



T.C.
KIRŞEHİR AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İLERİ TEKNOLOJİLER ANABİLİM DALI

**VAJİNAL KAYNAKLI *LACTOBACILLUS SPP.*
ŞUŞLARINDAN ELDE EDİLEN
EKZAPOLİSAKKARİTLERİN ANTİBİYOFİLM
VE ANTİ-QUARUM SENSİNG
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

NADİA MASSER RAHEEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KIRŞEHİR / 2022



T.C.
KIRŞEHİR AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İLERİ TEKNOLOJİLER ANABİLİM DALI

**VAJİNAL KAYNAKLI *LACTOBACILLUS* SPP.
ŞUŞLARINDAN ELDE EDİLEN
EKZAPOLİSAKKARİTLERİN ANTİBİYOFİLM
VE ANTİ-QUARUM SENSİNG
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

NADİA MASSER RAHEEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Esin KIRAY

KIRŞEHİR / 2022

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek yazıldığını tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Nadia Maseer RAHEEL



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.



ÖNSÖZ

Yüksek Lisansa başlamamda ve yüksek lisans ders sürecinde kendisini tanıdığım günden bu yana gösterdiği sakin ve sabırlı hali ile her zaman bana örnek olmasının yanı sıra bir bilim adamının nasıl çalışması gerektiğini kendisinden öğrendiğim değerli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Esin Kıray'a büyük bir içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

Nadia Maseer RAHEEL



İÇİNDEKLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
TABLolar DİZİSİ.	iv
ŞEKİLLER DİZİSİ	v
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	
2.1. <i>Lactobacillus</i> 'lar ve Probiyotikler.....	3
2.1.1. Probiyotiklerin Özellikleri.....	4
2.1.2. Bağırsak Hastalıklarında Probiyotiklerin Rolü.....	4
2.1.3. Probiyotiklerin Kanser Hücreleri Üzerindeki Etkisi	4
2.1.4. Probiyotiklerin Vajinal Enfeksiyonlar Üzerindeki Etkisi.....	5
2.2. Ekzopolisakkaritler.....	6
2.2.2. Ekzopolisakkaritlerin Yapısı	8
2.2.3. Ekzopolisakkaritlerin Anti-oksidan ve Anti tümör aktiviteleri	10
2.3. Biyofilm Nedir?.....	11
2.3. Biyofilm Oluşumunda Ekzopolisakkaritlerin Rolü	11
2.4. Quorum Sensing	12
3. MATERYAL ve METOD	14
3.1. MATERYAL.....	14
3.1.1. <i>Lactobacillus</i> Bakterilerinin Eldesi	14
3.2. METOD	15
3.2.1. <i>Lactobacillus</i> 'lar dan Ekzopolisakkaritlerin Ekstraksiyonu	15
3.2.2. Saf EPS'lerin Anti-Mikrobiale Aktivitesinin-Tayini.....	15
3.2.3. Toplam EPS Miktarının Belirlenmesi	16
3.2.4. Saf EPS'ler Anti-biyofilm Aktivitesinin Tayini.....	17
3.2.5. Saf EPS'lerinin Anti- quorum sensing Aktivitesinin Tayini.....	17
3.2.6. Saf EPS'lerinin Anti-oksidan Aktivitesinin Belirlenmesi.....	17

3.2.7. Fourier dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi.....	18
3.2.8. EPS'nin Monosakkarit Bileşimi.....	18
3.2.9. Saf EPS'lerinin Anti-kanser Aktivitelerinin Belirlenmesi	19
3.2.9.1. MDA-MB-231 Meme kanser Hücre Hattı ve gelişim koşulları	19
3.2.9.2. Saf EPS'lerin XTT (Hücre proliferasyon kiti) Testi	19
4. BULGULAR	21
4.1. <i>Lactobacillus</i> 'lardan Ekzopolisakkaritlerin Saf Ekstraksiyonu	21
4.2. Saf EPS'lerin Mikrobiyal Aktivite Sonuçları.....	22
4.3. Saf EPS'lerin Anti-Biyofilm Aktivite Sonuçları.....	23
4.4. Saf EPS'lerinin Anti-quorum sensing Aktivitesinin tayini	24
4.5. Saf EPS'lerinin Anti-oksidan kapasitesi	26
4.6. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi	29
4.7. GC-MS Analiz sonuçları	29
4.8. <i>Lactobacillus</i> suşlarından elde edilen EPS'lerin MDA-MB-231 Meme kanseri Hücre Hattı üzerindeki Antiproliferatif Etkisi	34
5. TARTIŞMA.....	36
6. SONUÇLAR.....	39
7. KAYNAKLAR.....	40
8. EKLER	47
9. ÖZGEÇMİŞ	49

TABLolar DİZİSİ

Sayfa No

Tablo 2.1. Ticari uygulamalarda kullanılabilen probiyotik adayların seçimi...	4
Tablo 2.2. Ekzopolisakkarit üreten bazı mikroorganizmalar	8
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan bakteri kültürleri, gelişme ortamları ve uygun gelişim sıcaklıkları.....	14
Tablo 4.1. <i>Lactobacillus spp.</i> suşlarından elde edilen EPS'lerin 485 nm dalga boyunda verdiği adsorbans değerleri	21
Tablo 4.2. Vajinal <i>Lactobacillus spp.</i> suşlarından elde edilen EPS'lerin Anti-Mikrobiyal Aktiviteleri	22
Tablo 4.3. Vajinal kökenli <i>Lactobacillus</i> suşlarından elde edilen EPS'lerin Anti-quorum sensing aktivitelerini belirleyen inhibisyon zon (cm).....	25
Tablo 4.4. Vajinal <i>Lactobacillus</i> suşlarından elde edilen EPS'lerin MDA-MB-231 Meme kanseri hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkilerini gösteren LD50 değerleri.....	30

Şekil 2.2. Ekzopolisakkarit yapısı	10
Şekil 3.1. 96 kuyucuklu plak üzerinde XTT hücre proliferasyon kitinin şematik görünümü.....	20
Şekil 4.1.Saf olarak elde edilen EPS'lerin tüpteki görünümü.....	22
Şekil 4.2. Vajinal <i>Lactobacillus</i> spp. suşlarından elde edilen EPS'lerin antimikrobiyal aktivitelerinin görüntüsü.	23
Şekil 4.3. Saf EPS'lerin 96 oyuklu mikrotitre plaklarındaki anti-biyofilm-görüntüleri.....	24
Şekil 4.4. Vajinal kökenli <i>Lactobacillus</i> suşlarından elde edilen EPS'lerin anti-quorum sensing aktivitelerini belirleyen inhibisyonu zon çaplarının-görüntüsü.....	24
Şekil 4.5. <i>L. paracasei</i> ve <i>L. plantarum</i> suşlarının anti oksidan-aktivitesi.....	25
Şekil 4.6. <i>L. paracasei</i> L1 suşunda ait EPS'lerin FT-IRanalizi.....	26
Şekil 4.7. <i>L. casei</i> L2 suşunda ait EPS'lerin FT-IRanalizi.....	26
Şekil 4.8. <i>L. plantarum</i> L4 suşunda ait EPS'lerin FT-IRanalizi	27
Şekil 4.9. <i>L.crispatus</i> L5 suşunda ait EPS'lerin FT-IRanalizi	28
Şekil 4.10. <i>L. rhamnosus</i> L17 suşunda ait EPS'lerin FT-IRanalizi.....	28
Şekil 4.11. <i>L. paracasei</i> L1 suşuna ait EPS'lerin GC-M Analiz.....	29
Şekil 4.12. Agar kuyu plaklarda <i>L. paracasei</i> L1 suşuna ait EPS'lerin MDA-MB-231 Meme kanseri hücre hattı XTT kiti sonuçları.....	31
Şekil 4.13. <i>L. paracasei</i> L1 suşundan elde edilen EPS'lerin MDA-MB-321 meme kanseri hücre hattı.....	32
Şekil 4.14. <i>L. casei</i> L2 L1 suşundan elde edilen EPS'lerin MDA-MB-321 meme kanseri hücre hattı.....	32
Şekil 4.15. <i>L. plantarum</i> L4 suşunda elde edilen EPS'lerin MDA-MB-321 meme kanseri hücre hattı.....	33
Şekil 4.16. <i>L. crispatus</i> L5 suşunda elde edilen EPS'lerin MDA-MB-321 meme kanseri hücre hattı.....	33

Şekil 4.17. <i>L. rhamnosus</i> L17 suşunda elde edilen EPS'lerin MDA-MB-321 meme kanseri hücre hattı.	34
Şekil 4.18. Quanta FEG-250 SEM Cihazının görüntüsü.....	34
Şeki 4.19. <i>L. paracasei</i> L1 suşuna ait EPS'lerin Elektron Mikroskop görüntüleri (5000x,10000x,40000x,80000).....	35



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

KISALTMALAR	AÇIKLAMA
BGC823	Mide Kanseri
BV	Bakteriyal Vajinosis
CaCO ₂	Kolon Hücre Kanseri
DPPH	2,2-diphenyl 1-picryl hydrazyl
EPS	Ekzopolisakkarit
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
HePG-2	Karaciğer Hücre Kanseri
HT29	Bağırsak hücre kanseri
LAB	Laktik Asit Bakterileri
LD	Ölödücü konsantrasyon
MDA-MB231	Meme Kanseri Proliferasyon
OD	Optik Yoğunluk
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz
PH	Asitlik Bazlık
RPM	Dakikada Devir Sayısı
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
TCA	Trikloroasitik Asit
XTT	Hücre Proliferasyon Kiti
°C	Santigrat Derece
ML	Mililitre
Mg	Mikrogram

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VAJİNAL KAYNAKLI LACTOBACİLLUS ŞUŞLARINDAN ELDE EDİLEN EKZAPOLİSAKKARİTLERİN ANTİBİYOFİLM VE ANTİ-QUARUM SENSİNG AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Nadia MASSER RAHEEL

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

Bilim ve Teknoloji Enstitüsü

Biyo mühendislik ve Genetik Bölümü

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Esin KIRAY

Ekzopolisakkaritler (EPS'ler), doğada bitkiler, mantarlar ve bakterilerde yaygın olarak bulunan biyopolimerler olup antimikrobiyal, anti-biyofilm, antioksidan, antitümör, antiviral ve immünomodülatör aktivitesi nedeniyle insan sağlığına katkıda bulunma potansiyeline sahiptir.

Çalışmamızda daha önce vajinal mikrofloradan izole edilen probiyotik özelliği kanıtlanmış, Laktik asit bakterileri (LAB) arasından güçlü EPS üreten beş suş (*L. paracasei* L1, *L. casei* L2, *L. pantarum* L4, *L. crispatus* L5 ve *L. rhamnosus* L17) seçilmiştir. Suşlardan saf olarak elde edilen EPS'lerin antimikrobiyal, antibiyofilm, anti-quarum sensing, antioksidan aktiviteleri ile MDA-MB-231 meme kanser hücre hattı hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkileri araştırılmıştır. Çalışmamızda ayrıca saf EPS'lerin FT-IR ve GC-MS analizleri yapılmış olup, elektron mikroskop görüntüleri elde edilmiştir.

Çalışma sonucunda LAB kökenli EPS'lerin güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu, patojenik suşlar arasında en güçlü antimikrobiyal etkinliğe sahip suşun *L. casei* L2 suşuna ait EPS olduğu belirlenmiştir. Saf EPS özütlerinin anti-biyofilm

aktivitesini belirlemek amacı ile *E. coli* ve *P. aeruginosa* suşları kullanılmıştır. Çalışma sonucunda EPS'lerin farklı konsantrasyonlarında inhibisyon etkisi gösterdiği ve özellikle L1 ve L2 suşlarından elde edilen EPS'lerin daha güçlü aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Saf EPS'lerin farklı konsantrasyonlardaki anti-quorum sensing aktivitelerinin araştırıldığı çalışmada her bir EPS 10 mg/mL konsantrasyonunda ortalama eşit aktivite gösterirken 20 mg/mL konsantrasyonda etkinin arttığı ve etki oranının değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Saf EPS'lerin MDA-MB-231 meme kanser hücre hattı hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkinin *L. paracasei* L1 suşuna ait EPS'nin 115 µg/ml'lik en yüksek dozunda %90-95 düzeyinde ölüm görülürken, *L. casei* L2 suşuna ait EPS'lerin 85 µg/ml'lik en yüksek dozunda ise yaklaşık %100 oranında ölüm görülmüştür.

İnsan sağlığı üzerinde farklı yararlı etkileri bulunan EPS'lerin doğal antimikrobiyal ve antikanser özelliğine sahip olması dikkat çekicidir. Ancak ileride hem enfeksiyonların hem de çeşitli kanserlerin tedavilerinde kullanılabilmesi için bu alanda daha çok araştırmaya gereksinim vardır.

Anahtar kelimeler: Ekzopolisakkarit, *Lactobacillus*, Anti-biyofilm, Anti-quorum sensing, MDA-MB-231 meme kanser hücre hattı

ABSTRACT

M.Sc. THESIS

DETERMINATION OF ANTI BIOFILM AND ANTI QUORUM SENSING ACTIVITIES OF EXPOLYSACCHARIDES OBTAINED FROM VAGINAL DERIVED LACTOBACILLUS STRAINS

NADIA MASSER RAHEEL

**Kırşehir Ahi Evran University
Institute of Sciences and Technology
Bio engineering and Genetics Department**

Supervisor Dr. Öğr. Üyesi Esin Kiray

Exopolysaccharides (EPSs) are biopolymers commonly found in plants, fungi and bacteria in nature and have the potential to contribute to human health due to their antimicrobial, anti-biofilm, antioxidant, antitumor, antiviral and immunomodulatory activity.

In our study, five strains (*L. paracasei* L1, *L. casei* L2, *L. pantarum* L4, *L. crispatus* L5 and *L. rhamnosus* L17) were selected among the lactic acid bacteria (LAB) with proven probiotic properties that were previously isolated from vaginal microflora. . Antimicrobial, antibiofilm, anti-quorum sensing, antioxidant activities and anti-proliferative effects on MDA-MB-231 breast cancer cell line cells of EPSs obtained from pure strains were investigated. In our study, FT-IR and GC-MS analyzes of pure EPS were also performed and electron microscope images were obtained.

As a result of the study, it was determined that LAB-derived EPSs have strong antimicrobial activity, and the strain with the strongest antimicrobial activity among pathogenic strains was EPS belonging to *L. casei* L2 strain. *E. coli* and *P. aeruginosa* strains were used to determine the anti-biofilm activity of pure EPS extracts. As a result of the study, it is seen that EPSs have an inhibitory effect at different

concentrations, and EPSs obtained from L1 and L2 strains have stronger activity. In the study investigating the anti-quorum sensing activities of pure EPS at different concentrations, it was determined that while each EPS showed an average equal activity at a concentration of 10 mg/mL, the effect increased at a concentration of 20 mg/mL and the rate of effect varied. The anti-proliferative effect of pure EPS on MDA-MB-231 breast cancer cell line cells was observed at the highest dose of 115 µg/ml of EPS of *L. paracasei* L1 strain, while 90-95% mortality was observed in *L. casei* L2 strain. At the highest dose of 85 µg/ml of EPSs, approximately 100% mortality was observed.

It is noteworthy that EPSs, which have different beneficial effects on human health, have natural antimicrobial and anticancer properties. However, more research is needed in this area so that it can be used in the treatment of both infections and various cancers in the future

Keywords: Exopolysaccharide, *Lactobacillus*, Anti-biofilm, Anti-quorum sensing, MDA-MB-231 breast cancer cell line

1. GİRİŞ

İnsan mikrobiyom florası, insan mikrobiyomu projesi tarafından bildirildiği üzere vücut bölgelerine göre bakteri dağılımına dayalı olarak konakçının sağlığına ve bakımına katkıda bulunan binlerce mikrobiyal türe sahiptir. İnsan sağlığı üzerinde yararlı etkileri olan *Lactobacillus* grubu bakteriler hem bağırsak florasında hem de vajinal mikroflorada bol miktarda bulunmaktadır. Probiyotik özelliğe sahip bu mikroorganizmalar üretmiş oldukları çeşitli antimikrobiyal bileşikler ile hem vajinal florayı hem de bağırsak florasını patojenlere karşı korumakta (Kailasapathy ve Chin, 2000), bağışıklık sistemini uyarmakta ve bağırsak mikroflorasının dengesinin korunmasını sağlaması gibi bir çok yararlı etki sağlamaktadır (Ianghendries ve ark., 1995). Bunun yanında çeşitli kanserojen etkiye sahip glukuronidaz, nitroredüktaz, azoredüktaz ve üreaz gibi mikrobiyal enzimlerin miktarını azaltarak ve çeşitli mekanizmalar kullanarak kanser hücreleri üzerinde etki göstermektedir (Kıray ve Kariptaş, 2015).

Ekzopolisakkaritler (EPS'ler), doğada bitkiler, mantarlar ve bakterilerde yaygın olarak bulunan biyopolimerlerdir (Osemwegie ve ark., 2020). Bu polisakkaritler, enerjinin depolanması (nişasta) hücre duvarı mimarisi (selüloz) ve hücreler arası iletişim (glikozaminoglikanlar) gibi çeşitli biyolojik işlevlerde görev alan doğal şekerlerin (pentozlar, heksozlar) veya anyonik şekerlerin (heksoslar) homopolimerleri veya heteropolimerleridir (Cerning ve ark., 1990); Cerning ve ark., 1995).

EPS'ler, zorlu çevre koşullarıyla başa çıkmak için Laktik asit bakterileri (LAB) dahil olmak üzere mikroorganizmalar tarafından salgılanan biyolojik polimerlerdir. EPS'ler, mikroorganizmaları sıcaklık, pH, antibiyotikler, konak immün savunmaları vb. gibi olumsuz faktörlerden korumak için hücre dışı biyofilm matrisinin oluşumunda yer alan ana bileşenlerden biridir (Nguyen ve ark., 2020).

LAB' den elde edilen EPS'ler ayrıca insan sağlığı üzerinde oldukça yararlı etkiye sahiptir. EPS'lerin antioksidan, antitümör, antiviral antiülser, immünomodülatör veya kolesterol düşürücü aktivitesi nedeniyle insan sağlığına katkıda bulunma potansiyeline sahiptir (Ruas ve ark, 2002; Dilna ve ark, 2015).

Günümüzde araştırmacılar, son tedavi stratejileri ile oluşan ciddi yan etkiler ve çoklu ilaç direnci nedeniyle yeni antibiyotik ve antitümör ilaç arayışlarına devam

etmektedirler. Bu bağlamda modern tıp, insan sağlığı üzerinde zararlı etkilere sebep olmasından dolayı sentetik olarak üretilen ilaçlar yerine doğal ilaçları daha çok tercih etmektedir (Abdelnasser ve ark., 2017). Bu nedenle biz de çalışmamızda daha önce probiyotik özelliği kanıtlanmış *Lactobacillus* suşlarından elde edilen EPS'lerin çeşitli biyolojik aktiviteleri ile antibiyofilm ve anti-quorum sensing aktiviteleri araştırılmıştır.



2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *Lactobacillus*'lar ve Probiyotikler

Lactobacillus cinsi bakteriler genellikle düz ya da hafif kıvrık, çubuk (basil) şekilli bir morfolojiye sahiptir. Kokobasil türleride mevcuttur. Hücreleri tek tek ya da zincir şeklinde bulunur. Gram-pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmeyen genellikle hareketsiz, anaerobik, mikroaerofilik ya da fakültatif anaerobik mikroorganizmalardır (Yılmaz ve Temiz, 2003). LAB grubundan olan bu mikroorganizmalar fermentasyon sonucu laktik asit ürettikleri için ortamın pH'sını 3.2-3.5'e kadar düşürebilirler. Bu nedenle de aside dayanıklı mikroorganizmalardır (Kiray, 2017).

Probiyotikler, yeterli miktarda tüketildiğinde konakçıya temel beslenmenin ötesinde bir sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanır. En yaygın olanları *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* adlı gruplara ait bakterilerdir. Mikroorganizmalar, biyoaktif metabolitlerin üretimi yoluyla gıdalara sağlığı geliştirici özellikler kazandırabilir (Stanton ve ark., 2005). Gerçek probiyotik tercihen insan kaynaklı olmalı, güvenli ve antibiyotiğe direnç aktarabilen vektörlerden arındırılmış olmalıdır. Bağırsak koşullarında (asidik ph, enzimler, safra tuzu vb.) hayatta kalma kapasitesi yüksek olmalı, patojen mikroorganizmalara karşı koruyucu rol oynamalı ve bağışıklık sistemi üzerinde yararlı etkilere sahip olmalıdır (Plaza-Diaz ve ark., 2017 ve 2018). Probiyotiklerin özellikle zorlu mide ve bağırsak şartlarını geçerek etki alanında uzun süre canlı kalabilmelidir. Ancak yapılan bazı çalışmalarda, canlı olmayan probiyotiklerin doku kültürü hücrelerine yapışabildiğini bildirmiştir, bu da canlılığın adezyon için gerekli olmadığını göstermektedir (Hood ve Zottola, 1988; Coconier ve ark., 1993).

2.1.1. Probiyotiklerin Özellikleri

Tablo 2.1. Ticari uygulamalarda kullanılacak probiyotik adayların seçim kriterleri (Kiray, 2017).

Güvenlik Kriterleri	<ul style="list-style-type: none">•İnsan orjinli olmalı•Patojenik ve toksijenik olmamalı•Antibiyotiklere karşı dirençli olmalı
Teknolojik kriterler	<ul style="list-style-type: none">•Genetik olarak stabil olmalı•Fajlara karşı dirençli olmalı•İşleme ve depolama süresince canlılığını koruyabilmeli•Büyük ölçekli üretimleri sağlanabilmeli
Fonksiyonel kriterler	<ul style="list-style-type: none">•Mide asidi safra ve pankreatik enzimlere karşı dirençli olmalı•Mukozal yüzeylere bağlanabilmeli•Epitel dokulara tutunabilmeli
İstenilen fizyolojik özellikler	<ul style="list-style-type: none">•İmmün cevabı stimüle edebilmeli•Patojenik mikroorganizmalara karşı antagonistik aktivite gösterebilmeli•Antimikrobiyel bileşikler üretebilmeli•Kolesterol asimilasyonu sağlayabilmeli•Laktozu metabolize edebilmeli•Antimutajenik ve antikarsinojenik olmalı•Metabolik aktiviteyi olumlu etkilemeli

2.1.2 Bağırsak Hastalıklarında Probiyotiklerin Rolü

Probiyotikler yararlı etkilerini sitokinler ve bütirik asit gibi antibakteriyel ve antimikrobiyal bileşikler üreterek patojene karşı antagonist etkilerini çeşitli mekanizmalar ile gösterirler (Kailasapathy ve Chin, 2000). Bağırsak florasını patojen mikroorganizmalara karşı koruyarak doğuştan gelen bağışıklığı uyarabilmekte bağışıklık sistemini desteklemektedirler. Ayrıca laktik asit üreten mikroflorayı uyararak bağırsak pH' ını azaltmakta ve bağırsak mikroflorasının dengesinin korunmasını olumlu şekilde ayarlamaktadır (Langhendries ve ark., 1995).

2.1.3. Probiyotiklerin Kanser Hücreleri Üzerindeki etkisi

İnsan kanser hücre dizilerini üzerinde yapılan araştırmalar, probiyotiklerin bu hücrelerde anti proliferatif veya proapoptotik aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir. Araştırmalar genellikle kolon kanseri ve mide kanseri üzerine yoğunlaşmıştır. Lee ve ark., 2004 yılında *L. acidophilus*, *L. casei* ve *B. longum*'un önemli antitümör aktiviteleri gösterdiğini belirtmişlerdir (Lee ve ark., 2004). Son çalışmalar, mikrobiyotanın çeşitli kanser türlerinin gelişiminde önemli bir rol oynadığını ve çeşitli kanserojen mekanizmalara karıştığını düşündürmektedir (Curty ve ark., 2020; Bhatt ve ark., 2017). Buna göre, meme kanseri ile mikrobiyota bileşimi ilişkilendirilmiştir ve meme kanserli kadınlar ile sağlıklı bireyler arasında farklılıklar gösteren bir meme mikrobiyomu bildirilmiştir (Garrett, 2015). Bazı EPS'lerin farklı tümör hücreleri üzerindeki etkilerini inceleyen daha fazla araştırma, EPS'lerin farklı tümör hücreleri üzerinde farklı derecelerde sitotoksik aktiviteleri sahip olduğunu doğrulamaktadır (Ayyash ve ark; 2020). Probiyotik *Lactobacillus* spp, lösemi ve kolon kanseri hücre hattı üzerinde seçici sitotoksik, proapoptotik etkilerin yanı sıra moleküler düzeyde makrofaj hücreleri üzerinde anti inflamatuvar etki yarattı (Shyu ve ark 2014).

2.1.4. Probiyotiklerin Vajinal Enfeksiyonlar Üzerindeki Etkisi

Yaklaşık 50 türden oluşan karmaşık vajinal mikroflora, sağlığın korunmasında ve vajinal enfeksiyonların önlenmesinde önemli bir rol oynar. Sağlıklı premenopozal kadınlarda yaygın olarak görülen *Lactobacillus* grubu, bakteriler patojenik bakterilerin büyümesini azaltarak etkili bir koruma işlevi sağlarlar (Pascual ve ark., 2008; Mahdi ve ark., 2012).

Ürogenital enfeksiyonlar; dünya çapında her yıl yaklaşık olarak bir milyon kadını etkilemektedir (Reid ve ark., 2004). Sağlıklı bir ürogenital sistemin homeostazisini sağlayan konakçı bağışıklık sistemi ile genital sistem mikrobiyotası arasında dengeli bir ilişki vardır. Kadınlarda görülen ürogenital enfeksiyonlar vajinal florada bol miktarda bulunan *Lactobacillus*'ların sayıca azalması ve doğal vajinal mikroflorada değişikliğe sebep olan farklı mikroorganizmaların yerleşmesi sonucu görülmektedir (Kiray, 2017).

Sağlıklı kadınların vajinal mikroflorasında bulunan *Lactobacillus*'lar organik asit, hidrojen peroksit, bakteriyosin, üreterek ve/veya daha düşük bir pH ortamı oluşturarak enfeksiyona sebep olan mikroorganizmaların vajinada kolonizasyonunu inhibe etmekte ve koruyucu bir etki sağlamaktadır (Kiray, 2017). Vajinal probiyotikler, üroepitel hücrelerine yapışma ve patojenik büyüme ve biyoyüzey aktif madde salgılanması inhibitörleri üretme kaliteleri nedeniyle antibiyotik tedavisine iyi bir alternatif olarak da görülmektedir (Iannitti ve Palmieri, 2010).

Vajinal floranın bozulması, laktobasil sayısındaki azalma ya da laktobasil olmayan mikrobiyal popülasyonun artması ile karakterizedir. Vajinal floranın bozulması ile ilişkili klinik durumlardan olan bakteriyel vajinozis (BV); vajinal mikrobiyomun en iyi tanımlanmış ve en yaygın vajinal disbiyozis olarak değerlendirilmektedir. Sağlıklı bir vajinal florada *Lactobacillus* türlerinden çoğunlukla *L. crispatus* ve *L. jensenii* en baskın görülen türlerdir. Ancak BV'nin olduğu bir ortamda *Gardnerella vaginalis* gibi anaerob ve fakültatif anaeroblarla heterojen mikrobiyal bir flora ortamı oluşmaktadır.

BV tedavisinde laktobasil içeren probiyotik suşlarının bulunduğu çeşitli farmasötik formülasyonların kullanıldığı çalışmalarda, laktobasil içeren probiyotikler BV belirtilerini azaltarak, vajinal mikroflora profilini iyileştirmekle birlikte çoğunlukla iyi tolere edilmiştir (Yuvacı ve Cevrioğlu, 2017). BV, probiyotikler kullanılarak vajinal mikrobiyota ortamının yeniden düzenlenmesi ile tedavi edilebilmektedir (López-Moreno ve Aguilera, 2020)

2.2. Ekzopolisakkaritler

Mikrobiyal EPS'ler, pekçok mikroorganizma tarafından salgılanan veya hücre yüzeyine sıkıca bağlanan (kapsüler polisakkarit ya da hücre çevresinde salınan) geniş bir polimer grubu içermektedir (Paulo ve ark., 2012). EPS'ler, zorlu çevre koşullarıyla başa çıkmak için LAB dahil olmak üzere mikroorganizmalar tarafından salgılanan biyolojik polimerlerdir. EPS'ler, mikroorganizmaları sıcaklık, pH, antibiyotikler, konak immün savunmaları vb. gibi olumsuz faktörlerden korumak için hücre dışı biyofilm matrisinin oluşumunda yer alan ana bileşenlerden biridir (Nguyen ve ark., 2020). EPS'lerin antioksidan, antitümör, antiviral antiülser, immünomodülatör veya kolesterol düşürücü aktivitesi nedeniyle insan sağlığına katkıda bulunma potansiyeline sahiptir (Ruas ve ark., 2002; Dilna ve ark., 2015).

İnsanlar tarafından tüketilen gıdaların toprak kuraklığını ve besin değerini arttırmaktadır. Zararsız yerel ve ticari çok yönlülükleri ve biyoteknolojik uygunlukları, küresel araştırma topluluğu tarafından EPS'lere gösterilen son ilginin güvenilir bir teyididir. Bu özellikle biyosentezi, bileşimi, üretimi, yapısı, karakterizasyonu, kaynakları, fonksiyonel özellikleri ve uygulamaları nedeni ile EPS üzerine olan ilgi artmıştır (Osemwegie ve ark., 2020). EPS' ler bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar da farklı kimyasal ve fizyolojik özellikler ile farklı biyolojik aktiviteler gösterir (Chen ve Huang, 2018).

Son zamanlarda, LAB tarafından üretilen EPS, özellikle sağlık üzerindeki yararlı etkileri nedeniyle araştırmalara konu olmuştur. Özellikle EPS üreten LAB veya EPS ile hazırlanan fermente süt ürünlerinin immün stimülasyonu, antimutajenitesi ve antitümör aktivitesi araştırılmaktadır (Harutoshi, 2013). Laktobasillere ait yaklaşık 30 tür EPS üreticisi olarak tanımlanmıştır. Bu türler arasında en iyi bilinenler *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii bulgaricus*, *L. helveticus* ve *L. rhamnosus* şeklindedir.

LAB'de EPS'ler, hücre yüzeyi fizikokimyasal özelliklerini kontrol etmede, bakteri hücrelerini dehidrasyondan, olumsuz çevresel etkilerden, antibiyotiklerden, fagositozdan ve faj saldırılarından korumada önemli bir rol oynar. EPS'ler, hücre zarının gelişimi sırasında hücrelerin kapsüllendiği hücre dışı matrisin yapısal bileşenlerinde yer alır (Nguyen ve ark., 2020).

EPS, dallanmış, tekrarlayan şeker birimleri veya şeker türevlerinden oluşan, şeker birimi başta olmak üzere glikoz, galaktoz ve farklı oranlarda ramnozdan oluşan uzun zincirli polisakkaritlerdir (De Vuyst ve Degeest, 1999). Bu polisakkaritlerin genellikle düşük sitotoksitesi ve yan etkileri vardır, bu da onları kansere ve antioksidanlara karşı immünoterapi için potansiyel adaylar yapmaktadır (Yu ve ark, 2001).

EPS'nin başlıca fizyolojik işlevinin faj saldırısı, toksik metal iyonları ve kuruma gibi çeşitli streslere karşı biyolojik savunma olduğuna inanılmaktadır ve bakterilerin EPS'yi bir enerji kaynağı olarak kullanması pek olası değildir. Bununla birlikte, bazı potansiyel olarak probiyotik LAB suşlarının, diğer LAB suşları tarafından üretilen EPS'yi bozduğu bildirilmiştir (Harutoshi, 2013).

EPS ayrıca karmaşık ekosistemlerdeki diğer organizmalar için substrat görevi görebilir. Bu konuda Salazar ve ark. (2016), bağırsak bifidobakterileri tarafından sentezlenen EPS'nin, insan bağırsağı ortamındaki mikroorganizmalar için fermente edilebilir substratlar olarak hareket edebileceğini, kısa zincirli yağ asitleri profillerinde kaymaları ve bağırsak mikrobiyal popülasyonları arasındaki ilişkilerde değişiklikleri teşvik edebileceğini göstermiştir.

Tablo 2.2. Ekzopolisakkarit üreten bazı mikroorganizmalar

Bakteri	Türler
<i>Lactobacillus</i> türleri	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. cellobiosus</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. sporogenes</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. cerevisiae</i> , <i>P. pentosaceus</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. salivarius</i> , <i>S. cremoris</i> , <i>S. diacetylactis</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. lactis</i> , <i>S. thermophilus</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroide</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i>
<i>Propionibacterium</i>	<i>P. freudenreichii</i> , <i>P. shermanii</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. thermophilum</i>
<i>Bacillus</i>	<i>B. coagulans</i> , <i>B. lentus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. subtilis</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. boulardii</i>
<i>Candida</i>	<i>C. torulopsis</i>

(Göktepe ve ark, 2006; Konings ve ark, 2000)

2.2.2. Ekzopolisakkaritlerin Yapısı

Gram pozitif bakteriler tarafından sentezlenen EPS homopolisakkaritler (HoPS) ve heteropolisakkaritler (HePS) olmak üzere iki bölüme ayrılmıştır. Adından da anlaşılacağı gibi, HoPS, glikoz (glukanlar) veya fruktoz (fruktanlar) olmak üzere tek

bir monosakkarit tipi içerir (Monsan ve ark., 2001). Homo-EPS, bir tür monosakaritten oluşurken, hetero-EPS, hücre içi şeker nükleotit öncülerinden sentezlenen 3-8 farklı karbonhidrat parçasının düzenli tekrar eden birimlerinden oluşmaktadır (Harutoshi, 2013). Homo-EPS ve hetero-EPS'nin biyosentezi farklıdır. Homo-EPS, glukansükraz veya levansükraz kullanılarak sakarozdan yapılı ve hetero-EPS sentezi dört ana adımı içerir: şeker taşıma, şeker nükleotid sentezi, tekrarlanan birim sentezi ve tekrarlanan birimlerin polimerizasyonu (Harutoshi, 2013).

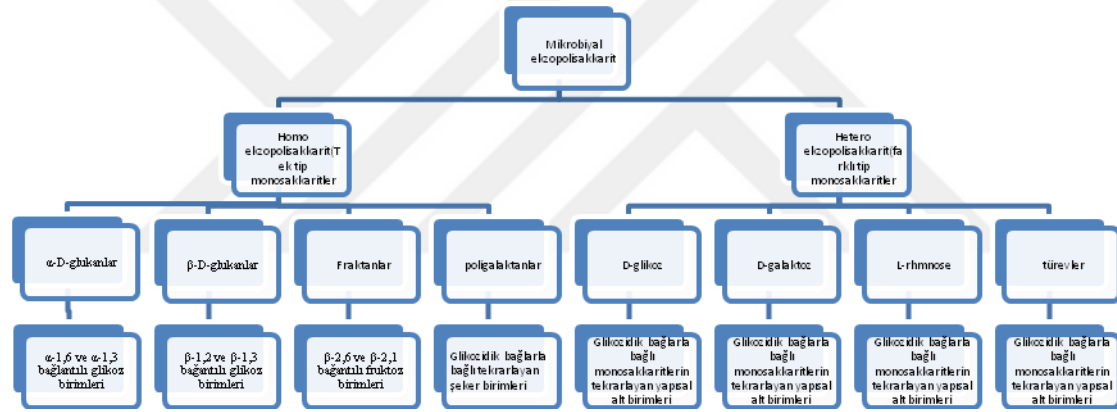
LAB arasında, bağlantı tipine ve bağda yer alan karbonun konumuna bağlı olarak bir alt sınıflandırma oluşturulmuştur: α -glukanlar, β -glukanlar, β -fruktanlar ve inulin tipi: güncel HoPS, LAB türlerinde tanımlanmamış veya saflaştırılmamıştır. α -glukan ve β -fruktan sentezi ile ilgili olarak, glikozil hidrolaz ailesine ait tek tip hücre dışı enzim gereklidir; bunlar, sırasıyla glukanlar ve fruktanlar biyosentezi için glukansükrazlar ve fruktansükrazlar olarak adlandırılır (Salazar ve ark., 2016). Homopolisakkaritler arasındaki farklılıklar, esas olarak ana zincir bağlarının modeli, moleküler ağırlık ve dal yapısı gibi birincil yapılarının özelliklerinden dolayı ortaya çıkar (Harutoshi, 2013).

LAB tarafından üretilen HoPS verimi, gıda endüstrisinde kullanılan diğer bakteriyel EPS'lere kıyasla düşüktür. Genel olarak, LAB'de açıklanan HoPS üretim seviyesi 1 g/L'den yüksektir, birkaç suş 10 g/L'ye kadar değerlere ulaşır (Van Geel-Schutten ve ark., 1999). Bu HoPS'lerin nispeten basit kimyasal bileşimi, bağırsak mikrobiyotası tarafından fermente edilebilir substratlar olarak hareket etme potansiyellerini belirleyen anahtar parametre olabilir. Aslında, bu HoPS'lerin (β -glukanlar) bazıları, inülin ve FOS gibi en çok çalışılan prebiyotiklerinkine benzer bir kimyasal bileşime ve bağlantı tiplerine sahiptir (Salazar ve ark., 2016).

HePS, başta glikoz, galaktoz ve ramnoz olmak üzere farklı monosakkaritler ve daha az ölçüde N-asetillenmiş monosakkaritler (N-asetil-glukozamin ve N-asetil-galaktozamin) içeren tekrarlayan birimler üzerine inşa edilmiş karmaşık polimerlerdir. Diğer monosakaritler, bazı spesifik HePS'nin yanı sıra organik ve inorganik (glukoronik asit, asetil grupları, gliserol, fosfat, vb.) sübstitüentlerde bulunabilir. HePS'nin sentezinde yer alan enzimatik makine, HoPS'ninkinden çok daha karmaşıktır. LAB'de, bu enzimleri kodlayan genler, oldukça işlevsel bir organizasyon

ve operon benzeri bir yapı gösteren eps kümelerinde düzenlenir (Ruas Madiedo ve ark., 2009).

Genel olarak LAB tarafından sentezlenen HoPS ve HePS'nin bağırsak mikrobiyotası tarafından fermente edilebilir substratlar olarak hareket etme kabiliyeti göstermektedir. Her iki EPS tipi de gastrointestinal sindirime dirençli görünmektedir, ancak duyarlılıkları farklıdır ve bağırsak mikrobiyotası tarafından parçalanır. Bu son özellik, bir yandan biyopolimerlerin fizikokimyasal özellikleriyle ve diğer yandan onları parçalayabilen bağırsak mikroorganizmaları tarafından barındırılan hidrolitik enzimler ile doğrudan ilişkili olabilir. Bu şekilde, kolondaki her iki EPS türünün biyolojik olarak parçalanabilirliği, bağırsak mikrobiyota bileşiminden büyük ölçüde etkilenebilir (Salazar ve ark., 2016).



Şekil 2.2. Ekzopolisakkarit Yapısı

2.2.3. Ekzopolisakkaritlerin Anti-oksidan ve Anti-tümör Aktiviteleri

Mikrobiyal polisakkaritlerin başlıca biyoteknolojik avantajlarından biri basit bir şekilde kararlı ve oluşturulmuş emülsiyonlar olan kısa bir fermantasyon sürecine sahip olmasıdır. Bu polisakkaritler genellikle çok az yan etkiye ve sitotoksisiteye sahiptir ve bu da onları immünoterapileri antioksidanlar ve kansere karşı iyi adaylar haline getirmektedir. Reaktif oksijen türlerinin farklı biyolojik süreçlerde detaylandırıldığı kabul edilir ve çok sayıda hastalığın ilerlemesine veya gelişmesine

neden olur. EPS'lerin serbest radikallerin uzaklaştırılmasında rol aldığı ve bu nedenle güçlü bir antioksidan olarak çalıştığı bulunmuştur. EPS'nin *Lactobacillus* bakterilerinden gösterdiği iki önemli biyolojik aktivite, antikanser ve immünomodülatör etkilerdir. (Ismail ve Namboothiri, 2013). Son zamanlardaki kanser tedavilerinde kullanılan ilaç stratejilerinin yan etkilerinin çok fazla olmasından dolayı EPS'nin kanser tedavisi için potansiyel yeni ilaç kaynağı olarak artan ilgi görmesi doğaldır. Bazo yapılan çalışmalarda, *Lactobacillus casei* 01 suşunun EPS, insan kolon kanseri hücresi HT-29 üzerinde, dozaj arttıkça 5'ten 100 µg/ml'e yükselen anti-proliferasyon etkisi uyguladığı belirtilmiştir (Liu ve ark., 2011) ve yüksek sülfatlanmış EPS B100S, hematopoietik tümör T hücre dizilerinde seçici olarak güçlü apoptozu tetiklediği görülmüştür (Ruiz-Ruiz ve ark., 2010).

2.3. Biyofilm Nedir?

Biyofilmler, mikroorganizmaların canlı ya da cansız yüzeylere tutunarak, kendi ürettikleri polimerik madde içerisinde korunaklı bir şekilde kalabilmesini sağlayan yapılardır. Bakteriler hemen hemen her yüzeye yapışarak büyüyebilir ve biyofilm adı verilen mimari açıdan karmaşık topluluklar oluşturabilirler (Branda ve ark., 2005; Theodora, 2019). Bu yapılar mikroorganizmalar için bir nevi kalkan görevi görmektedir. Biyofilm yapısı içerisindeki mikroorganizmalar, konak hücre cevabı, antimikrobiyal tedavi ve olumsuz çevre koşulları gibi etkilerden korunabilmektedir (Theodora, 2019). Biyofilm matrisi antibiyotiğin penetrasyonunu engellemeye yardımcı olacağından biyofilm üreten bakteriler antibiyotiklere karşı daha dirençlidirler. Bu nedenle, biyofilm oluşturan patojenik bakterilerin saldırısını kontrol etmek amacıyla biyofilmi inhibe etme veya yok etme yeteneğine sahip mikroorganizmaların ya da bileşiklerin bulunması gereklidir. (Theodora, 2019; Zhao, 2020).

2.3.1. Biyofilm Oluşumunda Ekzopolisakkaritlerin Rolü

Mikroorganizmalar, hücrede yüksek konsantrasyonda bulunan bir biyofilmde ilişkilidir. Esas olarak EPS'lerden oluşan glikol kaliks, bir biyofilmin sentezlenmesi için gereklidir. EPS'ler, polisakarit zincirleri arasındaki etkileşim yoluyla biyofilmin stabilitesini etkileyebilir (Higgins ve Vovak, 1997). EPS'ler, mikrobiyal floranın, mikroorganizma büyümesi için bir substrat içerebilen biyolojik bir desteğe yapışmasını ve farklı ortamların kolonizasyonunu sağlayan yüzeylere yapışmada da

kilit bir role sahiptir. Yapışma dışında görev yapmaktadır. Biyofilm sentezi bakterilerin fizyokimyasal durumlara adaptasyonunda önemli bir rol oluşturmaktadır. EPS'ler enerji rezervleri olarak görev yapmazlar ve mikroorganizmalar sentezlenen EPS'leri katabolize edemezler (Cerning ve ark., 1994). *Lactobacillus* EPS'lerinin yapısal çeşitliliği, adezyon, stres direnci ve konak savunma sisteminin spesifik reseptörleri ve efektörleri ile etkileşim dahil olan türe özgü özellikler sonucuna varabilir (Kanmani ve ark., 2012). EPS'ler, bakteri hücre bağlanmasını ve kendi kendine toplanmasını engeller (Kim ve ark., 2009). EPS'ler, bakteri hücrelerinin yüzeylerini değiştirerek veya biyofilm oluşumunda yer alan gen ekspresyonunu düzenleyen sinyal molekülleri olarak hareket ederek antimikrobiyal aktiviteye aracılık edebilir (Kim ve ark., 2009; Rendueles ve ark., 2013).

2.4. Quorum Sensing

Quorum Sensing (QS), mikroorganizmaların popülasyon yoğunluğunu algılamasına, kritik bir noktaya ulaştıktan sonra gen ifadesini eşzamanlı olarak kontrol etmesine ve yayılabilir hücre dışı efektör üretme verimliliğini değerlendirmesine izin veren bir mekanizmadır (Zhao, 2020).

Bazı patojenik bakteriler, QS adı verilen bir mekanizma kullanarak biyofilm oluşturur. QS, otoindüktör adı verilen çeşitli hücre dışı sinyal molekülleri tarafından bakteriler arasında bir iletişim şeklidir. Bakteriler, bu sinyal moleküllerini kullanarak, virülans faktörlerinin ekspresyonunu, ikincil metabolit üretimini, biyofilm gelişimini ve popülasyon yoğunluğuna bağlı olarak konakçı ve diğer mikroplarla iletişimi topluca düzenler (Barzegari, 2020). QS süreci sırasında, sinyal molekülleri yeni bakteri reseptörlerine bağlanır ve tek bir bakteri türü içinde ve türler arası iletişimi sağlayan farklı bakteri türleri arasında genlerin transkripsiyonuna yol açar (Krzyżek, 2019). Bunun yanı sıra virülans faktörleri, dezenfektan toleransı, spor oluşumu, toksin üretimi, hareketliliğin düzenlenmesini gibi hücresel süreçlerde de etkilidir (Hawver, 2016; Zhao, 2020). QSI biyofilm oluşumunu engellediğinden ve biyofilm durumunda bakteriyel virülansı azalttığından, patojenlerin biyofilm oluşumunu inhibe etmek ve bakteriyel enfeksiyonu kontrol etmek için iyi bir hedef sağlamak için ideal bir araç olarak kabul edilirler (Liu, 2017).

Son zamanlarda yapılan bazı araştırmalarda, QS sisteminin bakteri direnci ile ilişkili olabileceğini göstermektedir (Jiang, 2019). Bu nedenle, bakteriyel QS'nin inhibe

edilmesi, yalnızca bakteriyel direncin gelişmesini engelleyemeyen, aynı zamanda popülasyon yoğunluğuyla ilişkili virülans faktör genlerinin ekspresyonunu da ortadan kaldıran yeni bir ümit verici antibakteriyel stratejidir (Zhao, 2020).

Son yıllarda potansiyel probiyotik özelliklere sahip çeşitli LAB türlerinin de patojenik hem biyofilmlerle hem de savaşmak için en güçlü seçeneklerden biri olarak görülmektedir (Barzegari, 2020). Bu çalışmamızda da *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 bakterisini indikatör bakteri olarak kullanarak vajinal floaradan izole edilen probiyotik karakterlere sahip bazı *Lactobacillus* türlerinin anti-QS aktivitesini belirlemek ve bu bakterilerin biyofilm oluşturan bakterilere karşı antibiyofilm aktivitesini araştırılmıştır.



3. MATERYAL VE METOD

3.1. MATERAL

3.1.1. *Lactobacillus* Bakterilerinin Eldesi

Çalışmamızda kullandığımız suşlar 2016-2017 yılları arasında Kırşehir Ahi Evran Üniversitesine Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne başvuran yaş aralığı 18-45 arasında değişen, menopoza girmemiş, herhangi bir doğum kontrol yöntemi ile korunmayan ve son 3 ay süre içerisinde antibiyotik kullanmamış sağlıklı kadınların vajinal bölgelerinden izole edilen LAB arasından seçilmiştir. Sağlıklı kadınların vajinal bölgelerinden alınan numuneler, steril koşullarda Ahi Evran Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Laboratuvarına getirilerek aynı gün içerisinde değerlendirmeye alınmıştır. LAB'nin geliştirilmesi ve aktifleştirilmesinde MRS (Man Rogosa Sharpe, Merck) sıvı ve katı besiyeri kullanılmıştır. Laboratuvara getirilen her bir örneğin MRS katı besiyeri üzerine çiftlerli ekimleri gerçekleştirilmiş anaerob kavonozda 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. inkübasyon sonucunda petrilere oluşan beyaz, kirli beyaz ve opak koloniler değerlendirmeye alınmıştır. Ekzopolisakkarit üretimi açısından değerlendirilen LAB arasından en iyi sonuç veren beş suş çalışmamıza dahil edilmiştir. Bu suşlar; *Lactobacillus paracasei* L1, *Lactobacillus casei* L2, *Lactobacillus plantarum* L4, *Lactobacillus crispatus* L5 ve *Lactobacillus rhamnosus* L17 şeklindedir. *Lactobacillus* suşlarından saf olarak elde edilen ekzopolisakkaritlerin antimikrobiyal aktivitesini test edebilmek için *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Klebsiella Pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve *Bacillus cereus* (709) Roma tip suşları Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi (K.A.E.Ü) Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarının kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan bakteri kültürleri, gelişme ortamları ve uygun gelişim sıcaklıkları

Bakteri adı	Gelişme ortamı	Gelişim sıcaklıkları	Kaynak
<i>Lactobacillus paracasei</i> L1	MRS	37°C	K.A.E.Ü.FEF. Mikrobiyoloji Laboratuvarı
<i>Lactobacillus casei</i> L2	MRS	37°C	K.A.E.Ü.FEF. Mikrobiyoloji Laboratuvarı
<i>Lactobacillus plantarum</i> L4	MRS	37°C	K.A.E.Ü.FEF. Mikrobiyoloji Laboratuvarı
<i>Lactobacillus crispatus</i> L5	MRS	37°C	K.A.E.Ü.FEF. Mikrobiyoloji Laboratuvarı
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> L17	MRS	37°C	K.A.E.Ü.FEF. Mikrobiyoloji Laboratuvarı
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	T.S.A	37°C	K.A.E.Ü.FEF. Mikrobiyoloji Laboratuvarı
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	T.S.A	37°C	K.A.E.Ü.FEF. Mikrobiyoloji Laboratuvarı
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213	T.S.A	37°C	K.A.E.Ü.FEF. Mikrobiyoloji Laboratuvarı
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC13883	T.S.A	37°C	K.A.E.Ü.FEF. Mikrobiyoloji Laboratuvarı
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	T.S.A	37°C	K.A.E.Ü.FEF. Mikrobiyoloji Laboratuvarı
<i>Bacillus cereus</i> Roma(709)	T.S.A	37°C	K.A.E.Ü.FEF. Mikrobiyoloji Laboratuvarı

3.2. METOD

3.2.1. *Lactobacillus*'lardan Ekzopolisakkaritlerin Ekstraksi

Çalışmamızda test edilen bakterilerden ekzopolisakkaritlerin saf olarak eldesi için onbaş ve ark' nın yapmış olduğu çalışmada bazı değişiklikler uygulanmıştır. Çalışma için test bakterileri bir gece önceden uygun sıcaklıkta aktive edilmiştir. Aktive edilen kültürler 100°C'de 15 dakika süreyle ısıtıldıktan sonra 13.000 rpm'de 15 dakika

süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası kültürler farklı trikloroasetik asit konsantrasyonlarında çalışılmış ve farklı bekleme süreleri uygulanarak en yüksek ekzopolisakkarit üretiminin hangi konsantrasyonda olduğu araştırılmıştır. Süpernatana trikloroasetik asit (%45-%85) ilave edilerek 4°C'de 2 saat ve 1 gece inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 4°C'de 13.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra, süpernatantın üzerine 2×hacimde %95 etanol ilave edilmiş ve 4°C'de 1 gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında numuneler 4°C'de 6.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiş ve EPS içeren pellet üzerine 1ml saf su ilave edilerek süspansiyon edilmiştir. Saf olarak elde edilen EPS ürünleri daha sonraki analizlerde kullanmak üzere 4°C'de saklanmıştır (Onbas, 2019).

3.2.2. Saf EPS'lerin Anti-mikrobiyal Aktivitesinin Tayinini

Lactobacillus'lardan saf olarak elde edilen EPS'lerin antimikrobiyal aktivitesini belirleyebilmek için agar kuyusu difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Patojen test bakterileri uygun besiyerlerinde 37°C'de MRS sıvı besiyerinde 18 saat aktifleştirildikten sonra kültürlerin son konsantrasyonu 1×10^9 CFU/mL olacak şekilde Mueller Hinton Agar (Merck) besiyerlerine steril drigalski spatülü ile homojen bir şekilde yayılması sağlanmıştır. Ekimleri yapılan kültür plaklarının üzerine 6 mm çapında kuyucuklar açılmıştır *Lactobacillus*'lardan saf olarak elde edilen EPS'lerden 100 µL alınarak, açılan kuyucuklara aktarılmıştır. Plakların 2 saat oda ısısında bekletilmesinin ardından bakteriler 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Antimikrobiyal aktivite, kuyucukların çevresinde oluşan zon çapının mm olarak ölçülmesiyle ve üç çalışmanın ortalamasının alınmasıyla değerlendirme yapılmıştır.

3.2.3. Toplam EPS Miktarının Belirlenmesi

Fenol sülfürik asit yönteminin esas alındığı bu çalışmada; fenol çözeltisi için 25 g fenol 400 mL saf suda çözündürülerek 500 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır. Stok glikoz çözeltisini hazırlamak için; 10 mg D-glikoz 80 mL saf suda çözündürülerek geri kalan kısmı saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Glikoz standart çözeltisinden 1, 2, 3, 4, 8, 10 ve 20 mL deney tüplerine alınarak, 20 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır. 5 mL'lik şırınga ile 20x150 mm tüplere her örnekten 2 mL alınarak Ai, Bi ve Ci şeklinde adlandırılan 24 deney tüpünde örnekler hazırlanmıştır. A serisi tüplere 2 mL fenol, 10 mL derişik H₂SO₄ ilave edilmiştir. B

seri tüplere 2 mL saf su, 10 mL derişik H₂SO₄ (% 96-98'lik) ilave edilmiştir. C serisi tüplerine ise 2 mL fenol, 10 mL saf su ilave edilerek örnekler hazırlanmıştır. Ci serisi örnekleri için kör (K) olarak 12 mL su + 2 mL fenol şeklinde hazırlanmıştır. Ai ve Bi örnekleri için ise kör numunesi olarak saf su kullanılmıştır. Tüm tüpler iyice karıştırılarak homojen hale getirilir ve spektrofotometrede (Shimadzu-UVmini-1240) 485 nm dalga boyunda Ai serisi, Bi serisi örneklerine karşı okunmuş (Ai-Bi)→K, Ci örnekleri ise kör numunesine karşı okunarak (Ci-KKör)→L değerleri bulunmuştur.

3.2.4. Saf EPS'lerin Anti-biyofilm Aktivitesinin Tayini

Çalışmamızda kullandığımız *Lactobacillus* türlerinden saf olarak elde edilen EPS özütlerinin anti-biyofilm aktivitesini belirlemek amacı ile *E. coli* ve *P. aeruginosa* suşları kullanılmıştır. Patojenik bakteriler beyin kalp infüzyon agarında (BHIA) 37°C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Saf olarak elde edilen EPS özülerinden 100 ml ve bakteri kültürlerinden 100 ml (OD 600=0.132), 96 oyuklu mikrotitre plakalarına (polistiren) aktarılmış ve seri dilüsyonlar yapıldıktan sonra ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Yapışan hücreler, iki kez damıtılmış su ile nazıkçe durulandıktan sonra havada kurumaya bırakılmıştır. Boyama işlemi aseptik olarak gerçekleştirilmiştir. Biyofilmler, 30 dakika boyunca 200 ml %0.4 (w/v) kristal viyole iki kez damıtılmış su ile durulandı. Oyuklar tekrar havada kurutulduktan sonra kristal viyole'yi çözmek için 200 ml etanol kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak steril BHIB besiyeri (100 ml), pozitif kontrol olarak ekstrakt içermeyen bakteri kültürleri kullanılmıştır (Theodora, 2019). Çalışma sonuçları göz ile değerlendirilmiştir.

3.2.5. Saf EPS'lerinin Anti-quorum Sensing Aktivitesinin Tayini

Çalışmamızda kullandığımız *Lactobacillus* türlerinden saf olarak elde edilen EPS özütlerinin anti-quorum sensing aktivitesini belirlemek amacı ile monitör suş olarak *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 kullanılmıştır. *C. violaceum* 50 ml TS Broth (TSB) ortamında geliştirildi ve ardından orbital çalkalayıcıda (120 rpm) 28°C'de 48 saat inkübe edildi. *C. violaceum* 100 mL (OD 600=0.132) steril bir drigalski spatula ile TSA üzerine homojen bir şekilde yayıldı. Ekili kültür plakaları üzerinde 6 mm çapında kuyucuklar açıldı. Kuyucuklara 20 mg/ml'lik bir konsantrasyonda saf EPS ekstratları (100 ml) uygulandı. Anti-quorum sensing aktivitesi viyolasein pigmentinin arka planında oluşan zon aracılığı ile gözlemlendi (Abudoleh, 2017).

3.2.6. Saf EPS'lerinin Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi

Çalışmamızda saf EPS'lerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radikali; D9132) yöntemi kullanılmıştır. Ölçümler için en uygun DPPH radikal derişiminin belirlenmesinde; DPPH radikalinin farklı derişimlerdeki (50, 100, 150, 250, 500 ve 1000 µM) metanollü çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan DPPH çözeltilerinden 2 ml alınarak 50 ml'lik cam beherlere konulmuştur. Daha sonra üzerine 2 ml metanol eklenmiştir. Her bir cam beherin içindeki en son hacim 4 ml olacak şekilde eşit hacimde reaktif ve standart/numune eklenmiştir. Karışımlar vortekslendikten sonra oda sıcaklığında (21°C) karanlıkta 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen karışımların maksimum absorbans değerleri UV-VIS Spektrofotometre (Shimadzu 1601) ile referans çözeltileri karşı 515-528 nm aralığında maksimum absorbans verdiği dalgaboyunda çalışılmıştır. Kullanılan DPPH reaktiflerinin maksimum absorbans değerleri belirlenmiştir (Seyhan, 2019).

3.2.7. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi

FTIR matematiksel Fourier dönüşümü yöntemi ile ışığın infrared yoğunluğuna karşı dalga sayısını ölçen kimyasal analitik bir yöntemdir. Elektromanyetik ışık dizisinin kızıl ötesi bölgesi 14000 cm⁻¹ ile 10 cm⁻¹ arasındadır ve yakın dalga boylu kızıl ötesi (NIR; 4000~14000 cm⁻¹), orta dalga boylu kızıl ötesi (MIR; 400~4000 cm⁻¹) ve uzak dalga boylu kızıl ötesi (FIR; 4~400 cm⁻¹) olmak üzere üç ana bölgeden oluşmaktadır (Skoog ve ark., 1998).

FTIR spektrumları, EPS'de çeşitli fonksiyonel grupların varlığının belirlenmesi için Shang ve ark., (2013), tarafından bildirilen metoda göre bir Thermo Scientific (Nicolet 6700 FT-IR) spektrometresi kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.8. EPS'nin Monosakkarit Bileşimi

EPS'nin monosakkarit bileşimini belirlemek için 2 ml saflaştırılmış EPS, 2 mL 2M trifloroasetik (TFA) 120°C'de 2 saat hidrolize edilmiştir. Hidrolizatlar daha sonra içinde çözülmüş potasyum borohidrit (KBH₄) ile indirgenir, amonyum hidroksit (NH₄OH) ve asetik anhidrit (CH₃CO)₂O kullanarak metilasyona tabi tutulmuştur. Gaz Kromatografisi ile kompozisyonunda örnek otomatik örnekleyici kullanılarak GCMS'ye 0.5 µL enjekte edildi. GK Perkin Elmer Clarus SQ8 GCMS üzerinde

gerçekleştirilmiştir. Otomatik örnekleyici ve bir RTX-5MS sütunu ile donatılmış (30m uzunluk * 0.32mm iç çap * 0.25 mm film kalınlık). Taşıyıcı gaz olarak helyum 1 mL/dk ile kullanılmıştır. Kullanılan kromatografik koşullar aşağıdaki gibidir: İlk kolon sıcaklığı 40°C'de tutuldu. 1.5 dk, 40°C/dk'lık bir hızla 130°C'ye yükseltildi ve daha sonra 8°C/dk'da 290°C'ye yükseldi ve burada 5 dk tutuldu. Şeker tanımlama için standart glikoz, galaktoz, ramnoz, arabinoz, mannoz, fukoz, N-asetil glukozamin ve N-asetil galaktozamin ile karşılaştırma yapıldı (Kanamarlapudi ve Muddada, 2017).

3.2.9. Saf EPS'lerinin Antikanser Aktivitelerinin Belirlenmesi

Probiyotik karakterli *Lactobacillus* suşlarından (*L. paracasei*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. crispotus* ve *L. rhamnosus*) saf olarak elde edilen EPS'in antikanser aktivitelerinin belirlenmesi amacı ile MDA-MB-231 meme kanser hücre hattı kullanılmıştır.

3.2.9.1. MDA-MB-231 Meme Kanser Hücre Hattı ve gelişim koşulları

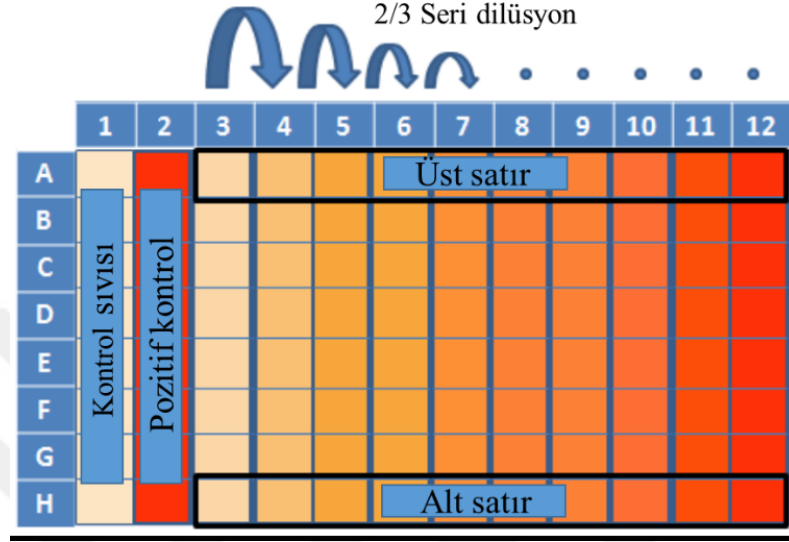
Çalışmamızda bütün deneyler Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Hücre Kültürü Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Meme hücreleri rutin olarak %10'luk fetal bovin serum, gentamisin, penisilin ve streptomisin antibiyotikleri içeren RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) 1640 besiyerinde bütün deneyler 37°C' de %5 CO₂'li ortamda gerçekleştirilmiştir (Merghoub ve ark., 2009).

Hücre kültürlerinin pasajlanması sırasında hücre hatları, kültür kabı yüzeyini kapladıkça besiyeri pipetlenerek atılmış ve kültür kabı yüzeyi Fosfat Tamponlu Tuzlu Su (PBS) ile yıkanmıştır. Daha sonra yıkama tamponu uzaklaştırılmış ve hücre tipine bağlı olarak 1-2mL 0.25% Tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 5 dakika boyunca hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ve birbirlerinden ayrılması sağlanmıştır. Tripsini inaktive etmek amacı ile 4-5mL besiyeri eklenmiş ve istenen oranda pasajlama yapılarak, hücreler yeni kültür ortamlarına aktarılmıştır (Parsian ve ark., 2016).

3.2.9.2. Saf EPS'lerin XTT (Hücre proliferasyon kiti) Testi

Vajinal kökenli *Lactobacillus* suşlarından elde edilen EPS'lerin MDA-MB-231 meme kanser hücre hattı hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisi ya da sitotoksitesinin değerlendirilmesi amacı ile XTT [(2,3-Bis (2-metoksi- 4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum), Biological Industries, İsrail] kiti kullanılmıştır. Hücreler 96 kuyulu

plakalara ekilerek bir gece boyunca (24 saat) karbondioksit inkübatöründe büyütülmüştür. 24 saat sonra liyofilize edilen kültür süpernatantları 72 saat hücrelerle muamele edilmiştir. Göreceli büyüme miktarları, kuyulara eklenen XTT ajanı (fenazin metosülfat) ile belirlenmiştir. Şekil 3.1’de XTT hücre proliferasyon kitinin şematik görünümü verilmiştir.



Şekil 3.1. 96 kuyucuklu plak üzerinde XTT hücre proliferasyon kitinin şematik görünümü.

4. BULGULAR

Çalışmamızda kullanılan LAB'ne ait izolatlar sağlıklı kadınların vajinal bölgelerinden izole edilmiştir. Çalışmaya dahil edilecek hastalar son üç ay içerisinde vajinal bir enfeksiyon geçirmemiş ve antibiyotik kullanmamış kişiler arasından seçilmiştir. İzolatların potansiyel probiyotik özellikleri önceki çalışmada kanıtlanmıştır (Kiray, 2017).

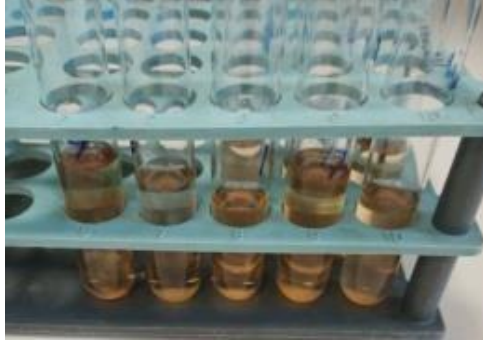
Ekzopolisakkarit üretimi açısından değerlendirilecek probiyotik özellikteki 22 suş arasından en iyi sonuç veren beş suş çalışmamıza dahil edilmiştir. Bu suşlar; *Lactobacillus paracasei* L1, *Lactobacillus casei* L2, *Lactobacillus plantarum* L4, *Lactobacillus crispatus* L5 ve *Lactobacillus rhamnosus* L17 şeklindedir.

4.1. *Lactobacillus*'lardan Ekzopolisakkaritlerin Saf Ekstraksiyonu

Çalışmamızda test edilen bakterilerden ekzopolisakkaritlerin saf olarak eldesi için Onbaş ve ark' nın (2019) yapmış olduğu çalışmada bazı değişiklikler uygulanmıştır. Yapılan denemelerde farklı sıcaklık dereceleri, farklı trikloroasetik asit konsantrasyonu ve farklı bekleme süreleri kullanılmıştır. Çalışma sonunda en iyi elde edilen sonucun %85 trikloroasetik asit uygulamasının ardından 1 gece bekletilmesi ile elde edilmiştir. Saf olarak elde edilen EPS ürünleri daha sonraki analizlerde kullanmak üzere 4°C'de saklanmıştır. Farklı çalışma şartlarında saf EPS üretim miktarları Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. *Lactobacillus* spp. suşlarından elde edilen EPS'lerin 485 nm dalga boyunda verdiği adsorbans değerleri

Bakteri suşları	%85 Trikloroasetik asit uygulaması	
	1.5 ml Ependorf tüp	10-20 ml Hacimli tüp
<i>Lactobacillus paracasei</i>	0.018	1.08
<i>Lactobacillus casei</i>	0.032	0.99
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.043	1.28
<i>Lactobacillus crispatus</i>	0.025	1.79
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	0.018	1.95
	%45 Trikloroasetik asit uygulaması	
<i>Lactobacillus paracasei</i>	0.016	0.08
<i>Lactobacillus casei</i>	0.028	0.08
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.035	1.01
<i>Lactobacillus crispatus</i>	0.020	1.42
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	0.010	1.35



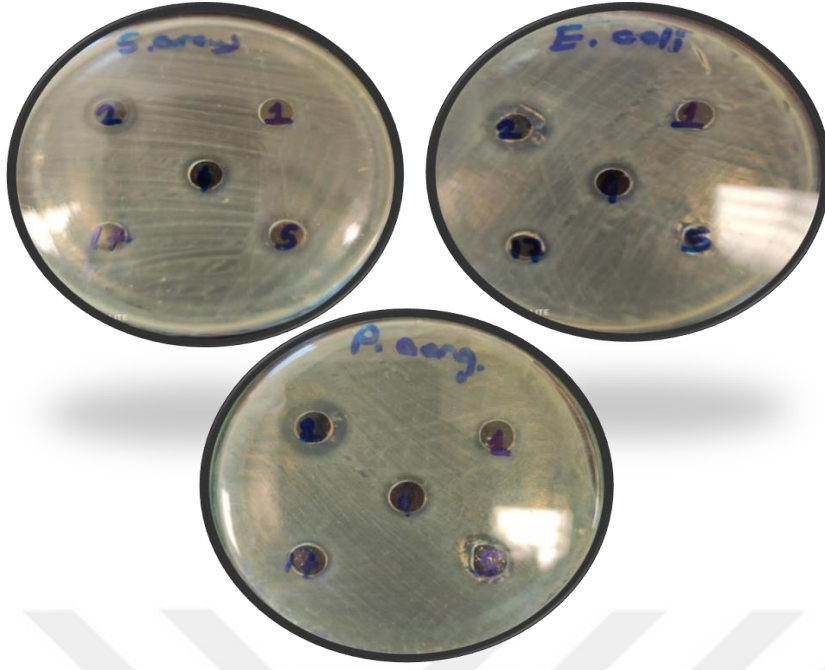
Şekil 4.1. Saf olarak elde edilen EPS'lerin tüpteki görünümü

4.2. Saf EPS'lerin Mikrobiyal Aktivite Sonuçları

Lactobacillus suşlarının ürogenital enfeksiyonlara sebep olan ve klinik olarak önemi olan patojenlere karşı antagonistik aktivitesi kuyu difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. Çalışmada *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. cereus* RSKK 709, *E. aerogenes* ATCC 13048 ve *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 suşları kullanılmıştır. Çalışma sonucunda farklı *Lactobacillus* suşlarından saf olarak elde edilen EPS'lerin *Bacillus cereus* hariç diğer patojenik suşlar üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Patojenik suşlar arasında en güçlü antimikrobiyal etkinliğe sahip suşun *L. casei* L2 suşuna ait EPS olduğu belirlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen bütün *Lactobacillus* türlerinden elde edilen EPS'lerin *P. aeruginosa* üzerinde etkinliğinin olduğu görülmüştür. Vajinal *Lactobacillus* suşlarından elde edilen EPS'lerin antimikrobiyal aktiviteleri Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Vajinal *Lactobacillus* spp. suşlarından elde edilen EPS'lerin antimikrobiyal aktiviteleri (mm)

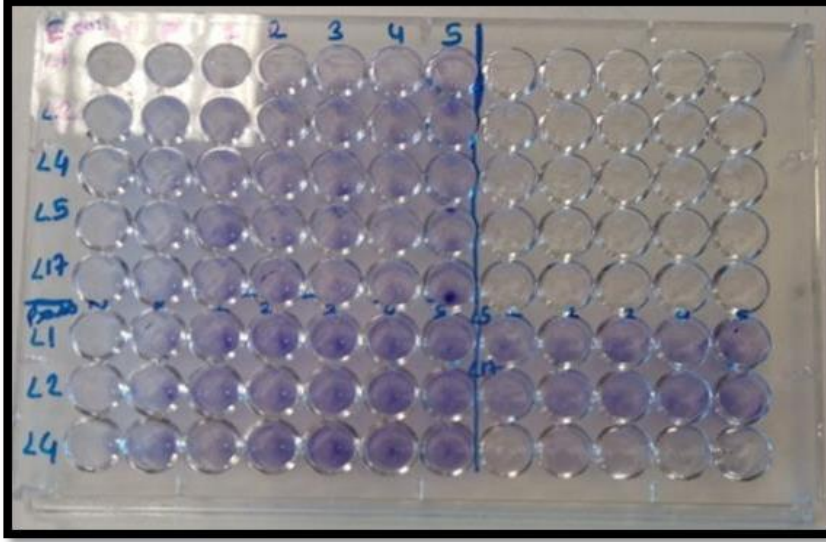
	<i>L. paracasei</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. crispatus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
<i>Staphalococcus aureus</i> ATCC 29213	-	14	13	13	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	16	13	13	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	12	15	12	13	12
<i>Bacillus cereus</i> RSKK 709	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	12	15	13	14	13
<i>Klebisella pneumoniae</i> ATCC 13883	-	15	11	13	-



Şekil 4.2. Vajinal *Lactobacillus* spp. suşlarından elde edilen EPS'lerin antimikrobiyal aktivitelerinin görüntüsü

4.3. Saf EPS'lerin Anti-biyofilm Aktivite Sonuçları

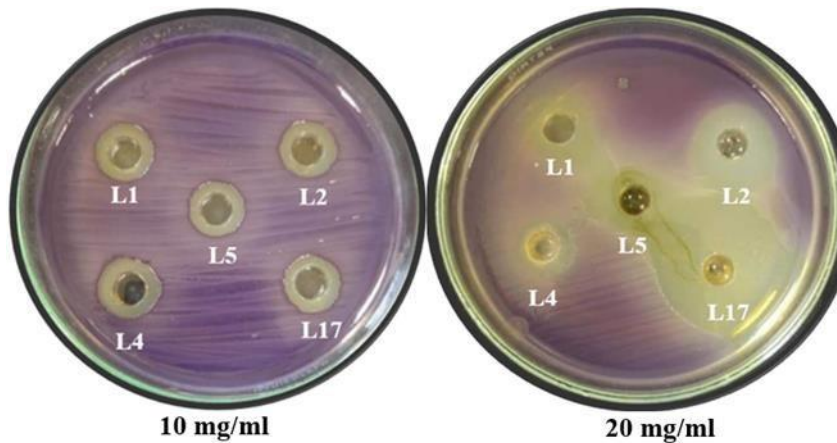
Çalışmamızda kullandığımız *Lactobacillus* türlerinden saf olarak elde edilen EPS özütlerinin anti-biyofilm aktivitesini belirlemek amacı ile *E. coli* ve *P. aeruginosa* suşları kullanılmıştır. 96 oyuklu mikrotitre plakalarında yapılan çalışma sonucunda bütün *Lactobacillus* suşlarının hem *E. coli* üzerinde hem de *P. aeruginosa* üzerinde çeşitli oranlarda anti biyofilm etkisi gösterdiği gözlenmiştir. Şekil 4.3'de görüldüğü gibi *Lactobacillus* suşlarından elde edilen EPS'lerin özellikle *E. coli* üzerinde daha güçlü inhibisyon etkisi göstermiştir. Özellikle L1 ve L2 suşlarına ait EPS'lerin inhibisyon etkisinin daha güçlü olduğu görülmektedir. *P. aeruginosa* üzerinde saf EPS'lerin yüksek konsantrasyonlarda etkili olurken düşük konsantrasyonlarda etki oranının düşük olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.3. Saf EPS'lerin 96 oyuklu mikrotitre plakalarındaki anti-biyoflim görüntüleri

4.4. Saf EPS'lerinin Anti-quorum Sensing Aktivitesinin Tayini

Çalışmamızda kullandığımız *Lactobacillus* türlerinden saf olarak elde edilen EPS özütlerinin anti-quorum sensing aktivitesini belirlemek amacı ile monitör suş olarak *Chromobacterium violaceum* kullanılmıştır (Abudoleh, 2017). Saf EPS'lerin farklı konsantrasyonlarının araştırıldığı çalışmada her bir *Lactobacillus* suşundan elde edilen EPS'lerin 10 mg/mL konsantrasyonunda ortalama eşit aktivite gösterirken 20 mg/mL konsantrasyonda ise suşların gösterdikleri etkinin arttığı ve değişiklik gösterdiği görülmektedir. Özellikle L2 ve L17 suşlarına ait EPS'lerin 20 mg/mL konsantrasyonda çok güçlü etki gösterdiği belirlenmiştir. Şekil 4.4'de



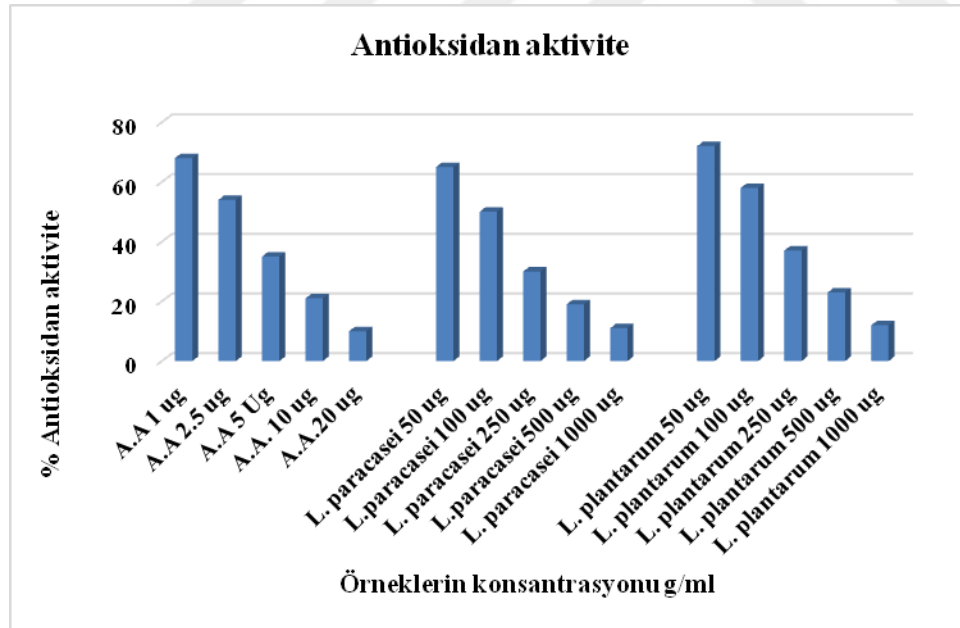
Şekil 4.4. Vajinal kökenli *Lactobacillus* suşlarından elde edilen EPS'lerin anti-quorum sensing aktivitelerini belirleyen inhibisyon zon çaplarının görüntüsü

Tablo 4.3. Vajinal kökenli *Lactobacillus* suşlarından elde edilen EPS'lerin farklı konsantrasyonda anti-QS aktivitelerini belirleyen inhibisyon zon çaplarının ölçüsü (mm)

EPS Konsantrasyonları	L1	L2	L4	L5	L17
10 mg/mL	15	16	15	14	15
20 mg/mL	15	18	15	16	23

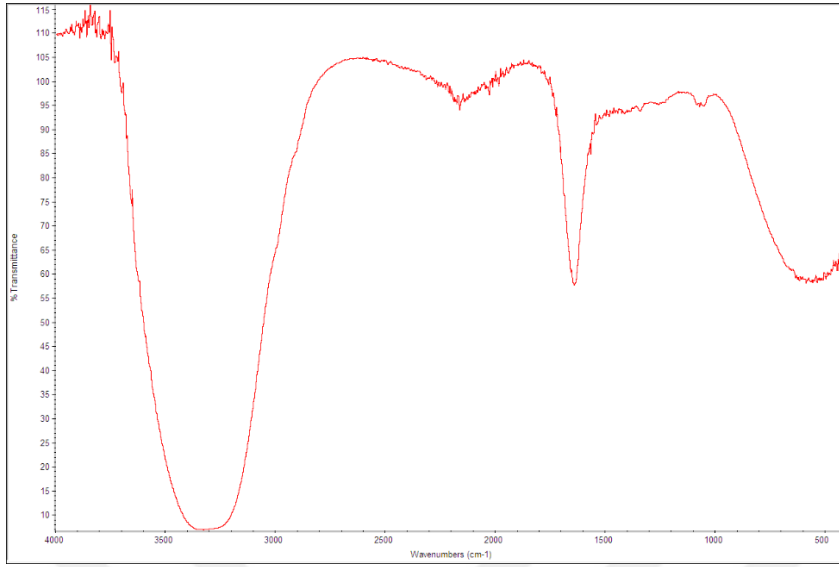
4.4. Saf EPS'lerinin Antioksidan Kapasitesi

L. plantarum'dan ve *L. paracasei* suşlarından elde edilen EPS'nin in vitro antioksidan aktivitesi, DPPH yöntemi ile belirlendi. Çalışmada kontrol olarak kullanılan askorbik asit (AA) EPS ile karşılaştırıldığında suşların antioksidan potansiyelinin AA'ninkinden daha düşük olsada yine de iyi bir konsantrasyonda olduğu görülmektedir. En yüksek antioksidan aktiviteye sahip *L. plantarum* ve *L. paracasei* suşlarının % antioksidan kapasitelerini gösteren grafik Şekil 4.5'de verilmiştir.



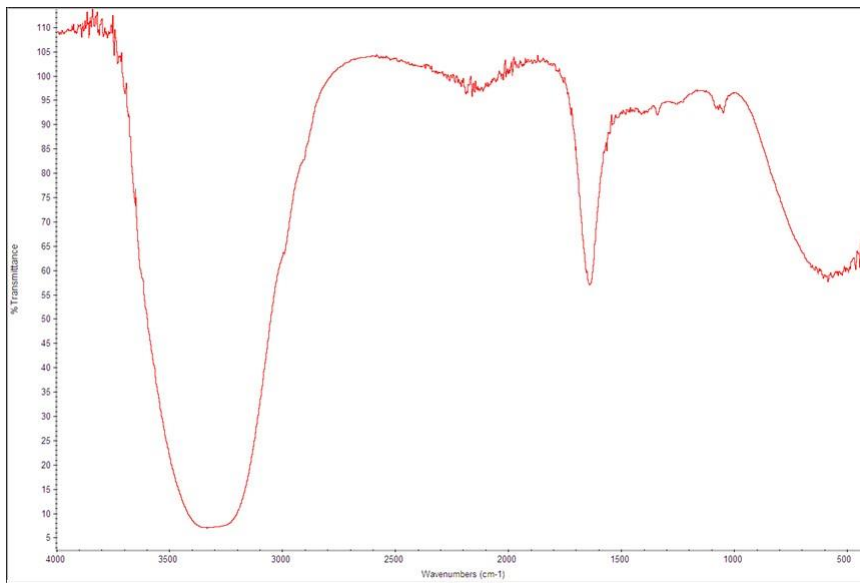
Şekil 4.5. *L. paracasei* ve *L. plantarum* suşlarının antioksidan aktivitesi. AA: Askorbik Asit

4.5. Fourier dönüümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi



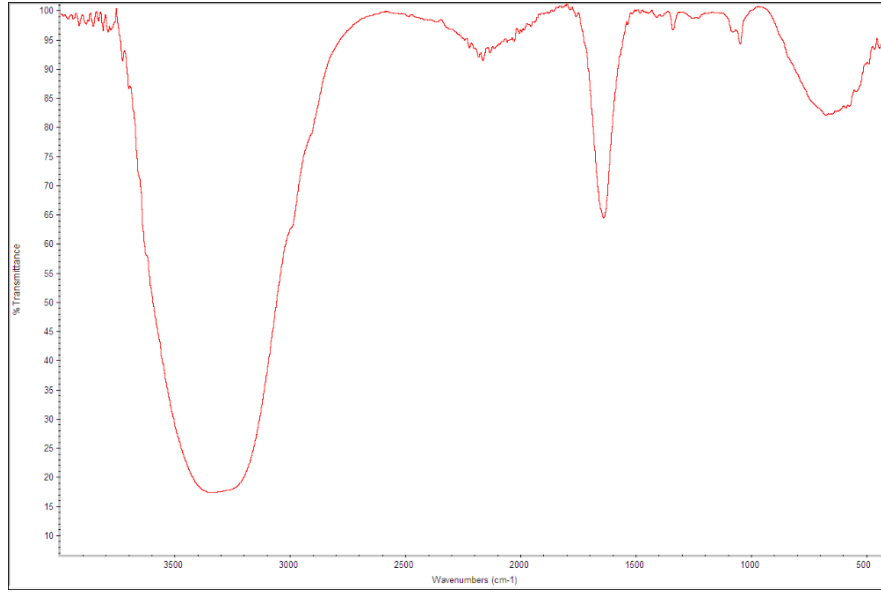
Şekil 4.6. *L. paracasei* L1 suşunda ait EPS'lerin FT-IR analizi

L. paracasei L1 suşunda ait EPS'lerin FT-IR analizinde 3322.21cm^{-1} civarında gözlenen yayvan band monosakkaridlerin yapısında bulunan OH grubuna ait bandlardır. $1636,41\text{cm}^{-1}$ civarındaki bant yine monosakkarid yapısında bulunan C = O bağlarına ait bandlar olarak ortaya çıkmıştır. 1100 cm^{-1} yakınındaki bantlar karbonhidratlar ve aromatik grupların C-O gerilimleri ile ilişkilidir. Bu durum literatürde verilen EPS spektrumları ile uyumlu olarak gözlenmiştir (Wang ve ark; 2014).



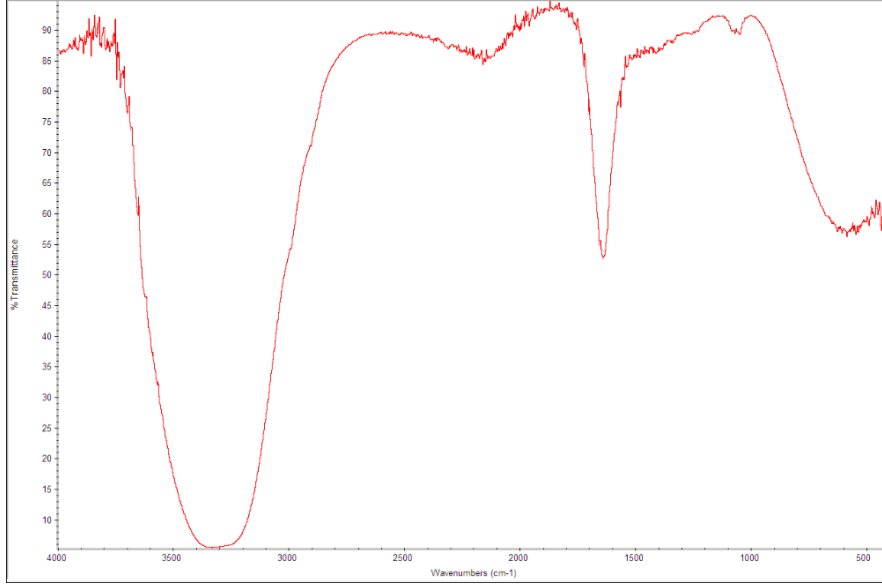
Şekil 4.7. *L. casei* L2 suşuna ait EPS'lerin FT-IR analizi

L. casei L2 suşuna ait EPS'lerin FT-IR analizinde 3342.67cm^{-1} civarında civarında yoğun ve geniş bir bant gösterilmiştir. Bu bantlar OH grubuna ait bandlardır. $1636,37\text{cm}^{-1}$ civarındaki bant yine monosakkarid yapısında bulunan C = O bağlarına ait bandlar olarak ortaya çıkmıştır. 1100 cm^{-1} yakınındaki bantlar karbonhidratlar ve aromatik grupların C-O gerilimleri ile ilişkilidir. Bu durum literatürde verilen EPS spektrumları ile uyumlu olarak gözlenmiştir (Wang ve ark; 2014).



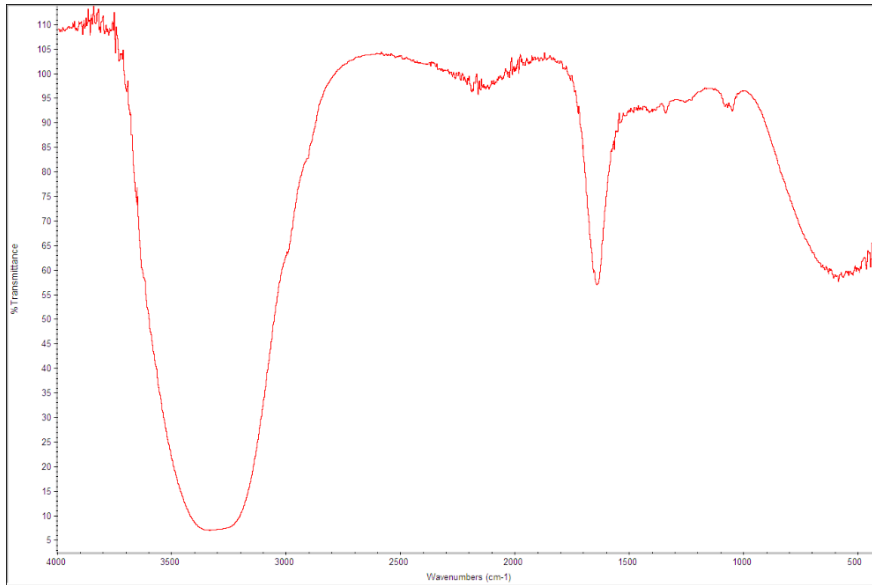
Şekil 4.8. *L. plantarum* L4 suşuna ait EPS'lerin FT-IR analizi

L. plantarum L4 suşuna ait EPS'lerin FT-IR analizinde 3342.67cm^{-1} civarında civarında yoğun ve geniş bir bant gösterilmiştir. Bu bantlar OH grubuna ait bandlardır. $1636,37\text{cm}^{-1}$ civarındaki bant yine monosakkarid yapısında bulunan C = O bağlarına ait bandlar olarak ortaya çıkmıştır. 1100 cm^{-1} yakınındaki bantlar karbonhidratlar ve aromatik grupların C-O gerilimleri ile ilişkilidir. Bu durum literatürde verilen EPS spektrumları ile uyumlu olarak gözlenmiştir (Wang ve ark; 2014).



Şekil 4.9. *L. crispatus* L5 suşuna ait EPS'lerin FT-IR Analizi

L. crispatus L5 suşuna ait EPS'lerin FT-IR analizinde 3328.44 cm^{-1} civarında civarında yoğun ve geniş bir bant gösterilmiştir. Bu bantlar OH grubuna ait bandlardır. 1637.14 cm^{-1} civarındaki bant yine monosakkarid yapısında bulunan C = O bağlarına ait bandlar olarak ortaya çıkmıştır. 1100 cm^{-1} yakınındaki bantlar karbonhidratlar ve aromatik grupların C-O gerilimleri ile ilişkilidir. Bu durum literatürde verilen EPS spektrumları ile uyumlu olarak gözlenmiştir (Wang ve ark; 2014).

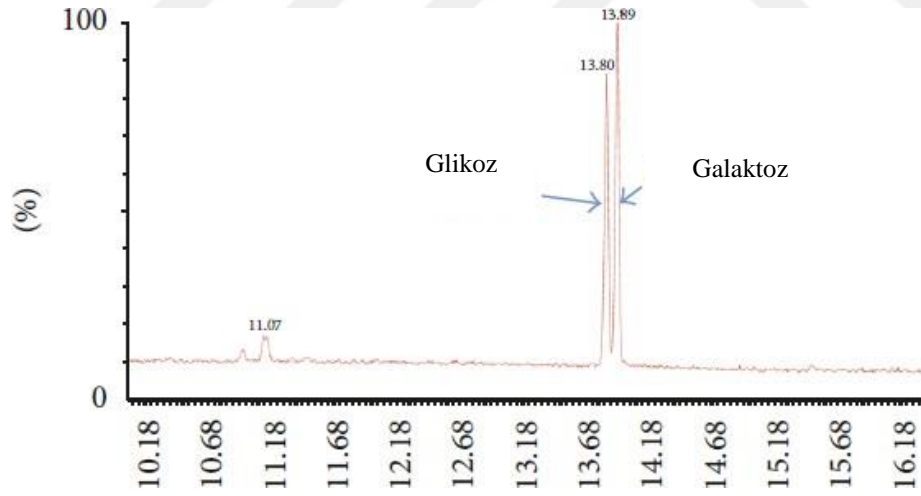


Şekil 4.10. *L. rhamnosus* L17 suşuna ait EPS'lerin FT-IR analizi

L. rhamnosus L17 suşuna ait EPS'lerin FT-IR analizinde 3332.09 cm^{-1} civarında civarında yoğun ve geniş bir bant gösterilmiştir. Bu bantlar OH grubuna ait bandlardır. 1636.85 cm^{-1} civarındaki bant yine monosakkarid yapısında bulunan C = O bağlarına ait bandlar olarak ortaya çıkmıştır. 1100 cm^{-1} yakınındaki bantlar karbonhidratlar ve aromatik grupların C-O gerilimleri ile ilişkilidir. Bu durum literatürde verilen EPS spektrumları ile uyumlu olarak gözlenmiştir (Wang ve ark; 2014).

4.6. GC-MS Analiz Sonuçları

Ekzopolisakkaritin şeker bileşimini belirlemek için Gaz Kromatografi-Kütle Spektroskopisi kullanılarak yapılmıştır (GCMS; Şekil 4.11). Çalışmada sadece L17 suşunun analizi yapılmıştır. GC-MS analizi sonucu elde edilen veriler EPS'nin önceki raporlarıyla uyumludur. Daha önceki çalışmalarda da *Lactobacillus* suşlarından elde edilen EPS'lerde hem glikoz hem de galaktoz içermekte ve genellikle 1: 1 molar oranlarla aynı orantı da bulunmaktadır (Shankar ve ark, 2021).



Şekil 4.11. *L. paracesi* L1 suşuna ait EPS'lerin GC-MS Analiz Sonuçları

4.7. *Lactobacillus* suşlarından elde edilen EPS'lerin MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerindeki Antiproliferatif Etkisi

Sağlıklı kadınların vajinal mikrofloralarından izole edilen *Lactobacillus* türlerinden elde edilen EPS'lerin MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı üzerindeki

antiproliferatif etkisini belirlemek amacı ile XTT yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan suşlardan elde edilen EPS'lerin meme hücre hattı üzerindeki anti proliferatif etkisi 72 saat inkübasyonun sonunda değerlendirilmeye alınmıştır. Şekil 4.12'da *L. paracasei* L1 suşundan elde edilen EPS'lerin XTT kit sonucuna göre 96 kuyulu plaklardaki hücre proliferasyon görüntüsü örnek olarak verilmiştir. Toksikolojide toksik bir maddenin ortalama öldürücü dozunun belirlendiği LD50 (%50 öldürücü dozun kısaltması) programı ile *L. paracasei* L1, *L. casei* L2, *L. plantarum* L4, *L. crispatus* L5 ve *L. rhamnosus* L17 suşlarından elde edilen EPS'lerin MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı antiproliferatif etki oluşturduğu gözlenmiştir. Suşlardan elde edilen EPS'lerin oluşturduğu LD50 değerleri Tablo 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4.4. Vajinal *Lactobacillus* suşlarından elde edilen EPS'lerin MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkilerini gösteren LD50 değerleri

EPS elde edilen <i>Lactobacillus</i> suşları	LD50
<i>L. paracasei</i> L1	115 µg/ml
<i>L. casei</i> L2	85 µg/ml
<i>L. plantarum</i> L4	100 µg/ml
<i>L. crispatus</i> L5	120 µg/ml
<i>L. rhamnosus</i> L17	80 µg/ml

Tablo 4.4'de görüldüğü gibi *Lactobacillus* suşlarından elde edilen EPS'lerin MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı üzerinde farklı konsantrasyonlarda anti proliferasyon etki göstermiştir.

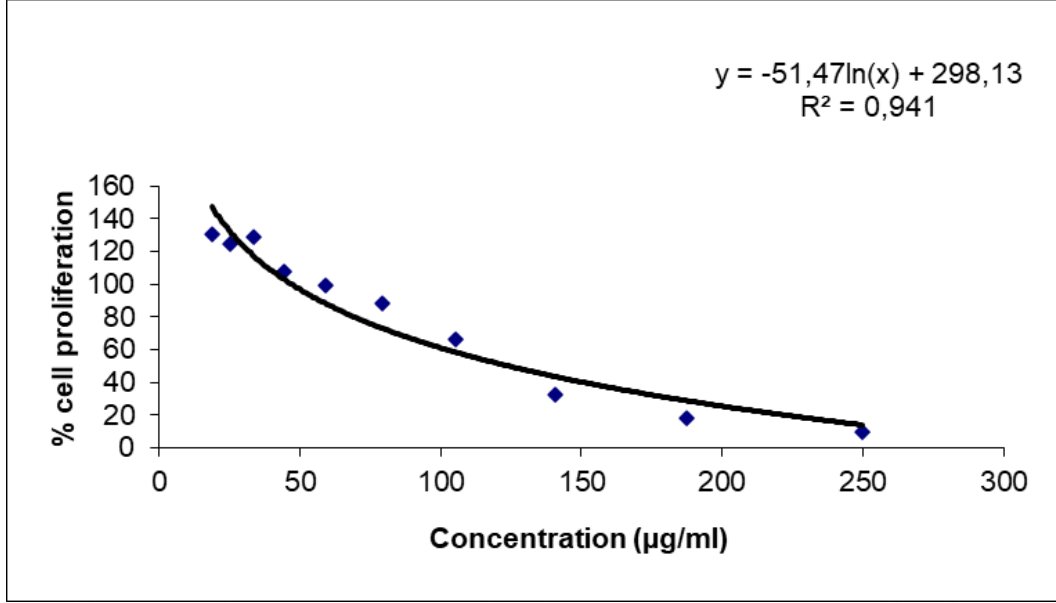
Bir tetrazolyum tuzu olan XTT, canlı hücrelerin işlevsel mitokondrileri tarafından kırmızı renkli formazan bileşenlerine dönüştürüldüğünden, oluşan renk kuyu içindeki canlı hücre miktarıyla orantılı olmaktadır. Şekil 4.13'de görüldüğü gibi *L. paracasei* L1 suşundan elde edilen EPS'lerin meme hücreleri üzerinde en büyük antiproliferatif etkisi metabolitin 115 µg/ml'lik en yüksek dozunda %90-95 düzeyinde ölüm görülürken, *L. casei* L2 suşuna ait EPS'lerin 85 µg/ml'lik en yüksek dozunda ise yaklaşık %100 oranında ölüm görülmüştür (Şekil 4.14). Yine *L. plantarum* L4 suşuna

ait EPS'lerin 100 µg/ml'lik dozunun meme hücreleri üzerindeki ölüm oranının %50 olduğu görülmüştür (Şekil 4.15).

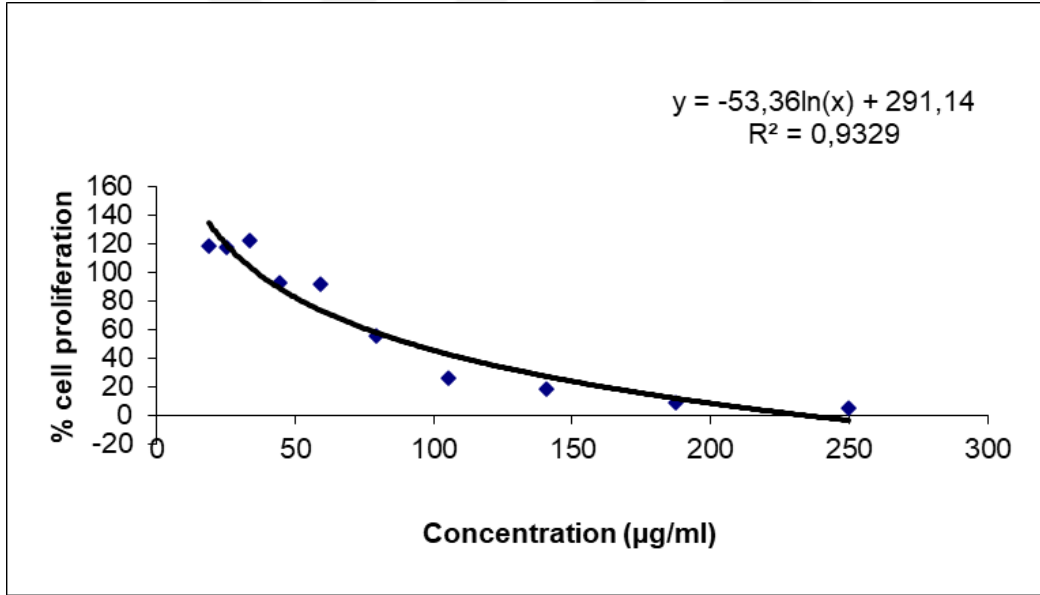


Şekil 4.12. 96 kuyulu plaklarda *L. paracasei* L1 suşuna ait EPS'lerin MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı XTT kiti sonuçları

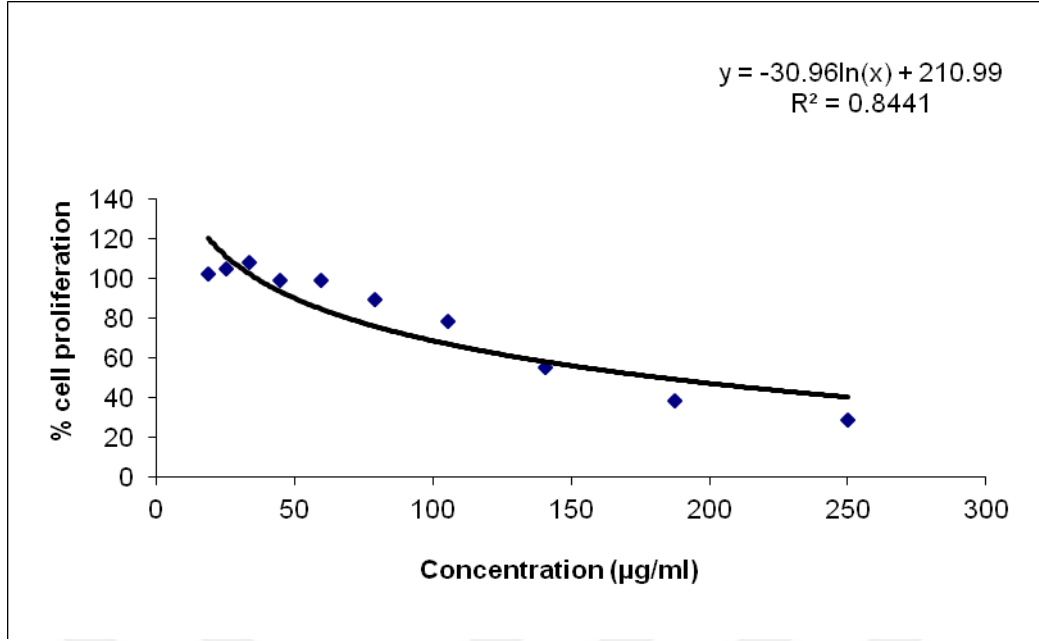
Yine *L. crispatus* L5 suşuna ait EPS'lerin 120 µg/ml'lik dozunda meme hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisinde yaklaşık %50 ölüm oranı görülürken, *L. rhamnosus* L17 suşunun 80 µg/ml'lik dozunda ise yaklaşık %95 oranında ölüm oranı gözlemlenmiştir.



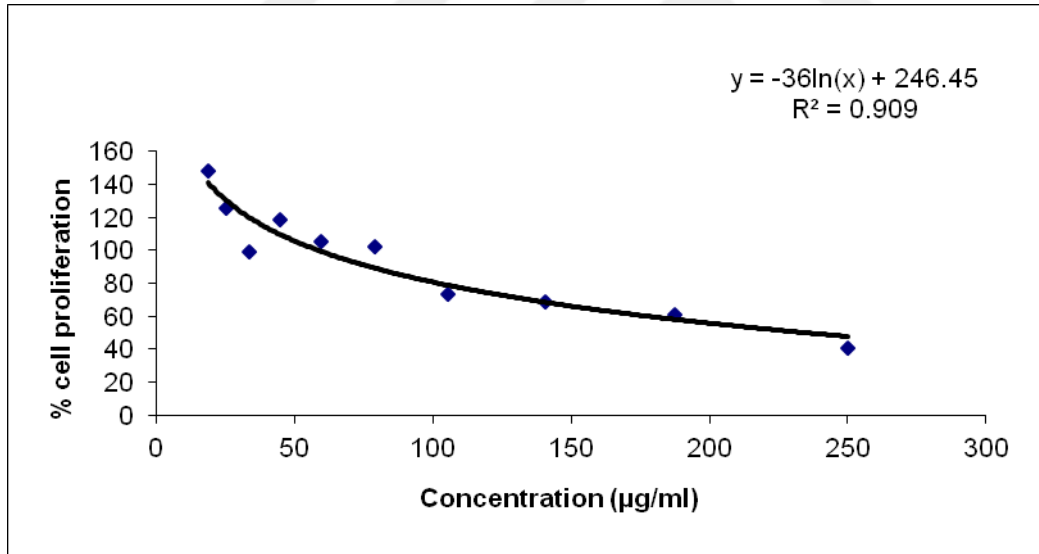
Şekil 4.13. *L. paracasei* L1 suşundan elde edilen EPS'lerin (LD50: 115 µg/ml) MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkisinin grafik olarak gösterimi.



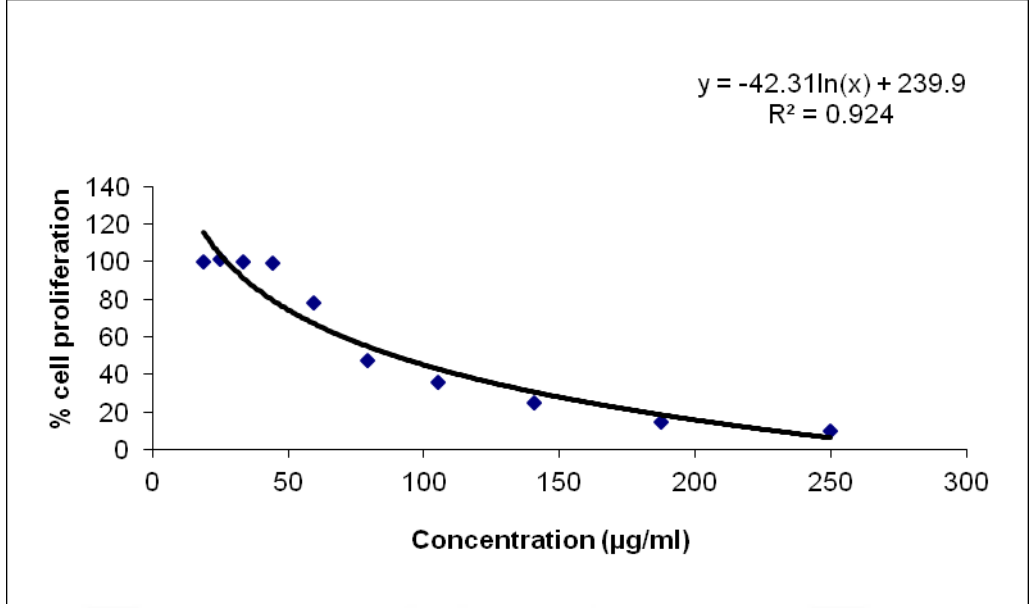
Şekil 4.14. *L. casei* L2 suşundan elde edilen EPS'lerin (LD: 85 µg/ml) MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkisinin grafik olarak gösterimi.



Şekil 4.15. *L. plantarum* L4 suşundan elde edilen EPS'lerin (LD50:100 µg/ml) MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkisinin grafik olarak gösterimi.



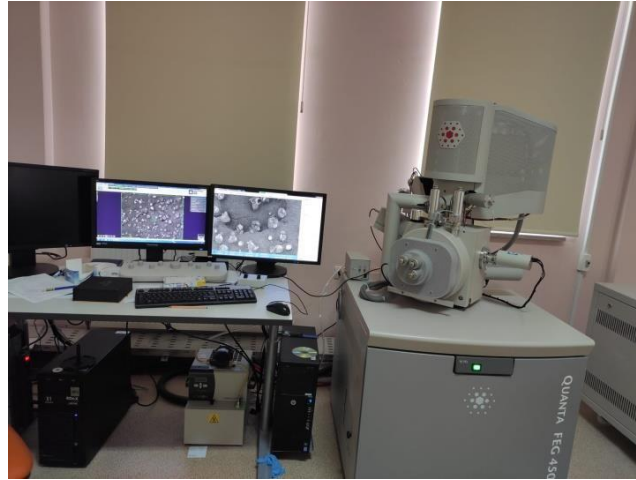
Şekil 4.16. *L. crispatus* L5 suşundan elde edilen EPS'lerin (LD50:120 µg/ml) MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkisinin grafik olarak gösterimi.



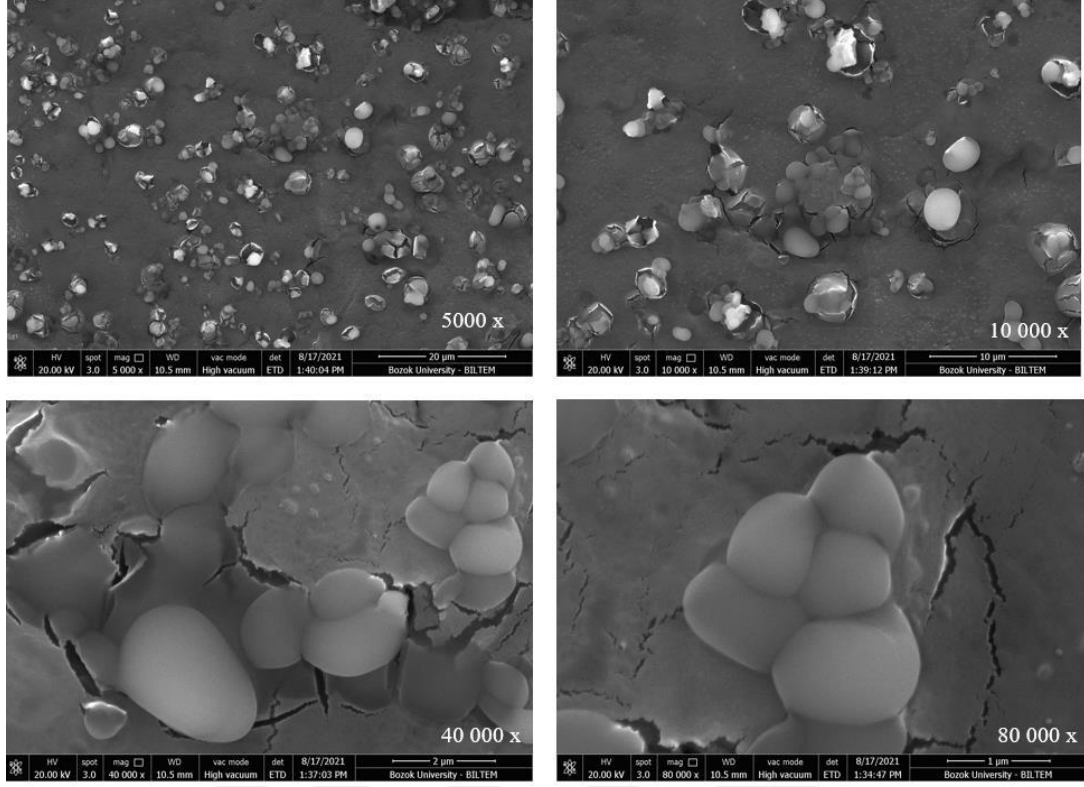
Şekil 4.17. *L. rhamnosus* L17 suşundan elde edilen EPS'lerin (LD50:80 µg /ml) MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkisinin grafik olarak gösterimi.

4.8. *Lactobacillus* Suşlarından Elde Edilen EPS'lerin Elektron Mikroskop Görüntüleri

Lactobacillus suşlarından elde edilen EPS'lerin elektron mikroskop görüntüleri Yozgat Bozok Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinde çekilmiştir (Quanta FEG-250 SEM) Şekil 4.18.



Şekil 4.18. Quanta FEG-250 SEM cihazının görüntüsü



Şekil 4.19. *L. paracasei* L1 suşuna ait EPS'lerin elektron mikroskop görüntüleri (5000x-10000x -40000x -80000x).

5. TARTIŞMA

EPS'ler, potansiyel sağlık destek fonksiyonları nedeniyle ortamdaki büyüme sırasında metabolik süreç sırasında LAB'nin oluşturduğu polisakkarit zinciridir. Pek çok bakteri türü tarafından sentezlenen EPS'ler *Lactobacillus* gibi LAB tarafından da üretilmektedir (Dilna ve ark., 2015). EPS'ler, mikroorganizmaları sıcaklık, pH, antibiyotikler, konak immün savunmaları vb. gibi olumsuz faktörlerden korumak için hücre dışı biyofilm matrisinin oluşumunda yer alan ana bileşenlerden biridir (Nguyen ve ark., 2020).

EPS önemli bakteriyel bileşenlerden biri olup probiyotik aktivitede hayatta kalma, adezyon ve anti-tümör etkisi gibi insan sağlığı üzerinde pek çok yararlı etkisi bulunmaktadır (Dilna ve ark., 2015). Bu nedenle, bu çalışmada değerlendirdiğimiz daha önce sağlıklı kadınların vajinal mikrofloralarından izole edilmiş 20 LAB kültür ortamında EPS üretme yetenekleri açısından taranmış ve yüksek olmaları nedeniyle beş (*Lactobacillus paracasei* L1, *Lactobacillus casei* L2, *Lactobacillus plantarum* L4, *Lactobacillus crispatus* L5, *Lactobacillus rhamnosus* L17) suş seçilmiştir. kullanılmıştır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda LAB'nin oluşturduğu EPS'nin antimikrobiyal ve anti kanser etkisine odaklanılmıştır (Mahdi ve ark., 2018; Matar ve ark., 2019). *Lactobacillus plantarum* R315 ve *Bifidobacterium bifidum* WBINO3'ten elde edilen EPS'lerin bağırsak mikrobiyotası üzerinde yararlı etki göstermiş ve her iki EPS'nin de *Shigella sonnei*, *Cronobacter askazakii*, *Staphylococcus auerus*, *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* ve *Candida albicans* gibi patojenlere karşı antimikrobiyal etkiler gösterdiğini belirtmiştir (Li ve ark., 2014). Çalışmamızda da test edilen suşlardan elde edilen EPS'lerin *E.coli*, *P.aergenosa*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* gibi idrar yolu mikrobiyotası üzerinde patojeniteye sebep olan mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu görülmüştür.

EPS'ler, mikroorganizmaları sıcaklık, pH, antibiyotikler, konak immün savunmaları vb. gibi olumsuz faktörlerden korumak için hücre dışı biyofilm matrisinin oluşumunda yer alan ana bileşenlerden biridir. Çalışmamızda kullandığımız *Lactobacillus* türlerinden saf olarak elde edilen EPS özütlerinin anti-biyofilm aktivitesini belirlemek amacı ile *E. coli* ve *P. aeruginosa* suşları kullanılmıştır. Çalışmadabütün *Lactobacillus* suşlarından elde edilen EPS hem *E. coli* üzerinde hem

de *P. aeruginosa* üzerinde çeşitli oranlarda anti biyofilm etkisi gösterdiği gözlenmiştir. EPS'ler, proteinler, nükleik asitler ve lipitlerle birlikte bir biyofilm matrisinin yapısını oluşturur (Ciszek-Lenda, 2011). Düşük pH'ın *L. rhamnosus* GG'de biyofilm oluşumunu önemli ölçüde azalttığı, *Limosilactobacillus reuteri* suşlarında biyofilm oluşumunu arttırdığı bulundu (Lebeer ve ark., 2007).

Yapılan benzer bir çalışmada da *L. coryniformis* NA-3 tarafından üretilen yeni bir EPS'nin, in vitro olarak antioksidan ve biyofilm önleyici özelliklerinin araştırıldığı çalışmada, *Bacillus cereus* ve *Salmonella typhimurium* biyofilmlerinin oluşumunu sırasıyla yaklaşık %80 ve %40 inhibisyon oranları ile hafiflettiği görülmüştür (Xu ve ark., 2020).

Serbest radikaller genellikle ciddi sağlık sorunlarına neden olmaktadır. Bu nedenle EPS'ler serbest radikalleri önlemek için çok önemli bir doğal antioksidandır. LAB'nin EPS'leri ayrıca yüksek antioksidan aktivite sergiler. Yapılan bir çalışmada, *Lactobacillus gasseri* FR4'ten elde edilen EPS'lerin iyi bir serbest radikal aktiviteye sahip olduğunu, hidroksil ve süperoksit radikal yakalama aktivitelerinin ise EPS konsantrasyonuna bağlı olduğunu göstermiştir (Rani ve ark., 2018). Çalışmamızda da kullanılan *Lactobacillus* suşlarının hepsinin antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Bu çalışmada EPS'lerin anti-quorum algılama aktivitesi araştırılmış ve saf EPS'lerin ortamdaki sinyal moleküllerinin varlığında biyosensör suşunun violasein pigment üretimi üzerinde inhibitör aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmamıza benzer bir araştırmada *Streptococcus thermophilus*'un mikrobiyal ekzopolisakkarit üretimi ve anti-quorum algılama aktivitesi nin araştırıldığı çalışmada, CV026 suşu C6-AHL sinyal molekülü üzerinde inhibitör bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Literatürde quorum sensing mekanizmasının EPS üretimine etkisi konusunda araştırmacıların çalışmaları olduğu, saflaştırılmış EPS'in inhibitör ajan olarak quorum sensing mekanizması üzerinde test edilmediği belirlenmiştir. Mikrobiyal EPS, bazı bakterilerin virülans mekanizması olarak ortaya çıkan ve saflaştırıldıktan sonra çeşitli endüstrilerde farklı amaçlarla kullanılabilen bir ürün olarak da ön plana çıkmaktadır (Karadeniz ve ark., 2021).

Sağlıklı kadınların vajinal mikrofloralarından izole edilen *Lactobacillus* türlerinden elde edilen EPS'lerin MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı üzerindeki

antiproliferatif etkisini belirlemek amacı ile XTT yöntemi kullanılmıştır. Çalışma sonucunda özellikle *L. casei* L2 suşuna ait EPS'lerin 85 µg/ml'lik en yüksek dozunda ise yaklaşık %100 oranında ölüm oranı görülmüştür (Şekil 4.14). Bu oran oldukça yüksek olup çok düşük dozlarda bile meme hücre hattı üzerinde antiproliferatif etki göstermiştir. Çalışmamızda yine *L. paracasei* L1 suşundan elde edilen EPS'lerin meme hücreleri üzerinde en büyük antiproliferatif etkisi metabolitin 115 µg/ml'lik en yüksek dozunda %90-95 düzeyinde ölüm görülürken (Şekil 4.13), L17 suşunun 80 µg/ml'lik dozunda ise yaklaşık %95 oranında ölüm oranı gözlemlenmiştir. Çalışma verilerine göre güçlü probiyotik etkinliğe sahip *Lactobacillus* suşlarından elde edilen EPS'lerin meme kanseri tedavisinde kullanılabilecek potansiyel adaylar olduğu görülmektedir. Benzer bir çalışmada *Lactobacillus*'tan elde edilen EPS'lerin meme kanseri hücreleri üzerinde konsantrasyona ve zamana göre farklı çoğalma önleyici etkiler gösterdiği belirtilmiştir (Das ve Goyal, 2014).

Kanser, günümüzde oldukça fazla ilgi gören ve genellikle kemoterapi yöntemi ile tedavi edilen sağlık sorunlarından biridir. Bununla birlikte kemoterapi, hafiften şiddetliye kadar değişebilen ve yaşamı tehdit eden bazı beklenmedik etkilere neden olabilir (Nurgali ve ark., 2018). Bu nedenle, LAB'nin EPS'lerinin anti-tümör etkileri nedeniyle yararlı olduğu, kanseri iyileştirmeye yardımcı olmak için başka farmasötik ürünler araştırılmaktadır (Saadat ve ark., 2019).

L. plantarum 70810 suşundan elde edilen EPS önemli ölçüde tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmiştir. HepG-2, BGC-823 özellikle, HT-29 bu kanser türlerine örnek olarak verilebilir (Wang ve ark., 2014). *L. acidophilus*'un antikanser özelliklerinin in vitro değerlendirilmesinde kolon kanseri hücre dizilerindeki EPS'ler, anjiyogenez ve tümör sağkalımı ile ilgili genlerin ekspresyonunu inhibe edebildiklerini göstermiştir (Deepak ve ark., 2016).

6. SONUÇLAR

LAB'den türetilen EPS'ler, dış ortama salgılanan veya bakteri hücre yüzeyine yapıştırılan yüksek moleküler ağırlıklı, uzun zincirli, doğrusal veya dallı biyopolimerlerdir. Anti-tümör, bağışıklık uyarıcı, antioksidan ve anti-biyofilm aktiviteleri gibi rapor edilen probiyotik özellikleri nedeniyle, LAB tarafından üretilen EPS'ler, farmasötik geliştirme, kanser biyolojisi, gıda bilimi ve çeşitli disiplinleri kapsayan araştırmaların odak noktası haline gelmiştir. Çalışmamızda da vajinal mikrofloradan izole edilmiş olan LAB'den elde edilen EPS'in antimikrobiyal, anti-biyofilm ve anti-quorum sensing aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmamızda ayrıca EPS'in serbest radikalleri, özellikle süperoksit radikallerini temizleyebilme özelliğine sahip antioksidan üretim kapasitesi yüksek olarak bulunmuştur. Antikanser özelliğini araştırdığımız *Lactobacillus* kökenli EPS'lerin MDA-MB-231 meme kanser hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkinin çok düşük dozlarda bile yüksek etki göstermiş olması oldukça dikkat çekicidir. Antibiyotik direncinin arttığı son yıllarda antibiyotiklere alternatif olabilecek doğal ürünlerin antibiyotiklerin yerine geçebilmesi için bu alanda daha çok araştırmaya ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

- Abdelnasser, SM., Yahya, SMM., Mohamed, WF., Asker, MMS., Shady, HMA., Mahmoud, MG., Gadallah, MA., (2017), Antitumor Exopolysaccharides Derived from Novel Marine Bacillus: Isolation, Characterization Aspect and Biological Activity, *Asian Pac J Cancer Prev*, 18(7), 1847-1854.
- Abudoleh, SM., Mahasneh, AM., (2017), Anti-Quorum Sensing Activity of Substances Isolated from Wild Berry Associated Bacteria, *Avicenna J Med Biotechnol.* 9(1), 23-30.
- Ayyash, M., Abu-Jdayil, B., Itsaranuwat, P., Galiwango, E., Tamiello-Rosa, C., Abdullah, H., et al., (2020), Characterization, bioactivities, and rheological properties of exopolysaccharide produced by novel probiotic *Lactobacillus plantarum* C70. *Int J Biol Macromol*, 144, 938-946
- Barzegari, A., Kheyrolahzadeh, K., Khatib, SMH., Sharifi, S., Memar, MY., Vahed, SZ, (2020), The Battle of Probiotics and Their Derivatives Against Biofilms, *Infect Drug Resist*, 26(13), 659-672.
- Bhatt, AP., Redinbo, MR., Bultman, SJ., (2017), The role of the microbiome in cancer development and therapy CA Cancer, *J. Clin*, 67, 326-344.
- Branda, SS., Vika, A., Friedmanb, L., Kolter, R., (2005), Biofilms: the matrix revisited, *TRENDS in Microbiology*, 13(1), 20-26.
- Cerning, J., (1995), Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria, *Lait*, 75, 463-472.
- Cerning, J., Renard, CMG., Thibault, JF., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M., et al., (1994), Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer, *Applied in Environnemental Microbiology*, 60, 3914-919.
- Cerning, J., (1990)., Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria, *FEMS Microbiological Reviews*, 87, 113-130.
- Coconier, M., Bernet, MF., Chauviere, G., Servin, AL., (1993), Adhering heat –killed human *Lactobacillus acidophilus*, strain LB, inhibits the process of pathogenicity of diarrhoeagenic bacteria in cultured human intestinal cells, *Journal of Diarrhoeal disease Research*, 11, 235-242.

- Chen, F., Huang, G., (2018), Preparation and immunological activity of polysaccharides and their derivatives, *International Journal of Biological Macromolecules*, 112, 211-216.
- Ciszek-Lenda, M., (2011), Probiyotik bakterilerden ekzopolisakkaritlerin biyolojik işlevleri, *Cent Eur J Bağışıklık*, 36, 51-55.
- Curty, G., Carvalho, PSde., Soares, MA., (2020), The Role of the Cervicovaginal Microbiome on the Genesis and as a Biomarker of Premalignant Cervical Intraepithelial Neoplasia and Invasive Cervical Cancer, *Int J Mol Sci*, 21(1), 222.
- Das, D., Goyal, A., (2014), Characterization and biocompatibility of glucan: A safe food additive from probiotic *Lactobacillus plantarum* DM5, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(4), 683-690.
- De Vuyst, L., Degeest, B., (1999), Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria, *FEMS Microbiol. Rev*, 23, 153-177.
- Deepak, V., Ram Kumar Pandian, S., Sivasubramaniam, SD., Nellaiah, H., Sundar, K., (2016), Optimization of anticancer exopolysaccharide production from probiotic *Lactobacillus acidophilus* by response surface methodology, *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 46(3), 288-297.
- Dilna, SV., Surya, H., Aswathy, RG., Versha, KK., Sakthikumar, DN., (2015), Characterization of an exopolysaccharide with potential health benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4, *LWT Food Sci. Technol*, 64, 1179-1186.
- Garrett, WS., (2015), Cancer and the microbiota, *Science*, 3;348(6230), 80-86.
- Göktepe, I., Juneja, KV., Ahmedna, M., (2006), Probiotics in Food Safety and Human Health, Published in by CRC Press Taylor & Francis Group ABD.
- Harutoshi, T., (2013), Exopolysaccharides of lactic acid bacteria for food and colon health applications. Biochemistry, genetics, and molecular biology. In: Lactic acid bacteria: R and D for food, health, and livestock purposes, Kongo M, 222- 238.
- Hawver, LA., Jung, SA., Ng, WL., (2016), Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems, *FEMS Microbiol Rev*, 27354348.
- Hood, SK., Zottola, EA., (1988), Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells *Journal of Food Science*, 53, 1514-1516

- Higgins, MJ., Novak, JT., (1997), Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation, *Journal of Environmental Engineering*, 123(5), 479-485.
- Iannitti, T., Palmieri, B., (2010), Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice, *Clin Nutr*, 29, 701-725.
- Ismail, B., Madhavan Nampoothiri K., (2013), Exposition of anti tumor activity of a chemically characterized exopolysaccharide from a probiotic *Lactobacillus Plantarum* MTCC 9510, *Biologia.*, 68(6): 1041-1047.
- Jiang, Q., Chen, J., Yang, C., Yin, Y., Yao, K., (2019), Quorum Sensing: A Prospective Therapeutic Target for Bacterial Diseases, *BioMed Res Int*, 4, 2015978.
- Kailasapathy, K., Chin, J., (2000), Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.*, *Immunol cell Biol*, 78: 80-88.
- Kanamarlapudi, SRLK., Muddada, S., (2017), Characterization of Exopolysaccharide Produced by *Streptococcus thermophilus* CC30, *Biomed Res Int*, 2017, 4201809.
- Kanmani, P., Satish Kumar, R., Yuvaraj, N., Paari, KA., Pattukumar, V., Arul, V., (2012), Probiotics and Its Functionally Valuable Products-A Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(6), 641-658.
- Karadeniz, DG., Kaskatepe, B., Kiyimaci, ME., Tok, KC., Gumustas, M., Karaaslan, C., (2021), Microbial exopolysaccharide production of *Streptococcus thermophilus* and its anti-quorum sensing activity. *Arch Microbiol*, 203(6), 3331-3339.
- Kim, Y., Oh, S., Kim, SH., (2009), BioChemistry Biophysics Research Communication, 379, 324-329.
- Kıray, E., Kariptas, E., (2015), Probiyotikler, Prebiyotikler ve Sinbiyotiklerin Kolorektal Kanseri İlişkisi, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 13(1), 28-46.
- Kıray, E., (2017), İnsan Kaynaklı Vajen Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Konings, WN., Kok, J., Kuipers, OP., Poolman, B., (2000), Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium, *Curr Opin Microbiol*, 3, 276-282.
- Krzyżek, P., (2019), Challenges and Limitations of Anti-quorum Sensing Therapie, *Front Microbiol*, 31(10), 2473.

- Langhendries, JP., Detry, Van Hees, J., Lamboray, JM., Darimont, J., Mozin, MJ., Secretin, MC., Senterre, J., (1995), Effect of a fermented infant formula containing viable bifidobacteria on the faecal flora composition and pH of healthy full-term infants, *J Pediat Gastroenterol Nutr*, 21, 177-181.
- Lee, JW., Shin, JG., Kim, EH., Kang, HE., Yim, IB., et al., (2004), Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by the cytoplasmic fraction of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum*, *J Vet Sci*, 5, 41-48.
- Lebeer, S., Verhoeven, T., Velez, M., et al., (2007), Çevresel ve genetik faktörlerin probiyotik suşu *Lactobacillus rhamnosus* GG tarafından biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi, *Appl Çevre Mikrobiol*, 73, 6768-6775.
- Li, W., Ji, J., Rui, X., Yu, J., Tang, W., Chen, X., Jiang, M., Dong, M., (2014), Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus helveticus* MB2-1 and its functional characteristics *in vitro*, *Lebensm Wiss. Technol*, 59, 732-739 .
- Liu, CT., Chu, FJ., Chou, CC., Yu, RC., (2011), Anti proliferative and anti cytotoxic effects of cell fractions and exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* 01, *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 721, 157-62.
- Liu L., Wu R., Zhang J., Shang N., Li P., (2017), d-Ribose Interferes with Quorum Sensing to Inhibit Biofilm Formation of *Lactobacillus paraplantarum* L-ZS9, *Front Microbiol*, 8, 1860.
- López-Moreno, A., Aguilera, M., (2020), Probiotics Dietary Supplementation for Modulating Endocrine and Fertility Microbiota Dysbiosis, *Nutrients*, 12(3), 757.
- Mater, H., B. Hussein, LH., Mahdi, H., MUSAFAER, LG., ALSAADI, B., MIJBEL, L., (2019), Role of Biofilm in Reinfection in Catheter-associated Urinary Tract Infection in Iraqi Women, *J. Glob. Pharma Technol*, 11(2), 32-37.
- Merghoub, N., Benbacer, L., Amzazi, S., Morjani, H., Mzibri, M., (2009), Cytotoxic effect of some Moroccan medicinal plant extracts on human cervical cell lines, *J Med Plants Res*, 3(12), 1045-1050.
- Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, RM., Remaud Simeon, M., (2001), Homopolysaccharides from lactic acid bacteria, *Int Dairy J*, 11, 675-685.
- Nugyen, PT., Nguyen, TT., Bui, DC., Hong, PT., Hong, QK., Nguyen, HT., (2020), Exopolysaccharide production by Lactic acid bacteria: themanipulation of

- environmental stresses for industrial application, *AMS Microbiol*, 6(4), 451-469.
- Nurgali, K., Jagoe, RT., Abalo, R., (2018), Editorial: adverse effects of cancer chemotherapy: anything new to improve tolerance and reduce sequelae? *Front Pharmacol*, 9, 245.
- Onbas, T., Osmanagaoglu, Ö., Kiran, F., (2019), Potential Properties of *Lactobacillus plantarum* F-10 as a Bio control strategy for Wound Infection, *Probiotics Antimicrob Proteins*, 1110-1123.
- Osemwegie, OO., Adetunjib, CO., Ayenia, EA., Adejobiac, OI., Arised, RO., Nwonumag, CO., Oghenekarof, AO., (2020), Exopolysaccharides from bacteria and fungi: current status and perspectives in Africa, *Heliyon*, 6, e04205.
- Parsian, M., Mutlu, P., Yalcin, S., Tezcaner, A., Gunduz, U., (2016), Half generations magnetic PAMAM dendrimers as an effective system for targeted gemcitabine delivery, *Int J Pharm*, 30(1-2), 104-113.
- Pascual, LM., Daniel, MB., Giordano, W., Pajaro, MC., Baberis, IL., (2008), Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by *Lactobacillus fermentum* L23, *Curr. Microbiol.*, 56, 397-409.
- Paulo, EM., Vasconcelos MP., Oliveira IS., de Jesus AHM., Nascimento R., IS. de Melo, RMR. de Abreu, SA., (2012), An alternative method for screening lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation, *Ciênc Tecnol Aliment Campinas*, 32(4), 710-714.
- Plaza-Diaz, J., Ruiz-Ojeda, FJ., Gil-Campos, M., Gil, A., (2018), Immune-mediated mechanisms of action of probiotics and synbiotics in treating pediatric intestinal diseases, *Nutrients*, 10(1), 42.
- Plaza-Diaz, J., Robles-Sanchez, C., Abadia-Molina, F., Saez-Lara, MJ., Vilchez-Padial, LM., Gil, A., Gomez-Llorente, C., Fontana, L., (2017), Gene expression profiling in the intestinal mucosa of obese rats administered probiotic bacteria, *Sci Data*, 4, 170186.
- Rani, RP., Anandharaj, M., David Ravindran, A., (2018), *Lactobacillus gasseri* FR4 tarafından üretilen yeni bir ekzopolisakkaritin karakterizasyonu ve in vitro biyolojik özelliklerinin gösterilmesi, *Int J Biol Macromol*, 109, 772-783.

- Reid, G., Burton, J., Hammond, J., Bruce, AW., (2004), Nucleic acid based diagnosis of bacterial vaginosis and improved management using probiotic lactobacilli, *J Med Food*, 7, 223-228.
- Rendueles, O., Kaplan, JB., Ghigo, JM., (2013), Antibiofilm polysaccharides, *Environ Microbiol*, 15(2), 334-336.
- Ruas-Madiedo, P., Salazar, N., de los Reyes-Gavil, GC., (2009), Biosynthesis and chemical composition of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. In: Bacterial Polysaccharides, *Current Innovations and Future Trends*, 279-310.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., Zoon, P., (2002), An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, *Int. Dairy J.* 12, 163-171.
- Ruiz-Ruiz, C., Srivastava, GK., Carranza, D., et al., (2011), An exopolysaccharide produced by the novel halophilic bacterium *Halomonas stenophila* strain B100 selectively induces apoptosis in human T leukaemia cells, *Appl Microb Biotechnol*, 89, 345-55.
- Saadat, YR., Khosroushahi, AY., Gargari, BP., (2019), A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides, *Carbohydr Polym*, 217, 79-89.
- Salazar, N., Gueimonde, M., De Los Reyes-Gavilán, CG., Ruas-Madiedo, P., (2016) Exopolysaccharides produced by Lactic acid bacteria and bifidobacteria as fermentable substrates by the intestinal microbiota, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(9),1440-1453.
- Seyhan, SA., (2019), DPPH Antioksidan Analizinin Yeniden Değerlendirilmesi, *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*, 9, 2.
- Shang, N., Xu, RH., Li, PL., (2013), Structure characterization of an exopolysaccharide produced by Bifidobacterium animalis RH, *Carbohydrate Polymers*, 91, 128-134.
- Shankar, T., Palpperumal, S., Kathiresan, D., Sankaralingam, S., Balachandran, C., Baskar, K., Hashem, A., Alqarawi, AA, Abd Allah, EF., (2021), Biomedical and therapeutic potential of exopolysaccharides by *Lactobacillus paracasei* isolated from sauerkraut: *Screening and characterization. Saudi J Biol Sci*, 28(5), 2943-2950.

- Skoog, DA., Holler, FJ., Nieman, TA., (1998), Principles of Instrumental Analysis. 5th. Bilim Yayıncılık, Ankara, s. 850.
- Stanton, C., Ross, RP., Fitzgerald, GF., Van Sinceren, D., (2005), Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Curr Opin Biotechnol*, 16, 198-203.
- Theodora, NA., Dominika, V., Waturangi DE., (2019), Screening and quantification of anti-quorum sensing and antibiofilm activities of Phyllo sphere bacteria, *BMC Res Notes*, 12(1), 732.
- Van Geel-Schutten, GH., Faber, EJ., Smit, E., Monting, K., Smith, MR., Ten Brink, B., Kamerling, JP., Vliegthart, JFG., Dijkhuizen, L., (1999), Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild-type strain and by mutant strains, *Appl. Environ. Microbiol*, 65, 3008-3014.
- Wang, K., Li, W., Rui, X., Chen, X., Jiang, M., & Dong, M., (2014). Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810, *International Journal of Biological Macromolecules*, 63, 133-139.
- Yılmaz, R., Temiz, A., (2003), *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 'un Klasik ve Moleküler Yöntemler Kullanılarak Tanımlanması ve Karakterizasyonu, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 2003, 01, 9-42.
- Yu KW., Suh HJ., Bae SH., Lee CS., Kim SH., Yoon CS., (2001), Chemical properties and Physiological activities of stromata of Cordyceps militaris, *J. Microbiol. Biotechnol*, 11, 266-274.
- Yuvacı, HU., Cevrioğlu, AS., (2017), Kadın üreme sistemi mikrobiyotası, *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 1, 95-103.
- Zhao, X., Yu, Z., Ding, T., (2020), Quorum-Sensing Regulation of Antimicrobial Resistance in Bacteria, *Microorganisms*, 17(3), 425.
- Xiaoqing, Xu., Peng, Q., Zhang, Y., Tian, D., Zhang, P., Huang, Y., Ma, L., Qiao, Y., Shi, B., (2020), A novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus coryniformis* NA-3 exhibits antioxidant and biofilm-inhibiting properties in vitro, *Food Nutr Res*, 64, 10.29219.

8. EKLER

EK1

Besiyerlerinin Kimyasal Bileşenleri

MRS (deMan Rogosa Sharpe) agar besiyerinin kimyasal bileşeni

Miktar (g/L)	Bileşen
10 g	Kazein pepton
10 g	Et ekstraktı
4 g	Maya ekstraktı
20 g	D(+) Glukoz
2 g	K ₂ HPO ₄
2 g	di-Ammonium hydrogen citrate
0,2 g	MgSO ₄
0,04 g	MnSO ₄
1 g	Tween 80
5 g	Sodyum asetat
14 g	Agar-agar
pH 5,7±0,2 (sterilizasyondan önce)	

TSB (Tryptic Soy Broth) besiyerinin kimyasal bileşeni

Miktar (g/L)	Bileşen
17 g	Kazeinpepton
3 g	Soya pepton
2,5 g	Glukoz
5 g	NaCl
2,5 g	K ₂ HPO ₄
pH 7.3 ±0,2 (sterilizasyondan önce)	

EK2

Tampon ve Çözeltiler

Phosphate Buffered Saline (PBS) tamponu

Bileşenler	Konsantrasyon (mmol/L)
Nacl	137
kcl	2.7
Na ₂ HPO ₄	10
KH ₂ PO ₄	1.8

PH 7.4

Trikloro asitik asit C₂HCL3O₂

Bileşenler	Konsantrasyon
Molar ağırlık	163.4 g/mol
Yoğunluk	1.63 g/cm ³
Erime Noktası	196 °C
pH	0.66

Gram Boyamada Kullanılan Çözeltilerin İçerikleri

Kristal Violet Stok Çözeltisi	Konsantrasyon
Kristal Violet	1g
Ethanol	% 95
dH ₂ O	100 ml'ye tamamlanır

ÖZGEÇMİŞ

Nadia Maseer RAHEEL, ilkokul, ortaokul ve lise eğitimini Irak'ta tamamladı. 2007 yılında DhiQar Üniversitesi Biyoloji bölümünden mezun oldu. Lisans eğitimini tamamladıktan sonra, 2020 yılında Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik ve Genetik Bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı.

