofilm formation, and colonization of the mouse gastrointestinal tract”, *Microbiology*, 154, 72-80, (2008).

Wang, T., Jonsdottir, R. and Olafsdottir, G., “Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds”, *Food Chemistry*, 116, 240–248, (2009).

Wang, C. L., Huang, T. H., Liang, T. W., Fang, C. Y. and Wang, S. L., “Production and characterization of exopolysaccharides and antioxidant from *Paenibacillus* sp. TKU023”, *New Biotechnology*, 28(6), 559-565, (2011).

Wang, J., Zhang, H., Chen, X., Chen, Y., Menghebilige, and Bao, Q. “Selection of potential probiotic lactobacilli for cholesterol-lowering properties and their effect on cholesterol metabolism in rats fed a high-lipid diet”, *Journal of Dairy Science*, 95(4), 1645-1654, (2012).

Wang, K., Li, W., Rui, X., Chen, X., Jiang, M. and Dong, M., “Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 63, 133– 139, (2014).

Wang, Y., Guo, Y., Chen, H., Wei, H. and Wan, C., “Potential of *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 and *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 in relieving colitis by gut microbiota, immune and anti-oxidative stress”, *Canadian Journal of Microbiology*, 1-36, (2018).

Wang, X., Shao, C., Liu, L., Guo, X., Xu, Y. and Lu, X., “Optimization, partial characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide from

Lactobacillus plantarum KX041”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 1173-1184, (2017).

Welman, A. D. and Maddox, I. S., “Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges”, *Trends in Biotechnology*, 21, 269-274, (2003).

Welman A. D., “Exploitation of exopolysaccharides from lactic acid bacteria: nutritional and functional benefits”, *See Ullrich*, 331–343, (2009).

WHO/FAO, “Probiotics in foods. health and nutritional properties and guidelines for evaluation”, *FAO Food and Nutrition Paper*, 85, (2006).

WHO, “Cardiovascular diseases (CVDs)”, [http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)), (2017).

Wu, M. H., Pan, T. M., Wu, Y. J., Chang, S. J., Chang, M. S. and Hu, C. Y., “Exopolysaccharide activities from probiotic bifidobacterium: Immunomodulatory effects (on J774A.1 macrophages) and antimicrobial properties”, *International Journal of Food Microbiology*, 144, 104–110, (2010).

Xing, J., Wang, G., Zhang, Q., Liu, X., Gu, Z., Zhang, H., Chen, Y. Q. and Chen, W., “Determining antioxidant activities of lactobacilli cell-free supernatants by cellular antioxidant assay: a comparison with traditional methods”, *PLoS ONE*, 10(3), (2015).

Xu, R., Shang, N. and Li, P., “*In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of exopolysaccharide fractions from *Bifidobacterium animalis* RH”, *Anaerobe*, 17, 226-231, (2011^a).

Xu, R., Shen, Q., Ding, X. L., Gao, W. G. and Li, P. L., “Chemical characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide fraction isolated from *Bifidobacterium animalis* RH”, *European Food Research and Technology*, 232, 231-241, (2011^b).

Yang, Z., Li, S., Zhang, X., Zeng, X., Li, D., Zhao, Y. and Zhang, J., “Capsular and slime-polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* JAAS8 isolated from Chinese sauerkraut: Potential application in fermented milk products”, *Journal of Bio-science and Bioengineering*, 110, 53–57, (2010).

Yasuda, E., Serata, M. and Sako, T., “Suppressive effect on activation of macrophages by *Lactobacillus casei* strain Shirota genes determining the synthesis of cell wall-associated polysaccharides”, *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 4746-4755, (2008).

Ye, S., Liu, F., Wang, J., Wang, H. and Zhang, M., “Antioxidant activities of an exopolysaccharide isolated and purified from marine *Pseudomonas* PF-6”, *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 764–770, (2012).

Yılmaz-Ersan, L., Özcan, T., Akpınar-Bayizit, A. ve Delikanlı B., “Bifidojenik faktör olarak laktoz türevlerinin önemi”, *U. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 30(2), 79-90, (2016).

Zannini, E., Waters, D. M., Coffey, A. and Arendt, E. K., “Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria derived exopolysaccharides”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 1121–1135, (2016).

Zeidan, A. A., Kuzina Poulsen, V., Janzen, T., Buldo, P., Derkx, P. M. F., Qregaard, G. and Neves, A. R., “Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications: a review”, *FEMS Microbiology Reviews*, 1-33, (2017).

Zehir, D., “Tarhanadan izole edilen bazı laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritlerin karakterizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Denizli, (2017).

Zhang, L., Liu, C., Li, D., Zhao, Y., Zhang, X., Zeng, X., Yang, Z. and Li, S., “Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 54, 270–275, (2013).

Zhang, Z., Liu, Z., Tao, X. And Wei, H., “Characterization and sulfated modification of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 and its biological activities” *Carbohydrate Polymers*, 153, 25–33, (2016).

Zhao, Q., Xie, B., Yanc, J., Zhao, F., Xiaoa, J., Yao, L., Zhao, B. and Huang, Y., “*In vitro* antioxidant and antitumor activities of polysaccharides extracted from *Asparagus officinalis*”, *Carbohydrate Polymers*, 87, 392–396, (2012).

6. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Tülin Yılmaz

Doğum Yeri ve Tarihi : Gaziantep - 02.08.1991

Lisans Üniversite : Pamukkale Üniversitesi

Elektronik posta : ylmzttulin@gmail.com

İletişim Adresi : Mehmetçik mah. 2584 sok. no:27 kat:2, Denizli

Yayın Listesi :

- Taşdelen, E., **Yılmaz, T.**, Şimşek, Ö. ve Özkal, S.G., “The Effect of Exopolysaccharide Producer *Leuconostoc mesenteroides* PFC66 on the Quality Characteristics of Tarhana” The 4th International Symposium on Traditional Foods from Adriatic to Caucasus, 19-21 April, Kyrenia, Northern Cyprus, (2018).
- Şimşek, Ö ve **Yılmaz, T.**, “An exopolysaccharide having versatile health benefits produced by *Lactobacillus plantarum* PFC313” 7th International Symposium on Sourdough, 6-8 June, Cork, Ireland, (2018).
- Kaya, H.İ., Demiray, E., **Yılmaz, T.** ve Taşdelen, E. “The Modeling of the Effect of Different Drying Methods and Pretreatment on the Antimicrobial Activity of Cauliflower” International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies, 15-17 May, Cappadocia, Turkey, (2017).
- **Yılmaz, T.**, Şeker, A., Arısoy S. ve Aytekin Ö., “Bitkisel Gıda Kaynaklı Bazı Biyoaktif Bileşiklerin Kanser Hücreleri Üzerine Etkisi” Gıda, Metabolizma & Sağlık: Biyoaktif Bileşenler ve Doğal Katkıları Kongresi, 28 Kasım, İstanbul, (2016)

- Şeker, A., **Yılmaz, T.**, Arısoy S. ve Aytekin Ö., “Kefirin Antikanserojenik Aktivitesi” Gıda, Metabolizma & Sağlık: Biyoaktif Bileşenler ve Doğal Katkılar Kongresi, 28 Kasım, İstanbul, (2016)