



Pichia kudriavzevii JD2 MAYA SUŞUNUN BAZI PROBİYOTİK
ÖZELLİKLERİNİN VE SUŞTAN İZOLE EDİLEN
EKZOPOLİSAKKARİTİN PREBİYOTİK AKTİVİTELERİNİN
BELİRLENMESİ

Jaafar Nozad Aakef AAKEF

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NİSAN 2023

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Jaafar Nozad Aakef AAKEF

13/04/2023

Pichia kudriavzevii JD2 MAYA SUŞUNUN BAZI PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN
VE SUŞTAN İZOLE EDİLEN EKZOPOLİSAKKARİTİN PREBİYOTİK
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

(Doktora Tezi)

Jaafar Nozad Aakef AAKEF

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Nisan 2023

ÖZET

Bu çalışmada, hurmadan izole edilen *Pichia kudriavzevii* JD2 suşunun bazı probiyotik özellikleri ve suştan elde edilen ekzopolisakkaritin (EPS_{JD2}), hücresiz süpernatantın (postbiyotik-CFS_{JD2}), sinbiyotik (JD2+EPS_{JD2}), postbiyotik+prebiyotik (CFS_{JD2}+EPS_{JD2}) uygulamanın bazı biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır. JD2 ve prebiyotik ilaveli ortamda geliştirilen JD2'nin farklı konsantrasyonlarda safra içeren ortamlarda kolesterolü giderimi sırasıyla, %62 ve %65 ve presipitasyonu sırasıyla 38,2 ve 41,2 µg/mL olarak belirlenmiştir. JD2, yapay bağırsak sıvısında 0. dakikada ve %0,06 safra konsantrasyonunda en yüksek canlılık (5,95 log cfu/mL) gösterirken, 1. ve 240. dakikada canlı hücre sayısında azalma olduğu gözlenmiştir. Suşun, 60 ve 180 dakika sonra pH 3'te yapay mide sıvısında canlı hücre sayısı sırasıyla 5,48 ve 4,98 log kob/mL olarak tespit edilmiştir. Suş, hekzon solventinde %85, toluende %79 ve asetonda %73 hidrofobisite göstermiştir. EPS_{JD2}'nin toplam karbonhidrat miktarı 246 mg/L, molekül ağırlığı 42,309 kDa olarak belirlenmiştir. Çalışmada EPS_{JD2}'nin prebiyotik aktivite skorları *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* DSM20246 (48 saatte 2,44 log cfu/mL) ve *S. cerevisiae* BU19'a (48 saatte 1,17 log kob/mL) kullanılarak tespit edilmiştir. EPS_{JD2} mide sıvısında (pH 3) %4,88 hidroliz olmuştur. CFS_{JD2}'nin metabolik içeriklerinin farklı türde amino ve yağ asitleri, fenoller, vitaminler ve şekerler olduğu bulunmuştur. *L. plantarum* subsp. *plantarum* DSM20246 ve *S. cerevisiae* BU19'un prebiyotiği (EPS_{JD2}) fermente etme kapasitesi sırasıyla 6,4 ve 7,6 log kob/mL olarak belirlenmiştir. Çalışmada, JD2, CFS_{JD2}, farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 5, 10 mg/mL) EPS_{JD2}, JD2+EPS_{JD2} ve CFS_{JD2}+EPS_{JD2} uygulamalarının antioksidan aktiviteleri üç farklı metot (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), süperoksit anyon ve hidroksil radikalini süpürücü aktivitesi) ile tespit edilmiştir. Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, en yüksek antioksidan aktivite DPPH metodunda 10 mg/mL'lik CFS_{JD2}+EPS_{JD2} uygulamasında %86,6, en düşük aktivite ise süperoksit anyon radikali süpürücü aktivitesi metodunda 0,5 mg/mL'lik EPS_{JD2}'de %44,2 olarak bulunmuştur. Üç metotta da araştırmada incelenen tüm uygulamaların bitkisel kaynaklı ticari prebiyotik olan inülinin antioksidan aktivitelerinden yüksek olduğu belirlenmiştir (p<0,05). *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* 29212 ve *Escherichia coli* ATCC 11229 suşlarına karşı antibiyofilm aktivite JD2'de CFS_{JD2}'ye daha fazla bulunurken prebiyotik konsantrasyonu arttıkça prebiyotik, sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamanın anti-biyofilm aktivitesi artmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda JD2 suşundan elde edilen ekzopolisakkaritin prebiyotik olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir.

Bilim Kodu : 20309
Anahtar Kelimeler : *Pichia kudriavzevii*, probiyotik, prebiyotik, ekzopolisakkarit
Sayfa Adedi : 182
Danışman : Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

DETERMINATION OF SOME PROBIOTIC PROPERTIES OF *Pichia kudriavzevii* JD2
YEAST STRAIN AND THE PREBIOTIC ACTIVITIES OF EXOPOLISACHARITIN
ISOLATED FROM THE STRAIN

(Ph.D. Thesis)

Jaafar Nozad Aakef AAKEF

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

April 2023

ABSTRACT

In this study, some probiotic properties of *Pichia kudriavzevii* JD2 strain isolated from date and some biological activities of exopolysaccharide (EPS_{JD2}) obtained from the strain, cell-free supernatant (postbiotic-CFS_{JD2}), synbiotic (JD2+EPS_{JD2}), postbiotic+prebiotic (CFS_{JD2}+EPS_{JD2}) application were investigated. The cholesterol removal of JD2 and JD2 developed in media supplemented with prebiotics in media containing bile at different concentrations was 62% and 65%, respectively, and its precipitation was determined as 38.2 and 41.2 µg/mL, respectively. While JD2 showed the highest viability (5.95 log cfu/mL) 0.06% bile concentration in artificial intestinal fluid at 0 min, a decrease in viable cell count was observed at 1 and 240 min. The viable cell count of the strain was determined as 5.48 and 4.98 log cfu/mL in the artificial gastric fluid at pH 3 after 60 and 180 minutes, respectively. The strain showed 85% hydrophobicity in hexon solvent, 79% in toluene, and 73% in acetone. The total carbohydrate amount of EPS_{JD2} was determined as 246 mg/L, and its molecular weight was 42,309 kDa. In the study, the prebiotic activity scores of EPS_{JD2} were determined using *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* DSM20246 (2.44 log cfu/mL at 48 hours) and *S. cerevisiae* BU19 (1.17 log cfu/mL at 48 hours). EPS_{JD2} was 4.88% hydrolyzed in gastric juice (pH 3). The metabolic contents of CFS_{JD2} were found to be several types of amino and fatty acids, phenols, vitamins, and sugars. The fermentation capacity on the prebiotic (EPS_{JD2}) of *L. plantarum* subsp. *plantarum* DSM20246 and *S. cerevisiae* BU19 was 6.4 and 7.6 log cfu/mL, respectively. In the study, the antioxidant activities of JD2, CFS_{JD2}, and at different concentrations (0.5, 1, 5, 10 mg/mL) EPS_{JD2}, JD2+EPS_{JD2}, and CFS_{JD2}+EPS_{JD2} applications were determined by three different methods (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil, superoxide anion, and hydroxyl radical scavenging activity). When the results were evaluated in general, the highest antioxidant activity in the DPPH method was 86.6% in the 10 mg/mL CFS_{JD2}+EPS_{JD2} application, while the lowest activity in the superoxide anion radical scavenging activity was 44.2% in 0.5 mg/mL EPS_{JD2}. In all three methods, it was determined that all applications examined in the study were higher than the antioxidant activities of inulin, a commercial prebiotic of herbal origin (p<0.05). Antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* 29212, and *Escherichia coli* ATCC 11229 strains was found more in JD2 than in CFS_{JD2}, while the anti-biofilm activity of prebiotic, symbiotic, and postbiotic+prebiotic application increased as the prebiotic concentration increased. It is thought that the exopolysaccharide obtained from the JD2 strain has the potential to be used as a prebiotic.

Science Code : 20309

Key Words : *Pichia kudriavzevii*, probiotic, prebiotic, exopolysaccharide

Page Number : 182

Supervisor : Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

TEŞEKKÜR

Yüksek doctora öğrenimim süresince ve tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, her türlü araştırma olanağını ve desteğini sağlayan, bana gösterdiği sabır ve anlayışla güzel bir çalışma ortamı sağlayan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ'a, en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Ogr. Gor. Dr. BERAT CINAR-ACAR'a teşekkür ederim. Her zaman yanımda olan annem Prof. Dr, Rajaa Mehdi Ajam'a teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunmak isterim. Ayrıca hayatımda her zaman en büyük yardımcım ve desteğim olan aileme teşekkür ederim ve tez çalışmam boyunca bana destek olan biyoteknoloji laboratuvarındaki çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Jaafar Nozad Aakef AAKEF

13.04.2023

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	5
2.1. Mayalar	5
2.2. Biyotik Ailesi	6
2.2.1. Probiyotikler	7
2.2.2. Prebiyotikler.....	16
2.2.3. Postbiyotikler	38
2.2.4. Sinbiyotik.....	42
3. MATERYAL VE METOT	47
3.1. Kullanılan Maya Suşu	47
3.2. Besiyerleri, Tampon ve Çözeltiler	47
3.3. Kültürün Saklanması.....	48
3.4. <i>P. kudriavzevii</i> JD2 Maya Suşunun Bazı Probiyotik Özellikleri	48
3.4.1. Antikolesterol aktivite.....	48
3.4.2. Yapay mide ve bağırsak sıvılarında canlılık.....	50
3.4.3. Hidrofobisite	51
3.5. Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimi.....	52

Sayfa

3.6. Örneklerin Hazırlanması	53
3.6.1. Probiyotik (JD2)	53
3.6.2. Prebiyotik (EPS _{JD2})	53
3.6.3. Postbiyotik (CFS _{JD2})	55
3.6.4. Sinbiyotik (JD2+EPS _{JD2})	55
3.6.5. Postbiyotik+Prebiyotik (CFS _{JD2} +EPS _{JD2}) uygulama	55
3.7. EPS _{JD2} 'nin Karakterizasyonu	55
3.8. EPS _{JD2} ve İnulinin Prebiyotik Aktivite Skorlarının Belirlenmesi	57
3.9. EPS _{JD2} 'nin Mide Sıvısında Hidrolizi	58
3.10. Postbiyotik (CFS _{JD2}) İçeriğinin Belirlenmesi	60
3.10.1. Şeker	60
3.10.2. Amino asitler	60
3.10.3. Yağ asiti	61
3.10.4. Fenolik bileşikler	63
3.10.5. Vitamin	64
3.11. Laktobasil ve Maya Suşlarının EPS _{JD2} 'yi Fermente Etmesi	65
3.12. Prebiyotik (EPS _{JD2}), Postbiyotik (CFS _{JD2}) ve Ticari İnulinin Bakteri (LGD) ve Maya (MGD) Gelişimini Düzenleyici Etkisi	66
3.13. Probiyotik (JD2), Prebiyotik (EPS _{JD2}), Postbiyotik (CFS _{JD2}), Sinbiyotik (JD2+EPS _{JD2}) ve Postbiyotik+Prebiyotik (CFS _{JD2} +EPS _{JD2}) Uygulamanın Bazı Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi	67
3.13.1. Antioksidan aktivite	67
3.13.2. Antibiyofilm aktivite	69
3.14. İstatiksel Analizler	70
4. DENEYSEL BULGULAR	71
4.1. <i>P. kudriavzevii</i> JD2 Maya Suşunun Bazı Probiyotik Özellikleri	71
4.1.1. Antikolesterol aktivite	71
4.1.2. Yapay mide ve bağırsak sıvılarında canlılık	72
4.1.3. Hidrofobosite	76

	Sayfa
4.2. Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimi.....	76
4.3. EPS _{JD2} 'nin Karakterizasyonu.....	77
4.4. EPS _{JD2} ve İnulinin Prebiyotik Aktivite Skorlarının Belirlenmesi.....	81
4.5. EPS _{JD2} 'nin Mide Sıvısında Hidrolizi	81
4.6. Postbiyotik İçeriği	82
4.7. Laktobasil ve Maya Suşlarının EPS _{JD2} ve İnulin'i Fermente Etmesi.....	83
4.8. Prebiyotik (EPS _{JD2}), Postbiyotik (CFS _{JD2}) ve Ticari İnülinin Bakteri (LGD) ve Maya (MGD) Gelişimini Düzenleyici Etkisi	85
4.9. Probiyotik (JD2), Prebiyotik (EPS _{JD2}), Postbiyotik (CFS _{JD2}), Sinbiyotik (JD2+EPS _{JD2}) ve Postbiyotik+Prebiyotik (CFS _{JD2} +EPS _{JD2}) Uygulamanın Bazı Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi	89
4.9.1. Antioksidan aktivite.....	89
4.9.2. Antibiyofilm aktivite.....	97
5. TARTIŞMA	103
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	131
KAYNAKLAR	135
EKLER.....	173
EK-1. EPS _{JD2} 'lerin HPLC analiz sonuçları.....	174
EK-2. EPS _{JD2} 'lerin GC analiz sonuçları	176
EK-3. EPS _{JD2} 'lerin LC-MS MS, Tandem Kütle Spektrometrisi ile Sıvı Kromatografisi	177
EK-4. EPS _{JD2} 'lerin SEC analiz sonuçları	180
ÖZGEÇMİŞ	181

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Prebiyotik içeren en iyi 10 gıda	20
Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan bakteriler ve suş kodları.....	47
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri, tampon ve çözeltilerin içerikleri	48
Çizelge 3.3. Amino asitler ve konsantrasyonları	61
Çizelge 3.4. Yağ asitleri.....	63
Çizelge 3.5. Fenolik bileşikler ve konsantrasyonları	64
Çizelge 3.6. Yağda ve suda çözünür vitaminler ve konsantrasyonları	65
Çizelge 4.1. <i>P. kudriavzevii</i> JD2 suşunun 100 µg/mL kolesterol varlığında safrasız, %0,2, %0,4 ve %0,6 safra tuzları içeren YPD besiyerinde kolesterol presipitasyonu ve giderimi.....	71
Çizelge 4.2. <i>P. kudriavzevii</i> JD2 suşunun 10 mg/mL EPS _{JD2} ve 100 µg/mL kolesterol varlığında safrasız, %0,2, %0,4 ve %0,6 safra tuzları içeren YPD besiyerinde kolesterol presipitasyonu ve giderimi	72
Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlarda safra ve pH 3 içeren bağırsak sıvısında <i>P. kudriavzeii</i> JD2 mayasının canlı hücre sayısı ve % canlılığı.....	73
Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyonlarda safra ve pH 3 içeren bağırsak sıvısında <i>P. kudriavzeii</i> JD2 mayasının canlı hücre sayısı ve % canlılığı.....	75
Çizelge 4.5. EPS _{JD2} 'nin boyut dışlama kromatografi sonuçları.....	80
Çizelge 4.6. EPS _{JD} ve inülinin prebiyotik aktivite skoru (log kob/mL).....	81
Çizelge 4.7. EPS _{JD2} ve inülinin farklı pH'daki mide sıvısında farklı inkübasyon sürelerindeki % hidrolizi.....	82
Çizelge 4.8. CFS _{JD2} 'nin metabolit içerikleri	86
Çizelge 4.9. <i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> DSM20246 suşunun farklı besiyerlerindeki canlılık sayıları (log kob/mL)	85
Çizelge 4.10. <i>S. cerevisiae</i> BU19 farklı besiyerlerindeki canlılık sayıları (log kob/mL)	85
Çizelge 4.11. Postbiyotik (CFS _{JD2}), Prebiyotik (EPS _{JD2}) ve ticari inülinin laktobasil gelişimini düzenleyici etkisi	89
Çizelge 4.12. CFS _{JD2} , EPS _{JD2} ve ticari inülinin maya gelişimini düzenleyici etkisi	90

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.13. Probiyotik (JD2), postbiyotik (CFS _{JD2}) ve farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 5, 10 mg/mL) prebiyotik (EPS _{JD2}), sinbiyotik (JD2+EPS _{JD2}), postbiyotik+prebiyotik (CFS _{JD2} +EPS _{JD2}) uygulamanın antioksidan aktiviteleri (%).....	93
Çizelge 4.14. Farklı konsantrasyonlarda inülin ve askorbik asidin antioksidan aktivitesi (%).....	94
Çizelge 4.15. Probiyotik (JD2), postbiyotik (CFS _{JD2}) ve farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 5, 10 mg/mL) prebiyotik (EPS _{JD2}), sinbiyotik (JD2+EPS _{JD2}), postbiyotik+prebiyotik (CFS _{JD2} +EPS _{JD2}) uygulamanın biyofilm inhibisyonu (%)	101
Çizelge 4.16. Farklı konsantrasyonlarda inülinin % biyofilm inhibisyonu	100

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Probiyotiklerin, prebiyotiklerin, sinbiyotiklerin ve postbiyotiklerin tanımı	6
Şekil 2.2. Takviye edici gıdalarda kullanılan yaygın probiyotik mikroorganizmalar ..	7
Şekil 2.3. Yiyecek ve içeceklerde uygulama için probiyotiklerin güvenlik değerlendirmesi için genel prosedür.....	8
Şekil 2.4. <i>Pichia kudriavzeii</i>	11
Şekil 2.5. Ksilozun fermentasyonu	12
Şekil 2.6. Prebiyotiklerin etki mekanizması	19
Şekil 2.7. Farklı prebiyotik ailelerinin kimyasal yapıları. (FOS: frukto-oligosakkaritler, GLOS: gluko-oligosakkaritler, GOS: galakto-oligosakkaritler, HMO: insan sütü oligosakkaritler, IMO: izomalto-oligosakkaritler).....	21
Şekil 2.8. Prebiyotiklerin olası sağlık yararı.....	23
Şekil 2.9. Ekzopolisakkarit türleri	25
Şekil 2.10. EPS üretmek için sentez yolu	28
Şekil 2.11. EPS'nin biyolojik aktiviteleri.....	31
Şekil 2.12. Biyofilmin oluşumu	33
Şekil 2.13. Postbiyotikler sınıflandırmanın şematik gösterimi.....	39
Şekil 2.14. Sinbiyotiklerin etki mekanizması	44
Şekil 3.1. Kolesterol standart eğrisi	50
Şekil 3.2. Glikoz standart grafiği.....	53
Şekil 3.3. Dekstran standartları kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiği.....	56
Şekil 3.4. DNS metodu için hazırlanan glukoz standardı	59
Şekil 4.1. <i>P. kudriavzeii</i> JD2 suşunun farklı pH'larda 60 ve 180 dakikada % canlılığı.....	74
Şekil 4.2. <i>P. kudriavzeii</i> JD2 suşu farklı safra konsantrasyondaki yapay bağırsak sıvısında canlılıkları.....	75
Şekil 4.3. <i>P. kudriavzeii</i> JD2 maya suşunun hidrokarbonlara karşı hidrofobisitesi (%).....	76

Şekil	Sayfa
Şekil 4.4. ^1H -NMR spektrumunda, <i>P. kudriavzevii</i> suşu JD2'den izole edilen EPS _{JD2} 'lerin glukoz yapısındaki hidrojen kimyasal kayma değerleri.....	78
Şekil 4.5. EPS'nin NMR spektrumu, ^{13}C -NMR spektrumu.....	79
Şekil 4.6. EPS'nin nükleer overhauser etkisi spektroskopisi (NOESY).....	80
Şekil 4.7. Probiyotik (JD2) ve postbiyotik (CFS _{JD2}) uygulamalarda DPPH radikalini giderme	93
Şekil 4.8. Prebiyotiklerin, sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamalarda DPPH radikalini giderme	94
Şekil 4.9. Probiyotik (JD2) ve postbiyotik (CFS _{JD2}) uygulamalarda süperoksit anyon radikali süpürücü aktivite	95
Şekil 4.10. Prebiyotiklerin, sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamalarda süperoksit anyon radikali süpürücü aktivite	95
Şekil 4.11. Probiyotik (JD2) ve postbiyotik (CFS _{JD2}) uygulamalarda hidroksil radikali süpürücü aktivite	96
Şekil 4.12. Prebiyotik, sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamalarda hidroksil radikal süpürücü aktivitesi.....	97
Şekil 4.13. Probiyotik ve postbiyotik (CFS _{JD2}) uygulamaların % biyofilm inhibisyonu	100
Şekil 4.14. Prebiyotik (EPS _{JD2}), sinbiyotik (JD2+EPS _{JD2}) ve postbiyotik (CFS _{JD2} +EPS _{JD2}) uygulamaların % biyofilm inhibisyonu <i>P. kudriavzeii</i> JD2, EPS _{JD2} 'lerin, sinbiyotik ve (CFS _{JD2} +EPS _{JD2}) % biyofilm inhibisyonu	101

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Çalışmada kullanılan liyofilizatör cihazı (CHRIST alpha 2-4 LD plus).....	54
Resim 3.2. HPLC, yüksek performanslı sıvı kromatografisi, shimadzu prominence serisi HPLC-20A, Japonya	60
Resim 3.3. GC-MS, gaz kromatografisi-kütle spektrometresi, shimadzu GC-MS QP2020, Japonya	62
Resim 3.4. LC-MS MS, Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry, Shimadzu LC-MS 8045, Japonya	65
Resim 3.5. McFarland densitometre cihazı.....	70
Resim 4.1. <i>P. kudriavzevii</i> JD2'den elde edilen ekzopolisakkaritin (EPS _{JD2}) liyofilizasyon sonrası görüntüsü	77
Resim 4.2. Probiyotik <i>P. kudriavzevii</i> JD2'nin DPPH radikali giderim etkisi (0: Kontrol grubu, Boş PBS ve DPPH çözeltisi, 1: <i>P. kudriavzeii</i> JD2).....	90

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılan simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
BL	Bakteriyel lizatlar
BSH	Bili salt hidrolazı
CFS	Hücre içermeyen süpernatantlar
Cfu	Koloni Oluşturan Birim
CSH	Hücre yüzeyi hidrofobikliği
CWF	Hücre duvarı parçaları
dk.	Dakika
DNS	Dinitrosalisilik asit
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
ECM	Hücre dışı matris
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
EPS	Ekzopolisakkarit
EPS _{JD2}	Liyofilize Ekzopolisakkarit of <i>Pichia kudriavzevii</i> JD2
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FOS	Frukto-oligosakkarit
FT-IR	Fourier transform kızılötesi
g	Gram
GİS	Gastrointestinal sistem
GlcA	Glukuronik asit
GlcNAc	N-asetilglukosamin
GOS	Galakto-oligosakkarit
GRAS	Türlerinin genel olarak güvenli
HePS	Heteropolisakkarit
HoPS	Homopolisakkarit
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IMOS	İ zomalto-oligosakkaritler

Simgeler	Açıklamalar
ISAPP	Uluslararası Bilimsel Probiyotikler ve Prebiyotikler Birliği
L	Litre
LAB	Laktik asit bakterisi
LAM	Kovalent olmayan polisakkaritler
LGD	Laktobasil Gelişimini Düzenleyici
LPS	Lipopolisakkaritler
M	Molar
M9	Minimal besiyeri
MAMP	Mikropla ilişkili moleküler model
mg	Miligram
MGD	Maya Gelişimini Düzenleyici
mL	Mililitre
MRS	De Man, Rogosa and Sharpe
MurNAc	N-asetilmuramik asit
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
NDP -şekerler	Nükleosit difosfat şekerler
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
OD	Optik Yoğunluk
PAS	prebiyotik aktivite skoru
PBS	Tuzlu Fosfat Tamponu
pH	Asitlik bazlık birimi
POS	Pektik-oligosakkaritler
ppm	Milyonda Bir
PRR	örüntü tanıma reseptörü
QPS	Nitelikli güvenlik varsayımı
RNS	Reaktif nitrojen türlerini
ROS	Reaktif oksijen türleri
rpm	Dakikada Devir Sayısı
RS	Dirençli nişasta
SCFA	Kısa zincirli yağ asitleri
SD	Standart Sapma
SEC	Boyut Eleme Kromatografisi

Simgeler	Açıklamalar
SF	Serum Fizyolojik
sp.	Tür
spp.	Türler
subsp.	Alttür
TCA	Trikloroasetik asit
TLC	İnce tabaka kromatografisi
TOS	Trans-galakto-oligosakkaritler
XOS	ksil-oligosakkaritler
YPD	Maya Ekstrakt-Pepton-Dekstroz
α	Alfa
β	Beta
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre

1. GİRİŞ

Fermantasyon, gıda işleme ve muhafaza için kullanılan en eski teknolojilerden biridir. Gıda lezzetini arttırdığı, faydalı enzimler, vitaminler, amino asitler ve anti-mikrobiyal ürünler ürettiği bulunmuştur (Vlasova vd, 2016; Voidarou vd, 2021). Fermantasyon sürecinin ayrılmaz parçaları, yaygın olarak probiyotikler olarak adlandırılan patojenik olmayan, faydalı mikroorganizmalardır (Kalui ve diğerleri, 2008). Geleneksel fermente gıda ve içeceklerle ilişkili iki ana mikroorganizma türü mayalar ve bakterilerdir. Mayalar, gıda güvenliği ve organoleptik özellikler üzerinde önemli bir etkiye sahip olup, farklı gıda sınıflarında bulunur (FAO ve WHO, 2001; Chelliah ve diğerleri, 2016). *Saccharomyces cerevisiae* var *boulardii*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Hanseniaspora* ve *Metschnikowia* cinslerine ait mayaların probiyotik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Smith vd, 2015; Tamang ve Lama, 2022).

2001 yılında FAO/WHO tarafından yapılan probiyotik tanımı Hill ve diğerleri (2014) tarafından “yeterli miktarlarda uygulandığında konakçıya sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalar” olarak yenilenmiştir. Mayaların probiyotik ve besin takviyesi olarak kullanımı büyük önem kazanmıştır (Bekatorou vd., 2006). Maya probiyotiklerinin, bağışıklık düzenleyici özellikleriyle birlikte bağırsak bozukluklarını önleme ve tedavi etme yetenekleri gibi birincil yararlı etkileri bulunmaktadır (Moslehi ve diğerleri, 2010). *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar, maya probiyotiklerin antioksidan üretimi ve kan kolesterol seviyesini düşürme gibi vücut üzerinde faydalı fizyolojik etkileri olabileceğini göstermiştir (Kumar vd., 2012; Plessas vd., 2012). *S. boulardii* probiyotiği en çok kolonda aktiftir ve kolona gelene kadar gastrointestinal sistemde canlı kaldığı bildirilmiştir (Kelesidis ve Pothoulakis, 2012). Bu nedenle, bu maya probiyotiği, inflamatuvar bağırsak bozukluklarının ve her türlü gastroenteritin tedavisi için insan tüketimine uygun olduğu gösterilmiştir (Palma ve diğerleri, 2015; Oliveira ve diğerleri, 2017). *Saccharomyces* suşları için optimal büyüme sıcaklığı 22°C ila 30°C arasındadır. Ancak insan vücudunda *S. boulardii* 37°C'ye kadar canlı kalabilmektedir. Mide asidine ve bağırsak safrasına karşı direnci nedeniyle, *S. boulardii*'nin bağırsak yolunda antibiyotiklerin ve proteolizin etkilerinden kurtulması ve sonuçta bağırsak iltihaplarını iyileştirmesi oldukça olasıdır. *Pichia kudriavzevii* bitkisel ürünlerde bulunmasına rağmen bir gıda bozulma türü olarak kabul edilmemiştir (Kurtzman ve diğerleri, 2011b). *P. kudriavzevii*, birçok patojenik mikroorganizmayı öldürebilen ve böylece gıdaların korunmasına katkıda bulunabilen toksin üretme yeteneğine sahiptir (Bajaj vd., 2013). Bu organizma ayrıca kolesterolü asimile etme kabiliyeti nedeniyle

potansiyel bir probiyotik olarak kabul edilmiştir (Psomas ve diğerleri, 2003). Mayalar tarafından fermentasyon sırasında üretilen birçok metabolit, antioksidan aktiviteye sahiptir (Abbas, 2006). Gelişmiş sağlık ve zindelik için endojen antioksidan kompleksi tamamlayan güvenli ve doğal kaynaklardır. Kandaki yüksek kolesterol seviyesi olan hiperkolesterolemi, kalp krizi insidansına %45'e kadar katkıda bulunan kardiyovasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörüdür (Kumar ve ark. 2012; Bianconia vd, 2021).

Probiyotik mikroorganizmalar içeren fonksiyonel gıdaların üretimine yönelik çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. Probiyotiklerin konakçıdaki sağlık yararlarından sorumlu olduğu bildirilmiştir. Bu yararların enterik patojenlere karşı direnç katkısı, kolon kanserinin önemli etkileri (antimutajenik etki, bağışıklık sisteminin uyarılması), ince bağırsakta aşırı bakteri üremesinin önlenmesi, ishal ve kabızlığın önlenmesi ve tedavisi, bağışıklık sisteminin modülasyonu, antihipertansiyon olduğu bildirilmiştir. Probiyotik mikroorganizmaların ürogenital enfeksiyonların önlenmesinde, *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun önlenmesine ve tedavisinde, alerjinin önlenmesinde, hepatik ensefalopatinin önlenmesinde, meme kanserinin önlenmesinde, bağırsak histolojisinin gelişmesinde ve azaltılmasında katkı sağlamaktadır (Sharifi-Rad, vd., 2020; Das, vd., 2022; Rueda-Robles, vd., 2022). Maya probiyotiklerinin önemli bir avantajı, gastrointestinal enzimlere, safra tuzlarına, pH değişimlerine, organik asitlere ve sıcaklık değişimlerine karşı oldukça dirençli olmalarıdır. Probiyotik mayalar, bağırsak yolu ile mukozaya tutunarak istenmeyen patojenlerin ve diğer bakterilerin mukozaya yapışmasını engellerler. Ayrıca, çoğalma yetenekleri ile fonksiyonel gıdalarda lezzet gelişimine olumlu etki yapmaktadırlar (Carlos vd., 2010).

Probiyotik organizmaların fonksiyonel rollerini karakterize etmek, mukozal ve epitel hücrelerinin yapışması ve kolonizasyonu (Gorbach, 2002), asit ve safra tuzu toleransı (Mainville vd., 2005; Ragavan ve Das, 2019), proteoliz (Kosin ve Rakshit, 2006) ve probiyotik stabilite ve canlılık hayati olarak kabul edilmektedir. Ayrıca, adezyon gastrointestinal kolonizasyon için önemli bir ön koşul olduğundan ve probiyotik organizmaların fonksiyonel rollerini kolaylaştırdığından, organizmalar bağırsağa yapışma, çoğalma ve kolonize etme yeteneğine sahipse probiyotiklerin arzu edilen etkilerinin artacağını belirtmek önemlidir (Romero, 2018).

Prebiyotikler, bağırsak mikrobiyotası tarafından parçalanan bir besin grubudur. İnsan genel sağlığı ile ilişkileri son yıllarda artan bir ilgi alanı olmuştur. Bağırsak mikrobiyotasını

besleyebilirler (Davani-Davari vd., 2019). Fruktoligosakkaritler ve galaktooligosakkaritler, insan sağlığı üzerinde faydalı etkileri olan iki önemli prebiyotik grubudur. Düşük miktarlarda fruktooligosakkaritler ve galaktooligosakkaritler gıdalarda doğal olarak bulunduğundan, bilim insanları endüstriyel ölçekte prebiyotikler üretmeye çalışmaktadırlar. Prebiyotiklerin sağlık yararları ve güvenliklerinin yanı sıra probiyotiklere kıyasla üretim ve depolama avantajları göz önüne alındığında, probiyotiklerin yerine veya probiyotiklerle birlikte insan sağlığı durumunu geliştirmek için önemli adaylar gibi görünmektedirler (Stinson ve diğlerleri, 2017). Prebiyotikler, iyi bağırsak bakterilerini beslemeye ek olarak, kalsiyumu emmeye yardımcı olabilir, gıdaların kan şekerinde ani yükselmelere neden olma oranını değiştirebilir, gıdaların daha hızlı fermente edilmesini sağlayabilir (den Besten ve diğlerleri, 2013). Yeni araştırmalar, prebiyotiklerin irritabl bağırsak sendromu gibi bağırsak hastalıklarını yönetmeye yardımcı olup olamayacağını ve obezitenin kontrolünde nasıl bir rol oynayabileceklerini araştırılmaktadır (Aoun ve diğlerleri, 2020). Ekzopolisakkaritlerin (EPS'ler), bakterilerin epitel yüzeylere yapışmasında, otoagregasyonunda ve pıhtılaşmasında etkili olduğu belirtilmektedir. EPS üreten mikroorganizmaların mide-bağırsak yolunda maruz kaldıkları asit ve safraya karşı yüksek direnç gösterdiği ve bu direnci tetikleyen faktörün özel bir protein olabileceği bildirilmiştir. Mikroorganizmaların çevrelerine salgıladıkları EPS, hücreleri kuruma, fagositoz ve faj etkisinden korur, yüksek oksijen gerilimi sağlar, hücreleri antibiyotiklere ve toksik maddelere (toksik metal iyonları, kükürt dioksit, etanol gibi) ve yüzeye karşı korur (Gientka vd., 2015).

Postbiyotikler hem prebiyotiklerden hem de probiyotiklerden çok daha az bilinmektedir, ancak son araştırmalar, sağlığın korunmasında ve iyileştirilmesinde daha önemli olmasa da eşit derecede önemli bir role sahip olduklarını göstermektedir. Aslında, prebiyotiklere atfedilen sağlık yararlarının çoğu, gerçekten de postbiyotiklerden kaynaklanıyor olabilir (Smith, 2021). Postbiyotikler, bağırsakta probiyotikler tarafından gerçekleştirilen fermentasyon sürecinin yan ürünleridir. Yani probiyotikler prebiyotiklerle beslendikçe postbiyotikler üretilmektedir. Bunlar temel olarak probiyotiklerin "atıkları" olarak adlandırılmaktadırlar (Salminen ve diğlerleri, 2021). Sinbiyotikler ise probiyotikleri ve prebiyotikleri bir sinerjizm biçiminde birleştiren gıda bileşenleri veya diyet takviyeleri anlamına gelmektedir (Pandey vd., 2015). Sinbiyotik ilk olarak "bir veya sınırlı sayıda canlının metabolizmasını aktive ederek ve/veya büyümeyi seçici olarak uyarak gastrointestinal kanalda canlı mikrobiyal diyet takviyelerinin hayatta kalmasını ve

implantasyonunu geliştirerek konakçıyı faydalı bir şekilde etkileyen probiyotik ve prebiyotik karışımları” olarak tanımlanmıştır (Dos Passos vd, 2021).

Bu tez çalışmasında, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan, hurmadan izole edilen ve daha önce Aakef’in (2018) Yüksek Lisans tezinde yaptığı çalışmalarda probiyotik özellikleriyle (Ekzopolisakkarit üretimi, asit ve safra dirençlilikleri, otoagregasyon, koagregasyon, hidrofobosite ve antimikrobiyal aktivite) öne çıkmış *Pichia kudriavzevii* JD2 maya suşu kullanılacaktır. Tez kapsamında;

1. *P. kudriavzevii* JD2 maya suşunun anti-kolesterol aktiviteleri, hidrofobisitesi, yapay mide ve bağırsak sıvısında canlılıkları gibi bazı probiyotik özelliklerinin tespit edilmesi,
2. *P. kudriavzevii* JD2 maya suşundan elde edilen EPS’nin (EPS_{JD2}) izole edilerek HPLC, NMR ve SEC ile karakterize edilmesi,
3. *P. kudriavzevii* JD2 maya suşundan elde edilen EPS’nin (EPS_{JD2}) ve inulinin prebiyotik aktivite skorlarının tespit edilmesi,
4. *P. kudriavzevii* JD2 maya suşundan elde edilen EPS’nin (EPS_{JD2}) ve inulinin farklı pH’daki mide sıvısında yüzde hidrolizinin belirlenmesi,
5. *P. kudriavzevii* JD2 maya suşundan postbiyotiğin (CFS_{JD2}) elde edilmesi ve HPLC ve GC-MS ve LC-MS MS ile içeriğinin belirlenmesi,
6. *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* DSM20246 bakterisinin ve *Saccharomyces cerevisiae* BU19 mayasının EPS_{JD2} ve inulini fermente edilebilme kapasitesi,
7. Prebiyotik (EPS_{JD2}) ve postbiyotiğin (CFS_{JD2}) *L. plantarum* subsp. *plantarum* DSM20246 suşunun (LGD) ve *S. cerevisiae* BU19 maya suşunun gelişimini düzenleyici (MGD) etkilerinin belirlenmesi ve ticari olarak kullanılan inülin prebiyotiği ile karşılaştırılması,
8. Probiyotik (JD2), prebiyotik (EPS_{JD2}), postbiyotik (CFS_{JD2}), sinbiyotik (JD2+EPS_{JD2}) ve postbiyotik+prebiyotik (CFS_{JD2}+EPS_{JD2}) uygulamanın bazı biyolojik (antioksidan ve antibiyofilm) aktivitelerinin belirlenmesi ve bu sonuçların ticari olarak kullanılan inülin prebiyotiği ile mukayese edilmesi hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Mayalar

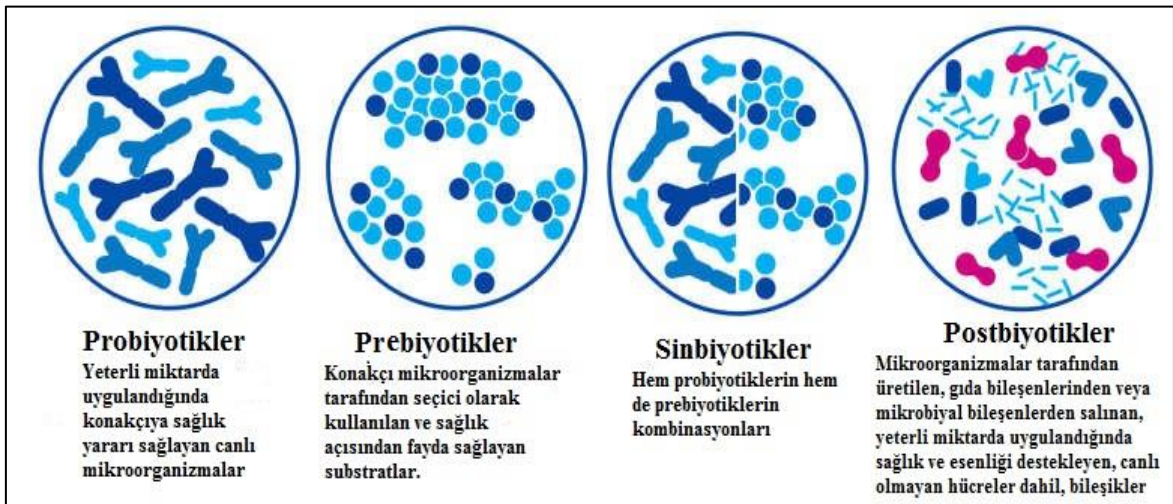
Mayalar, insanların normal mikrobiyal florası dahil olmak üzere doğal ortamlarda, bitkilerde, havadaki partiküllerde, suda, gıda ürünlerinde ve diğer birçok ekolojik habitata yaygın olan ökaryotik mikroorganizmalardır. Mayalar, besin açısından birçok karmaşık ekosistemde önemlidir. Simbiyoz, parazitlik ve rekabet dâhil olmak üzere diğer mikroorganizmalarla birçok etkileşimde bulunurlar. Ayrıca hem aseksüel hem de cinsel durumlar sergilerler (Kurtzman ve diğerleri, 2011a, b). Heterojen bir mikroorganizma grubunu oluşturmaktadırlar. Mayaların sayısız ve çeşitli biyolojik aktiviteleri ile gıda endüstrisinde geniş bir uygulama alanları vardır. Fermente gıdalarda tad gelişimine önemli katkılarına ek olarak, istenmeyen bakterilere ve funguslara karşı antagonistik aktiviteleri de bilinmektedir. Bu aktiviteler, besin maddelerine rekabet, büyüme ortamlarının asitlenmesi, yüksek etanol konsantrasyonlarına toleransları ve antifungal öldürücü toksinler ve/veya antibakteriyel bileşikler gibi antimikrobiyal bileşiklerin salınması ile ilişkilidir (Banik ve diğerleri, 2019).

Probiyotik içeren gıdaların tasarımı öncelikle *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium*'a odaklanmış olsa da *Saccharomyces cerevisiae* var *boulardii* mayasının gastroenterit tedavisinde etkili olduğu uzun yıllardan beri bilinmektedir (Hatoum ve diğerleri, 2012). Mayalar, fermente gıda ve içecek üretimindeki rollerine ek olarak, hayvan besleme ve veterinerlik uygulamalarının yanı sıra, tıp ve biyomedikal ve ilaç endüstrilerinde çeşitli rollere sahiptirler (Hibbett ve diğerleri, 2007).

Mayanın inhibitör aktivitesi ilk olarak Hayduck (1909) tarafından keşfedilmiştir. Diğer araştırmacılar, mayaların diğer mayalara karşı öldürücü toksinler olarak bilinen ikincil metabolitlerin üretimini içeren antagonistik etkisini bildirmişlerdir (Suzuki ve diğerleri, 2001; Marquina ve diğerleri, 2002). Viljoen (2006), mayaların fermente gıda ve içeceklerdeki antimikrobiyal, antibiyofilm, antioksidan ve antikanser etkilerinin organik asitler, uçucu asitler, hidrojen peroksit ve çeşitli diğer substratların etkilerinden kaynaklandığını bildirmiştir.

2.2. Biyotik Ailesi

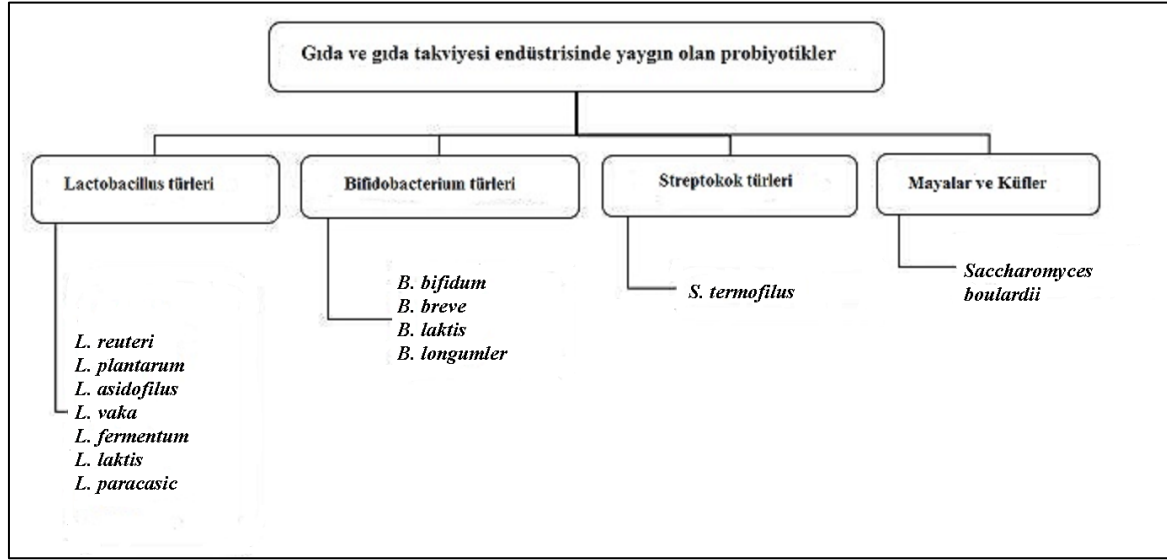
Biyotikler, "tüketildiğinde konakçıya bir sağlık yararı sağlayabilen, besleyici olarak aktif bileşenlerdir." Bu nedenle "Biyotik aile" sağlık, beslenme ve gıda teknolojisi alanlarında son zamanlarda ortaya çıkan bir dizi terimi ifade etmektedir (Mohr vd., 2020; Vinderola ve Burns, 2021). Küresel olarak, metabolik hastalıklar önemli bir halk sağlığı tehdididir. Bu hastalıkların etiopatogenezi ile risk faktörleri arasındaki nedensel ilişkiyi doğrulayan birçok çalışma vardır. Buna rağmen, beden eğitimi ve diyet gibi geleneksel terapötik yönetim yöntemlerinin yetersiz olduğu kanıtlanmıştır. Son zamanlarda araştırmacılar, bağırsak mikrobiyotasının dahil olması gibi metabolik hastalıkların patofizyolojik değişkenliğini açıklamaya yönelik diğer potansiyel yollara odaklanmışlardır (Gurung vd., 2020; Palade ve diğerleri, 2022). Bağırsak mikrobiyotası ile metabolik hastalıkların patogenezi arasındaki ilişki göz önüne alındığında, prebiyotikler (laktöz, soya oligosakkaritleri, galaktooligosakkaritler, inülin), probiyotikler (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus* cinsleri), hem ayrı ayrı hem de birlikte sinbiyotik olarak veya postbiyotikler (hücresiz süpernatantlar, hücre duvarı parçaları, kısa zincirli yağ asitleri) gibi "biyotik aile" kullanılarak bağırsak mikroflorasının bileşimini değiştirmek için çeşitli terapötik stratejiler geliştirilmiştir (Liu, ve diğerleri, 2021) (Şekil 2.1). Biyotik ailesinin bağırsak mikrobiyotasının bileşimi üzerindeki doğrudan etkisi nedeniyle, metabolik hastalıkların evriminde olumlu sonuçlar göstermiştir (Palade ve ark., 2022).



Şekil 2.1. Probiyotiklerin, prebiyotiklerin, sinbiyotiklerin ve postbiyotiklerin tanımı (Salminen ve diğerleri, 2020)

2.2.1. Probiyotikler

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) 100'den fazla mikroorganizmayı güvenli olarak (probiyotik) değerlendirmiş ve bunların yem ve gıda katkı maddesi olarak kullanılmasına izin vermiştir (Kum ve Sekkin, 2012). Bugün en güncel ve kapsamlı probiyotik listesi Avrupa Birliği Komisyonu tarafından 2017 yılında yayımlanmıştır. Probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmalar Şekil 2.2'te verilmiştir.



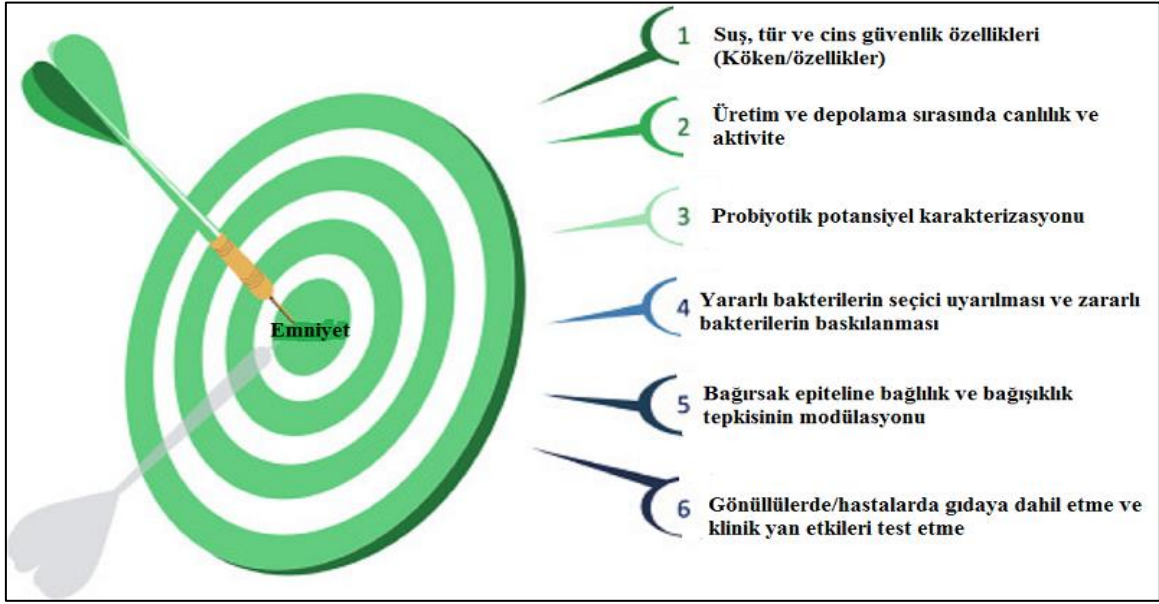
Şekil 2.2. Takviye edici gıdalarda kullanılan yaygın probiyotik mikroorganizmalar (Peivasteh-Roudsari vd. 2019)

Probiyotiklerin fonksiyonel ve teknolojik özellikler olmak üzere iki gruba ayrılan özellikleri sayesinde güvenli olarak kabul edilmişlerdir (Jach, 2013; McFarland, 2015).

Fonksiyonel Özellikler: Hedef organa ulaşma sırasında canlı kalabilme yeteneği, konakçı organizmanın organları ile etkileşimi, antipatojenik özellikler ve güvenlik değerlendirmesi gibi dört ana özellikleri kapsamaktadır. Çoğu probiyotik, hedef organ olarak bağırsak yoluna ulaşmak için ağızdan alınır. Bu nedenle, ağızdan bağırsak yoluna geçişte hayatta kalmalıdır. Bu, potansiyel probiyotik suşların bağırsak yolu içindeki çevresel koşullara (sindirim enzimleri, mide ve safra tuzları, konakçının pH ve vücut sıcaklığı), mukozal yüzeyleri kolonize etme yeteneği ve bağırsak mikrobiyotasına dayanma kabiliyeti açısından taranması anlamına gelmektedir. Yüzey hidrofobikliği ve antibiyotik direncide önem taşımaktadır (McFarland, 2015). Probiyotik toksin üretmemeli, patojen olmamalı veya tehlikeli metabolik aktivitelere sahip olmamalıdır. Ayrıca, üretim sürecinde canlılığını

koruyabilmelidir (Žuntar vd, 2020). Şekil 2.3'te yiyecek ve içeceklerde uygulama için probiyotiklerin güvenlik değerlendirmesi için genel prosedür verilmiştir.

Teknolojik Özellikler: Yüksek miktarlarda biyokütleyi kolayca üretme yeteneği, son üründe yüksek raf ömrü ve liyofilizasyon gibi muhafaza prosedürlerine karşı direnç, genetik stabilite ve son ürünlerin organoleptik özelliklerinde bozulma olmaması gibi dört grup altında toplanmıştır (Libudzisz, 2002; Jach, 2013).



Şekil 2.3. Yiyecek ve içeceklerde uygulama için probiyotiklerin güvenlik değerlendirmesi için genel prosedür (Koirala ve Anal, 2021)

Probiyotikler, besin substratlarının üretimi veya rekabeti ile bağırsak mikrobiyotasının kompozisyonunu ve işlevini değiştirebilir. Bakteriyosin üretiminin, ilişkili antimikrobiyal aktivitelerinin bir sonucu olarak karmaşık mikrobiyal ortamlarda rekabet avantajı sağladığı bildirilmiştir (O'Shea ve diğerleri, 2012).

Saccharomyces cinsi en çok çalışılan cinstir ve bu cinsin yaklaşık yirmi türünün çoğu, kimyasalların sürdürülebilir üretimi, farmasötikler, vitamin üretimi, rekombinant proteinlerin sentezi, nutrasötikler gibi önemli biyoteknolojik ilgiye sahiptir (Wagner ve Alper, 2016). Meyve ve sebzeler, fermente edilmiş yiyecek ve içecekler, endüstriyel süt atıkları ve insan dışkıları gibi çeşitli ürün ve ortamlardan izole edilen *Saccharomyces* olmayan mayaların probiyotik adayları olduğuna dair çalışmalar yapılmaktadır (Ceugniez vd, 2017; Shruthi vd, 2022). *Saccharomyces* cinsi olmayan probiyotik maya cinslerinin esas olarak; *Debaryomyces*, *Torulaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Meyerozyma*,

Cryptococcus ve *Candida* olduğu rapor edilmiştir (Kandasamy ve diğerleri, 2018). *Kluyveromyces* ve *Pichia* türlerinin “gıda katkı maddesi” olarak kullanılabilecek genel olarak güvenli (GRAS) olarak bildirilmişlerdir (Greppi ve diğerleri, 2017).

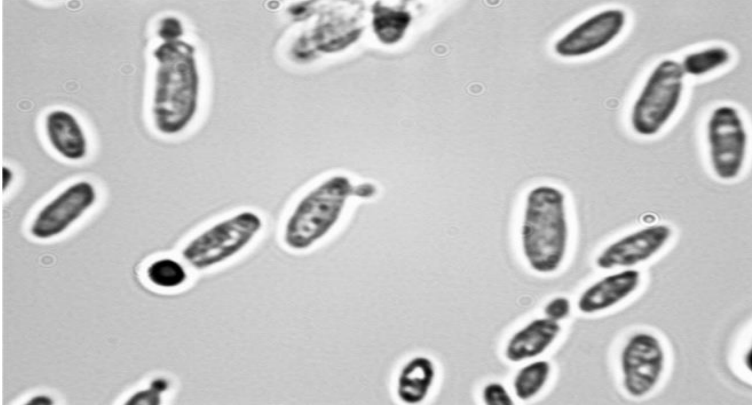
Probiyotik mayalar antifungal, antibakteriyel ve antiinflamatuvar özelliklere sahiptir (Şanlıdere vd., 2016). Çalışmalara göre *Kluyveromyces marxianus* ve *Pichia kudriavzevii*'nin kolesterol seviyesini düşürebildiği (Xie vd., 2015), bunun sonucunda lokal ve sistemik inflamasyonu azaltan proinflamatuvar sitokinlerin üretimini sağladıkları (Pacini ve Ruggiero, 2017), ayrıca, antioksidan aktiviteye de sahip oldukları açıklanmıştır (Ogunremi ve Agrawal, 2015). Oliveira ve arkadaşları tarafından 2017 yılında elde edilen sonuçlar, fermente sofralık zeytinlerden izole edilen *Pichia guilliermondii* 25A ve *Candida norvegica* 7A gibi bazı mayaların, simüle edilmiş sindirim sistemi koşullarına *S. cerevisiae* var *boulardi*'inkine benzer düzeyde direnç göstermeleri nedeniyle probiyotik potansiyele sahip olduğunu göstermişlerdir. Rodríguez ve diğerleri, (2018) farklı kaynaklardan izole edilen 108 maya suşundan *Hanseniaspora osmophila* ve *P. kudriavzevii* türlerine ait iki mayanın probiyotik olarak umut verici suşlar olduğunu bildirmişlerdir. Maya hücre duvarı şeker bileşiminin, özellikle β -glukan (maya hücre duvarının ara tabakasından türetilen polisakkarit) bileşeninin, anti-enfektif ve antitümör tedavisinde uygulanmalarına izin veren immünomodülatör özellikleri rapor edilmiştir. Ayrıca, polisakkaritlerin antioksidanlar, antimutajenler ve antigenotoksik ajanlar olarak koruyucu işlevleri ortaya koyulmuştur (Saber, 2017).

Gastrointestinal hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde canlı probiyotiklerin önemli etkinliğini gösteren çok sayıda kanıt olmasına rağmen, bağışıklığı baskılanmış veya çok genç hastalarda canlı suşların tüketilmesi ve ayrıca bağırsak bakteri topluluklarında istenmeyen direnç özelliklerinin yayılması konusunda hala endişeler vardır (Saadat vd., 2019). EPS'lerin, *Bullera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Lipomyces*, *Pichia*, *Pseudozyma*, *Rhodotorula* ve *Sporobolomyces* cinsleri gibi birçok maya türü tarafından üretildiği ve antitümör, immünomodülatör ve antioksidan aktivite gibi birçok özelliğe sahip oldukları gösterilmiştir (Madhuri ve Prabhakar, 2014; Gientka ve ark., 2015).

Pichia kudriavzevii: *Candida krusei*'nin teleomorfu olan *Pichia kudriavzevii*, haploid hücrelerin kaynaşması yoluyla cinsel olarak çoğalmaktadır. Maya, ilk olarak V.I. tarafından *Issatchenkia orientalis* olarak adlandırılmış, 1960 yılında Kudryavtsev ve 1965 yılında *Pichia kudriavzevii* olarak değiştirilmiştir (Hello, 2014). Bu tür, klinik ve tarımsal

mantar öldürücülerin yanı sıra düşük pH dahil olmak üzere çoklu stresleri tolere etme yeteneği ile tanınmaktadır. Hücrelerin şekli uzamak için oval veya elips şeklinde olabilir (Şekil 2.4). Çevrede özellikle toprakta, meyvelerin kabuklarında ve hatta fermente yiyeceklerde yaygın olarak bulunur. *Pichia kudriavzeii*, 45°C kadar yüksek sıcaklıklarda ve 2, 3 ve 4 kadar düşük pH'larda metabolik olarak aktif kalabilir (Sohn vd., 2018). *P. kudriavzeii* hücresi de sitoplazma, çekirdek, hücre zarı, hücre duvarı, mitokondri ve kofuldan oluşur. Glikoz en belgelenmiş kaynak olmasına rağmen, gıda kaynakları olarak glikoz, sakkaroz, galaktoz, fruktoz ve mannoz kullanabilir. *P. kudriavzeii*, fitazdan fitik asidi hidrolize etme yeteneğindedir. Fitik asit çoğu memeli tarafından sindirilemez, bu nedenle bu özellik, özellikle insan gıdalarında faydalıdır (Oberoi vd., 2012). *P. kudriavzeii* ile bitkiler arasında simbiyotik bir ilişki vardır. Örneğin, mayada bulunan fitazlar, toprakta bulunan fitatı parçalayarak bitkilerden alınan fosfat miktarını iyileştirmektedir. Bunun sonucunda ihtiyaç duyulan fosforlu gübre miktarında azalma olmaktadır (Greppi ve diğerleri, 2015).

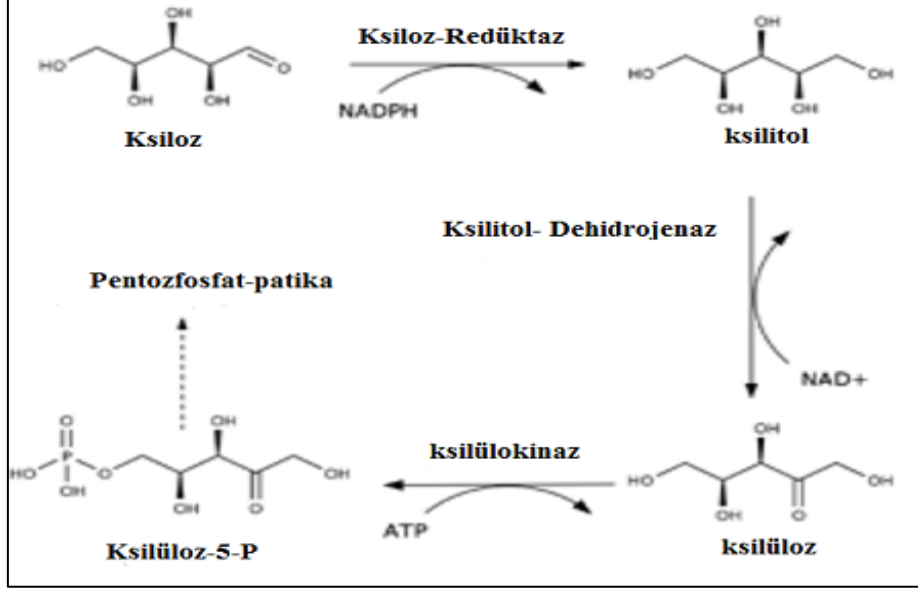
P. kudriavzeii izolatları doğada yaygın olarak bulunur. Spontan fermantasyon süreçlerinde sıklıkla karşılaşılır ve birçok geleneksel fermente gıda üretmek için kullanılmaktadır (Smukowski vd., 2018). Yüzyıllardır fermente kakao, fermente süt, mısır içecekleri gibi gıda ürünlerinin imalatında kullanıldığı için ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından "genel olarak güvenli" statüsü verilmiştir (Bourdichon vd., 2012). Başlangıçta ekşi mayalı ekmek için ve buğdaydan Çin sirkesi üretmek için kullanılmıştır (De Vuyst, 2016). *P. kudriavzeii*, strese son derece toleranslıdır ve *Candida gliserinogenes* adı altında endüstriyel gliserol üretimi için kullanılmıştır (Wang, 2001). Ayrıca, kanalizasyon içeren bazı azo-boyanların toksisitesini azaltmak için uygulanabilen çevre dostu biyoremediasyon tekniklerinde de kullanılabilir (Roşu vd., 2019). Ayrıca probiyotik olarak da potansiyele sahiptir (Chelliah, 2016).



Şekil 2.4. *Pichia kudriavzeii* (URL 1)

P. kudriavzeii, endüstriyel ölçekte yenilenebilir yakıtlar ve kimyasallar üretmek için faydalı bir maya türüdür. Biyoteknolojik uygulamalara ek olarak, süksinat ve laktat dahil organik asitlerin üretimini yapabilen *P. kudriavzeii* suşları, kakao fermantasyonları gibi çeşitli gıdaların üretilmesinde de kullanılmaktadır (Sohn vd., 2018). Biyoyakıt endüstrisi için çok faydalı olan yüksek verimde etanol üretmektedir (Oberoi vd., 2012). Çoğu maya gibi, *P. kudriavzeii* de şarap ve biranın fermantasyonunda yer almakla birlikte, büyük bir lezzet ve aroma yarattığı için kakao çekirdeği fermantasyonunda da çok değerlidir. *P. kudriavzeii* bazı durumlarda patojen olabilir, ancak belgelenmiş sadece immün yetmezlikli bireylerde birkaç patojenik vaka tespit edilmiştir (Hurst, 2016).

Birçok maya türü etanol üretme yeteneğine sahip olsa da pek çoğu etanolü ksilozdan üretemez. Ksiloz, ahşapta bulunan bir şekerdir, yani özellikle biyoyakıt endüstrisinde faydalı olan etanol üretimine alternatif olarak kullanılabilir. Ksiloz, pentoz fosfat yoluna girer ve fruktoza dönüştürülür. Bu metabolik yol *Pichia kudriavzeii*'ye özgüdür. Fruktoz, glikoliz yolundan geçirilerek enerji ve pirüvik asit salınımı ile sonuçlanmaktadır (Şekil 2.5). Doğru koşullar altında pirüvik asit etanole dönüştürülebilir (Hello, 2014).



Şekil 2.5. Ksilozun fermantasyonu (URL 2)

Maya probiyotiklerinin seçim kriterleri

Antikolesterol aktivite: Aşırı kolesterol, çeşitli metabolik hastalıkların ana nedenlerinden biridir. Terapötik önlemler, yaşam tarzı ve diyet müdahalelerinin yanı sıra farmasötik ajanlar, kolesterol seviyelerinin düzenlenmesi için yetersizdir (Shehata ve diğerleri, 2016). Yüksek kolesterol, kardiyovasküler hastalık geliştirme riskinin artmasıyla ilişkilidir. Bu, kalp hastalığı, felç ve periferik arter hastalığını içerebilir. Diyabet ve yüksek tansiyon da yüksek kolesterol ile ilişkilendirilmiştir (Shehata ve diğerleri, 2016). Kolesterol düşürme kabiliyetine sahip probiyotikler, gıda yoluyla takviye edildiğinde kan kolesterol düzeylerinde azalma ile birçok diyetle fayda sağlayabilir (Xie vd., 2015).

Probiyotik mikroorganizmalar, farklı mekanizmalar yoluyla kolesterol seviyelerini düşürme potansiyeli göstermiştir, ancak probiyotikler tarafından kolesterol düşürücü aktiviteden sorumlu olan kesin mekanizmalar belirsizliğini korumaktadır (Ma vd., 2019). Probiyotik hücreler tarafından bağırsak kolesterolünün uzaklaştırılması, bağırsak protein seviyelerinin aşağı regülasyonu ile ince bağırsak kolesterol absorpsiyonunun inhibe edilmesi ve safra tuzu tarafından katalize edilen safra tuzu dekonjugasyonu ile fekal safra asidi atılım seviyelerinin arttırılmasını içeren üç ana olası mekanizma önerilmiştir (Shehata vd., 2019). Bakterilerin kolesterolü giderme yeteneğinde suşlar arasında farklılık olup, bu hipokolesterolemik etki, büyüme sırasında kolesterolün asimilasyonu, kolesterolün hücre zarına katılması ve kolesterolün hücre yüzeyine yapışması gibi farklı mekanizmalara bağlanmıştır (Aloğlu, 2005). Örneğin, fungusların kolestrolü giderme yeteneğinin,

büyümleri sırasında kolesterolü miselleri ile ortamından gidermeleri olduğu rapor edilmiştir (Psomas vd., 2003).

Fermente süt ürünleri tüketildiğinde fermentasyonda laktik asit bakterileri ve bifidobakterilerin varlığının serum kolesterol seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir (Pan vd., 2011). Fermente süt ürünlerinin mikrobiyal içeriği incelendiğinde ise hem bakteri hem de mayaların aynı ortamda olduğu gözlenmiştir. Örneğin kefir, kolesterol düşürücü etki gibi probiyotik özelliklere sahip bir içecektir. Kefir tanelerinin bakteri ve mayalardan oluşması, mayaların probiyotik ve kolesterol düşürücü ajan olarak araştırılması gerektiğini ortaya koymuştur (Moslehi-Jenabian ve ark., 2010). Tomaro ve diğerleri, (2014) *Lactobacillus reuteri*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* gibi farklı probiyotik suşların kolesterol düşürücü potansiyellerini de bildirmişlerdir. *S. cerevisiae* var *boulardii* ve *S. cerevisiae* mayalarının doymamış yağ asitlerinin asimilasyon aktiviteleri araştırılmış, *S. cerevisiae* var *boulardii*'in *S. cerevisiae* ya göre hücrede daha fazla yağ ve yağ asidi biriktirdiği ve her iki kültürün de kolesterolü uzaklaştırdığı açıklanmıştır. Kültürlerin kolesterol asimilasyon mekanizmalarının kolesterol esteraz enzimi ile gerçekleştiği rapor edilmiştir (Krasowska ve ark., 2007). Chen vd., (2010) çiğ süttten 19 maya suşu izole etmiş ve *P. kudriavzevii* BY15 ve *P. guillier-mondii* BY31 suşlarının yüksek kolesterol asimilasyon kabiliyeti sergilediğini bildirmişlerdir. Kathade ve diğerleri (2020), tatlı su salyangozu *Pila globosa*'dan izole edilen *P. kudriavzevii*'nin kolesterolü asimile yeteneğine sahip olduğunu ve bu nedenle insanda kan kolesterolünü düşürmek için ideal bir probiyotik olabileceğini rapor etmişlerdir. Yüksek kolesterollü diyetle beslenen hamsterlerde 2 ila 3 hafta boyunca günlük *S. boulardii* uygulamasının kontrol hayvanlarına kıyasla toplam plazma kolesterolünü önemli ölçüde azalttığını ve ayrıca kemirgenin bağırsak mikrobiyota bileşimini değiştirdiğini gözlemlemişlerdir. Mikrobiyotadaki bu değişiklikler, lipidemik değerlerin varyasyonları ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, mayada safra tuzu hidrolaz aktivitesinin varlığının, plazma kolesterol düzeylerinin düşmesini açıklamak için önemli olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (Briand ve diğerleri 2019).

Gastrointestinal Sistemde (GIS) Canlılık: Bağırsak mikrobiyotası, bakteri, mantar ve protozoa dahil olmak üzere çeşitli ve karmaşık mikrobiyal topluluklardan oluşmaktadır. Bu mikrobiyota, metabolik aktiviteleri ve besin emiliminin teşvik edilmesi, biyoaktif bileşiklerin sentezi, bağırsak bariyer fonksiyonunun iyileştirilmesi, motilite, patojenlere karşı direnç veya bağışıklık sisteminin modülasyonu gibi fizyolojik düzenlemeleri yoluyla

konağın genel sağlığında önemli bir rol oynamaktadır (Yin ve diğerleri, 2019). Yaş, ilaçlar, antibiyotikler, diyet veya stres nedeniyle ortaya çıkan ve disbiyosis olarak bilinen bağırsak mikrobiyal popülasyonlarının veya metabolizmalarının bozulması, kronik hastalık gelişimine, metabolik bozukluklara veya atopik hastalıklara katkıda bulunmaktadır. Probiyotikler, dengeli bir bağırsak mikrobiyotasını destekleyerek ve toplu olarak hastalık direnci sağlayan faydalı metabolit üretimini uyararak disbiyozu tersine çevirebilirler (Westfall ve Pasinetti, 2019).

Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak kabul edilebilmesi için, (i) gastrointestinal koşullarda hayatta kalma, (ii) patojen inhibisyonu, (iii) bağırsak epitel hücrelerine yapışma gibi belirli seçim kriterlerini karşılaması gerekmektedir (Kalliomaki vd., 2008). Sindirim sistemi boyunca mide ve bağırsak sıvılarına maruz kalmak, alınan probiyotiklerin canlılığını azaltabilen ana strestir. Yaşayan mikroorganizmaların bağırsağa optimum şekilde taşınması, bağırsak probiyotiklerinin etkileri için kritik öneme sahiptir (Liong ve diğerleri, 2005). İnsan gastrointestinal sisteminde canlı kalma, probiyotik suşlar için önemli bir özelliktir. Oral yoldan verilen probiyotiklerin gastrointestinal geçişte canlı kalması ve dolayısıyla bağırsakları geçici olarak kolonize etmesi gerekmektedir. Hayatta kalma oranları, probiyotiklerin nasıl uygulandığına (yani gıda matrisi, galenik form ve dozaj rejimi gibi faktörlere) bağlı olabilmektedir (Possemiers vd., 2010).

Mayaların umut verici aktiviteleri ve insan gastrointestinal sisteminden geçiş sırasında hayatta kalma, düşük pH'a ve safra tuzlarına maruz kalmayı tolere etme yetenekleri, probiyotik olarak olası kullanımlarına dikkat çekmiştir (Pennacchia ve diğerleri, 2008).

Canlı *S. cerevisiae* hücreleri, bağırsak mikrobiotasının yeniden dengelenmesi için biyoterapötik veya probiyotik ajanlar olarak kullanılmaktadır (Posteraro vd., 2005). Mayalar, düşük pH ortamlarında hayatta kalma ve gelişme konusunda değişen yeteneklere sahiptirler. Kakao fermantasyonundan izole edilen maya türleri pH 3'te (Wulan ve diğerleri, 2021), Nijerya fermente yemeği olan "ogi"den izole edilen *P. kudriavzevii* suşlarının pH 2 mide suyunda (Alakeji ve Oloke, 2020) ve *S. boulardii*'nin çok farklı pH seviyelerinde canlı kalabileceğini rapor edilmiştir (Romero-Luna vd., 2018). *S. boulardii*'nin bakteriyel toksinleri etkisiz hale getirerek, toksinin bağırsak hücre reseptörlerine bağlanmasını engelleyerek ve toksin kaynaklı iltihabı azaltarak GI yoluna fayda sağladığı bildirilmiştir (Anoop vd., 2015).

Hidrofobisite: Hücre yüzeyi hidrofobikliği (CSH), hem hücre-hücre hem de hücre-yüzey etkileşimlerini etkileyen önemli bir hücresel biyofiziksel parametredir. Dimorfik mantarlarda, küf ve maya formları arasında sıcaklığa bağlı geçiş dahil olmak üzere birçok faktör, CSH üzerinde güçlü etkilere sahiptir ve daha yüksek hidrofobiklik, filamentli hücre büyümesine elverişli düşük sıcaklıklarda daha yaygındır. Aynı izolata ait bireysel maya kolonileri arasında, farklı morfolojiler CSH'deki farklılıklara karşılık gelebilir. CSH'deki bu farklılıklar sıklıkla tıbbi açıdan önemli mantarlarda değişen virülans ile ilişkilidir ve antifungal tedavilerin etkinliğini etkileyebilir (Danchik ve Casadevall, 2021). CSH seviyesi, su ile etkileşimlerini belirleyen mikropların yüzeyindeki moleküllerin özelliklerini yansıtmalıdır. Hidrofobik *Candida albicans* hücrelerinin proteazlarla işlenmesi, CSH'yi düşürerek, bu özelliğin yüzey proteinleri tarafından verildiğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, bu proteinler her zaman açığa çıkmaz. Büyüme durumuna bağlı olarak hidrofilik fibriller ve glikosilasyon seviyesi tarafından maskelenebilirler (Dabiri ve ark., 2018). Benzer şekilde, proteinler *Aspergillus fumigatus*'ta CSH'den sorumlu görünmektedir. *Aspergillus* spp.'de bu proteinler, hidrofobik yüzeylerle etkileşime izin veren hidrofobik alanlara sahip küçük proteinler olan hidrofobinleri içerir (Ohtaki ve diğerleri, 2006).

Mikrobiyal CSH, değişen hücre duvarı bileşimi, genetik modifikasyon, sıcaklıktaki değişiklikler ve değişen besin mevcudiyeti dahil olmak üzere birçok değişkenden etkilenebilir. *Trichosporon asahii* kolonileri arasında, farklı maya hücresi morfolojileri, hidrofobiklikteki farklılıkların göstergesidir. Morfolojinin bu patojen için virülansı etkilediğine inanılmaktadır (Ichikawa ve ark., 2017). Mannoproteinler, glukanlar, lipidler ve kitin dahil olmak üzere hücre duvarının diğer bileşenleri de CSH'ye katkıda bulunabilir (Angiolella ve diğerleri, 2020). Sterol profili ve lipid içeriği de CSH'yi etkiler (Suchodolski ve diğerleri, 2020). Besin mevcudiyeti, mantar büyüme aşaması ve sıcaklık da CSH'yi etkilmektedir. *C. albicans*'ın taze ortama seyreltilmiş 37°C'deki sabit faz kültürleri, yeni erişilebilir besinlere yanıt olarak CSH'lerini hızla azaltabilir (Llopis-Torregrosa ve diğerleri, 2019). Dimorfik mantarlarda, hifal ve maya formları arasındaki geçiş kısmen sıcaklık tarafından kontrol edilmektedir ve dramatik morfolojik, gen regülasyonu ve hücre yüzeyi kompozisyonu değişiklikleri ile ilişkilidir. Dimorfik mantarlardaki çoğu CSH çalışması, 37°C'de büyüyen organizmalara odaklanmıştır (Ramos ve diğerleri, 2020). Çoğunlukla *Candida* türleri olmak üzere dimorfik mantarlarda CSH ile ilgili mevcut çalışmalar, bu biyofiziksel parametrenin virülans, biyofilm oluşumu ve

tedaviye yanıt süreçlerinde önemli ve karmaşık roller oynadığını göstermektedir. Yüksek CSH sıklıkla daha güçlü virülansa karşılık gelmektedir (Danchik ve Casadevall, 2021).

2.2.2. Prebiyotikler

Diyet prebiyotikleri tipik olarak gastrointestinal sistemin üst kısmından geçen ve substrat olarak hareket ederek kalın bağırsığı kolonize eden bakteriler (*Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* cinsleri) gibi faydalı mikroorganizmaların büyümesini veya aktivitesini uyaran sindirilemeyen lif bileşikleridir (Hutkins vd., 2016). İlk olarak 1995 yılında Marcel Roberfroid tarafından fonksiyonel bir gıda bileşeni olarak tanımlanmış ve adlandırılmıştır (Gibson ve Roberfroid, 1995; Hutkins ve diğerleri, 2016). Prebiyotiklerin tanımı ve bu sınıflandırmaya girebilecek gıda bileşenleri, ilk tanımından bu yana değişiklik göstermiştir. 2016 yılında, Uluslararası Bilimsel Probiyotikler ve Prebiyotikler Birliği (ISAPP) “Konakçı bir mikroorganizma tarafından sağlık yararı oluşturmak için seçici olarak kullanılan bir substrat” olarak yeniden tanımlamışlardır (Gibson ve diğerleri, 2017). Prebiyotik olarak kabul edilebilmesi için gıdanın veya bileşenlerinin:

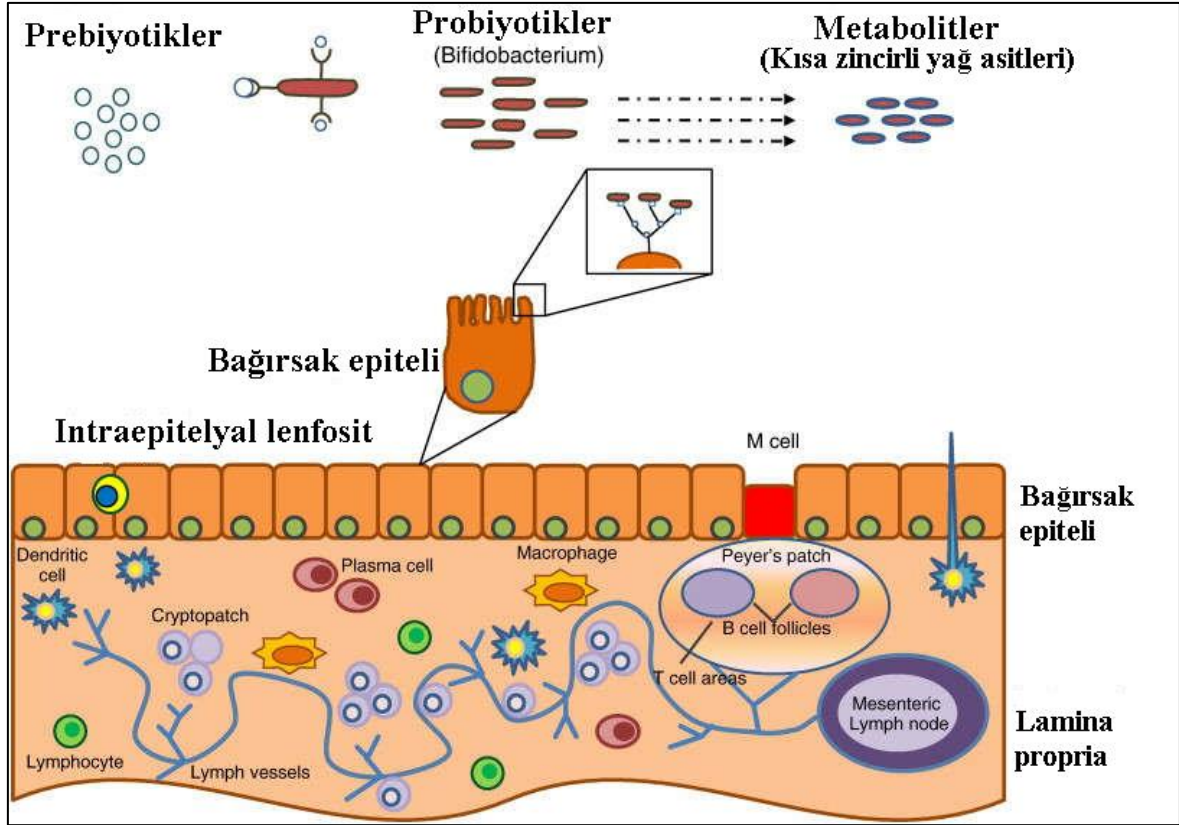
- Konak sindirim, absorpsiyon ve adsorpsiyon süreçlerine dirençli olması,
- Gastrointestinal sisteminde (GI) kolonize olan mikrobiyota tarafından fermente edilebilir olması,
- Bağırsak mikrobiyotasını daha sağlıklı bir kompozisyon lehine değiştirerek, gastrointestinal sistem içindeki bir veya sınırlı sayıda bakterinin büyümesini ve/veya aktivitesini seçici olarak uyarması gerekmektedir (Slavin, 2013; Gibson vd., 2017).

Oligosakkaritler olarak adlandırılan bitki kaynaklı karbonhidrat bileşikleri, tanımlanmış olan ana prebiyotik kaynağıdır (Pokusaeva ve diğerleri, 2011; CK Rajendran ve diğerleri, 2017). Spesifik olarak, fruktanlar ve galaktanlar, bağırsaktaki faydalı bakteri kolonilerinin aktivitesini ve büyümesini uyaran iki oligosakarit kaynağıdır (Pokusaeva ve diğerleri, 2011; Lamsal, 2012). Fruktanlar, fruktooligosakkaritler (FOS) ve inülinlerden oluşan bir karbonhidrat kategorisidir, galaktanlar ise galaktooligosakkaritlerden (GOS) oluşmaktadır (Gibson ve diğerleri, 2017). Diğer diyet lifleri de dirençli nişasta (Zaman ve Sarbini, 2015), pektin (Gómez ve diğerleri, 2014), beta-glukanlar (Arena ve diğerleri, 2014) ve ksilooligosakkaritlerdir (Linares ve diğerleri, 2017).

Yaygın olarak kullanılan prebiyotikler arasında inülin, frukto-oligosakkaritler (FOS'lar), galakto-oligosakkaritler (GOS'lar), laktuloz, polidekstroz, izomalto-oligosakkaritler (IMOS'lar), ksil-oligosakkaritler (XOS'ler) ve laktitol bulunmaktadır (Guarino ve diğerleri, 2020). Çoğu araştırma, prebiyotiklerin *Bifidobacteria* ve *Lactobacillus* üzerinde sağladığı etkilere odaklanmıştır (Pandey vd. 2015). Hem *Bifidobacteria* hem de *Lactobacillus*'un farklı prebiyotik özgülüğe sahip olduğu ve bakteri popülasyonunun karakteristik enzimlerine dayalı olarak prebiyotik lifi seçici olarak fermente ettiği gösterilmiştir. Bu nedenle, laktobasiller inülin ve fruktooligosakkaritleri tercih ederken, bifidobakteriler inülin, fruktooligosakkaritler, ksilooligosakkaritler ve galaktooligosakkaritler için özgülük gösterir (Wilson ve Whelan, 2017). Bifidobakterileri uyaran bir ürün, prebiyotik olmakla örtüşen ancak aynı olmayan bir kavram olan bifidojenik faktör olarak tanımlanmaktadır (Wilson ve Whelan, 2017). Sağlıklı insanlarda biyosentetik olarak aktif GOS'ların karışımı, probiyotik bakterilerin hayatta kalmasını ve kolonizasyonunu arttırmak için *Bifidobacterium bifidum*'un enzimatik aktivitesi ile üretilmiştir (Depeint vd., 2008). Kısa zincirli yağ asitleri (SCFA), bifidobakteriler ve laktobasiller gibi mikroflora üyeleri tarafından metabolik yakıt olarak kullanılmaktadır. İnülin ve dirençli nişasta tüketimi ile kolondaki bifidobakteri ve laktobasil popülasyonunun büyümesi artmaktadır (Topping, 2001). Ayrıca, prebiyotik fermantasyonda üretilen kısa zincirli yağ asitleri (SCFA'lar), bağırsak bariyerinin bütünlüğünü ve immünomodülatör özellikleri geliştirmektedir (Oniszczuk ve diğerleri, 2021). Sağlıklı insanlarda biyosentetik olarak aktif GOS'ların karışımı, probiyotik bakterilerin hayatta kalmasını ve kolonizasyonunu arttırmak için *Bifidobacterium bifidum*'un enzimatik aktivitesi ile üretilmiştir (Depeint vd., 2008). Kısa zincirli yağ asitleri (SCFA), bifidobakteriler ve laktobasiller gibi mikroflora üyeleri tarafından metabolik yakıt olarak kullanılmaktadır. İnülin ve dirençli nişasta tüketimi ile kolondaki bifidobakteri ve laktobasil popülasyonunun büyümesi artmaktadır (Topping, 2001). Ayrıca, prebiyotik fermantasyonda üretilen kısa zincirli yağ asitleri (SCFA'lar), bağırsak bariyerinin bütünlüğünü ve immünomodülatör özellikleri geliştirmektedir (Oniszczuk ve diğerleri, 2021). Çalışmalar ayrıca prebiyotiklerin yararlı bağırsak bakterilerinin büyümesini uyarmasının yanı sıra, bağırsakta *Clostridia* gibi zararlı ve potansiyel olarak patojenik mikropların büyümesini de engelleyebileceğini göstermiştir (Rajendran ve diğerleri, 2017). *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* ve *Ganoderma lucidum* dahil olmak üzere çeşitli mantar türleri polisakkaritler üretmektedirler (Wang ve diğerleri, 2021). Maya EPS'si, immünomodülasyonda umut verici uygulamalara ek olarak antiviral, antitrombotik ve antioksidan gibi çeşitli potansiyel aktivitelere sahip bir tür mikrobiyal polisakarittir (Li vd., 2020).

Araştırmalar, fermentasyonda kullanılan bitki materyallerinde bulunan inülinin, *Bifidobacterium adolescentis* ve *Faecalibacterium prausnitzii*'nin uyarılması yoluyla insan bağırsağı mikrobiyotası üzerinde nutrasötik bir etki gösterdiğini kanıtlamıştır (Ramirez-Farias ve diğerleri, 2008). Bitki kaynaklarından OS'ler-prebiyotik alternatifleri, mantar türü *Aspergillus ibericus* kullanılarak fermentasyon sürecinde üretimleri için incelenmiştir. Sentezlenen mikrobiyal ürün, bağırsak mikrobiyotasını temsil eden bir bakteri topluluğunda prebiyotik potansiyeli göstermiştir (Roupar ve diğerleri, 2022). Prebiyotiklerin doğası ve uygulamaları göz önüne alındığında, *Aspergillus ibericus* ve *Saccharomyces cerevisiae* tarafından üretilen FOS'ların, sağlıklı insan bağırsak mikrobiyotasını temsil eden bakteri konsorsiyumu tarafından fermente edildiği bildirilmiştir. Mikrobiyal kaynaklı FOS'ların biyoaktivitesi, inülin tipi maddeler olan raftiloz ve frutaloz dahil olmak üzere ticari FOS'larla karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, mikroorganizma konsorsiyumunun substrat olarak FOS'u tükettiğini ve ayrıca FOS'un bifidobakter ve laktobasillerin büyümesini ve SCFA verimini teşvik ettiğini göstermiştir. *Aspergillus ibericus* tarafından üretilen FOS'un güçlü prebiyotik özelliklere sahip ve prebiyotik potansiyeli yüksek bir gıda bileşeni olarak kullanılabilirliğinin umut verici olduğu şeklinde yorumlanmıştır (Roupar vd., 2022; Nobre vd., 2018). Başka bir çalışmada, biyomalzeme olarak kullanım için XOS'lar, endüstriyel bir yan ürün olan küspeden ekstrakte edilen ksilandan sentezlenmiştir (Gupta ve diğerleri, 2022).

Prebiyotiklerin etki mekanizması: Fermentasyon, kolondaki faydalı bakteriler tarafından prebiyotiklerin kullanıldığı ana etki mekanizmasıdır. Hem *Bifidobacteria* hem de *Lactobacillus*, substratları parçalamak için sakarolitik metabolizmayı kullanan bakteri popülasyonlarıdır (Lamsal, 2012; Slavin, 2013). Bifidobakteriyel genom, karbonhidrat modifiye edici enzimleri kodlayan birçok genin yanı sıra karbonhidrat alım proteinlerini kodlayan genleri içerir. Bu genlerin varlığı, bifidobakterilerin, bitki kaynaklı oligosakkaritlerin (pektin, selüloz, hemiselüloz ve dirençli nişastalar) veya prebiyotiklerin fermentasyonu ve metabolizması için özelleşmiş spesifik metabolik yollar içerdiğini gösterir. Bifidobakterilerdeki bu yollar ile Şekil 2.6'deki gibi vücut fonksiyonlarında çeşitli fizyolojik rollere sahip kısa zincirli yağ asitleri üretirler (Abdulhussein ve diğerleri, 2018).



Şekil 2.6. Prebiyotiklerin etki mekanizması (Abdulhussein ve diğerleri, 2018)

Prebiyotik kaynakları: Kaynakların prebiyotik olarak sınıflandırılabilmesi için konağa fayda sağladığı kanıtlanmalıdır. Frukτανlardan ve ksılanlardan türetilen fermente edilebilir karbonhidratlar, prebiyotiklerin en iyi belgelenmiş örneğidir (Gibson ve diğerleri, 2017).

Endojen Prebiyotik: Anne sütü, galaktooligosakkaritler adı verilen oligosakkaritler içeren endojen prebiyotik kaynağıdır (Wilson ve Whelan, 2017; Enam ve Mansell, 2019). Anne sütü oligosakkaritlerinin anne sütüyle beslenen bebeklerde *Bifidobacteria* bakteri popülasyonunu arttırdığı ve bebeğin bağışıklık sistemini güçlendirdiği bulunmuştur. Ayrıca, insan sütü oligosakkaritleri, yenidoğanlarda sağlıklı bir bağırsak mikrobiyota kompozisyonu oluşturmaya yardımcı olmaktadır (Gibson ve diğerleri, 2017; Enam ve Mansell, 2019).

Eksojen Prebiyotik: Prebiyotikler olarak sınıflandırılan sindirilemeyen karbonhidrat bileşikler, fermente olabilen bir lif türüdür ve bu nedenle diyet lifi olarak sınıflandırılabilir. Bununla birlikte, diyet liflerinin tümü prebiyotik kaynak olarak sınıflandırılmaz (Slavin, 2013). Aşağıda vurgulanan gıda kaynaklarına ek olarak (Çizelge 2.1) çiğ yulaf, rafine edilmemiş arpa, yacon ve tam tahıllı kahvaltılık tahıllar da prebiyotik lif kaynakları olarak sınıflandırılmaktadır (Gibson ve diğerleri, 2017). Prebiyotik lifin

baskın türü yiyeceğe göre değişebilir. Örneğin, yulaf ve arpa yüksek miktarda beta-glukan, meyve ve sebzeler pektin, tohumlar sakız, soğan ve Kudüs enginarları inülin ve oligofruktoz açısından zengindir ve muz ve baklagiller dirençli nişasta içerir (Moshfegh, 1999).

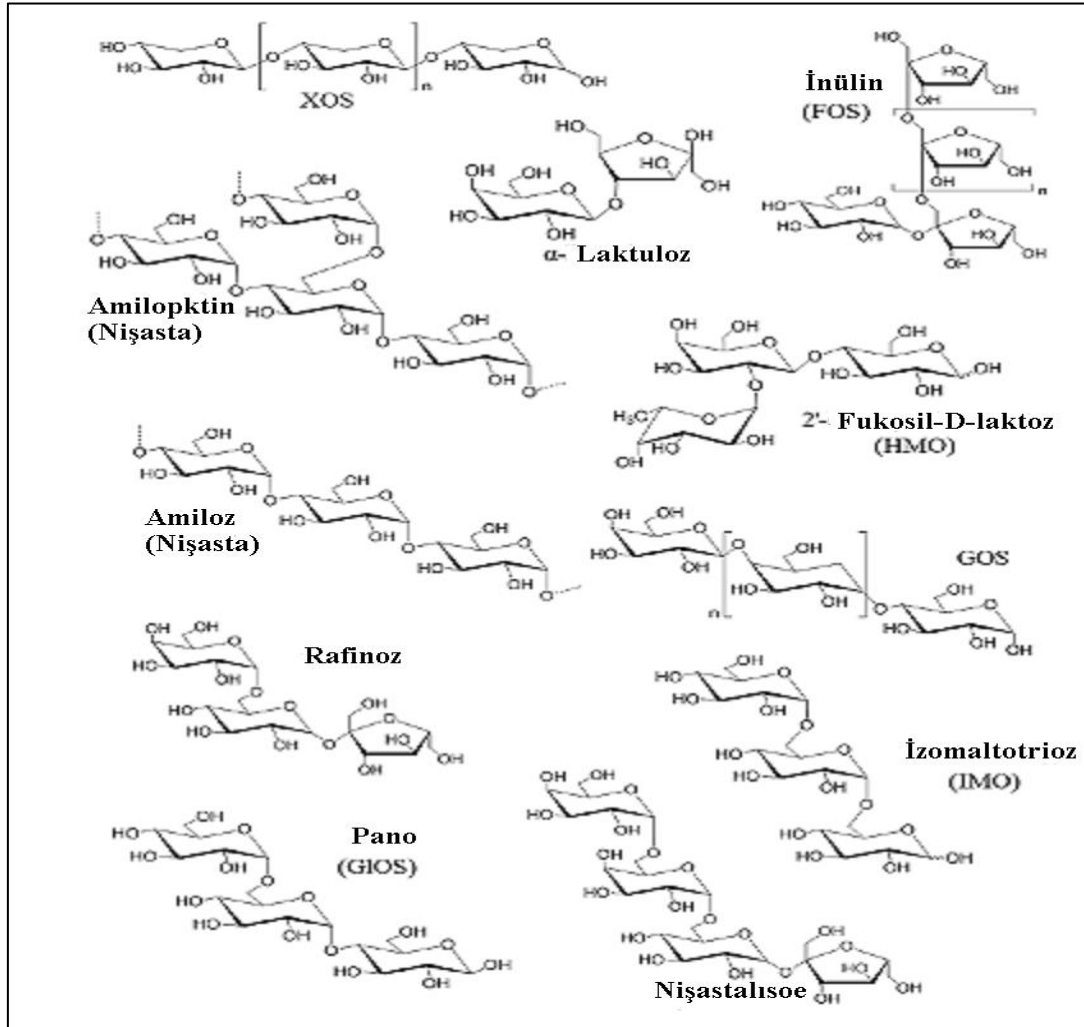
Çizelge 2.1. Prebiyotik içeren en iyi 10 gıda (Moshfegh, 1999)

Gıda	Ağırlığa Göre Prebiyotik Lif İçeriği (%)
Ham, Kuru Hindiba Kökü	64,6
Ham, Kuru Kudüs Enginar	31,5
Ham, Kuru Karahindiba Yeşilleri	24,3
Çiğ, Kuru Sarımsak	17,5
Çiğ, Kuru Pırasa	11,7
Çiğ, Kuru Soğan	8,6
Çiğ kuşkonmaz	5
Ham Buğday kepeği	5
Tam Buğday unu, Pişmiş	4,8
Çiğ muz	1

Prebiyotik türleri: Çoğu karbonhidrat gruplarının bir alt kümesi olan birçok prebiyotik türü vardır (Şekil 2.7) ve çoğunlukla oligosakkarit karbonhidratlardır (OSC'ler). Ancak prebiyotiklerin sadece karbonhidrat olmadığını gösteren bazı kanıtlar da var (Louis ve diğerleri, 2016).

Fruktanlar: Bu kategori, inülin ve frukto-oligosakkarit (FOS) veya oligofruktozdan oluşmaktadır. Yapıları β (2→1) bağlantılı lineer bir fruktoz zinciridir. Genellikle β (2→1) bağlantılı terminal glikoz birimlerine sahiptirler. İnulin, 60'a kadar polimerizasyon derecesine (DP) sahiptir, FOS'un DP'si ise 10'dan azdır (Louis vd. 2016). Bazı çalışmalar, fruktanların seçici olarak laktik asit bakterilerini uyarabileceğini rapor etmiştir. Ancak fruktanların zincir uzunluğunun, hangi bakterilerin onları fermente edebileceğini belirlemek için önemli bir kriter olduğunu gösteren araştırmalar mevcuttur (Astó vd. 2019). Bu nedenle, diğer bakteri türleri de fruktanlar tarafından doğrudan veya dolaylı olarak teşvik edilebilir. 2018'de Amerika Birleşik Devletleri'nde, Gıda ve İlaç İdaresi, ABD'de üretilen gıda ürünlerinin besin değerini iyileştirmek için kullanılan bir diyet lifi bileşeni olarak inülini onaylamıştır. Böbrek fonksiyonunu ölçmek için inülinin

kullanılması, glomerüler filtrasyon hızını tahmin etmenin diğer araçlarıyla karşılaştırma için "altın standart" olarak kabul edilmektedir (Hsu ve Bansal, 2011).



Şekil 2.7. Farklı prebiyotik ailelerinin kimyasal yapıları. (FOS: frukto-oligosakkaritler, GLOS: gluko-oligosakkaritler, GOS: galakto-oligosakkaritler, HMO: insan sütü oligosakkaritler, IMO: izomalto-oligosakkaritler)

Galakto-Oligosakkaritler: Laktoz uzantısının ürünü olan galakto-oligosakkaritler (GOS), iki alt grupta sınıflandırılır: (i) C3, C4 veya C6'da aşırı galaktoz içeren GOS ve (ii) enzimatik trans-glikosilasyon yoluyla laktozdan üretilen GOS. Bu reaksiyonun son ürünü esas olarak β (1→6), β (1→3) ve β (1→4) bağlantılarında tri- ile pentasakkaritlerin galaktoz ile bir karışımıdır. Bu tip GOS ayrıca trans-galakto-oligosakkaritler (TOS) olarak da adlandırılır (Gibson ve diğerleri, 2010). Galakto-oligosakkaritler, bifidobakter ve laktobasilleri büyük ölçüde uyarabilir. Bebeklerdeki bifidobakteriler, GOS ile yüksek oranda birleşme göstermiştir. Enterobakteriler, *Bacteroidetes* ve *Firmicutes*, *Bifidobacteria*'dan daha az ölçüde GOS tarafından uyarılmaktadır (Louis vd. 2016).

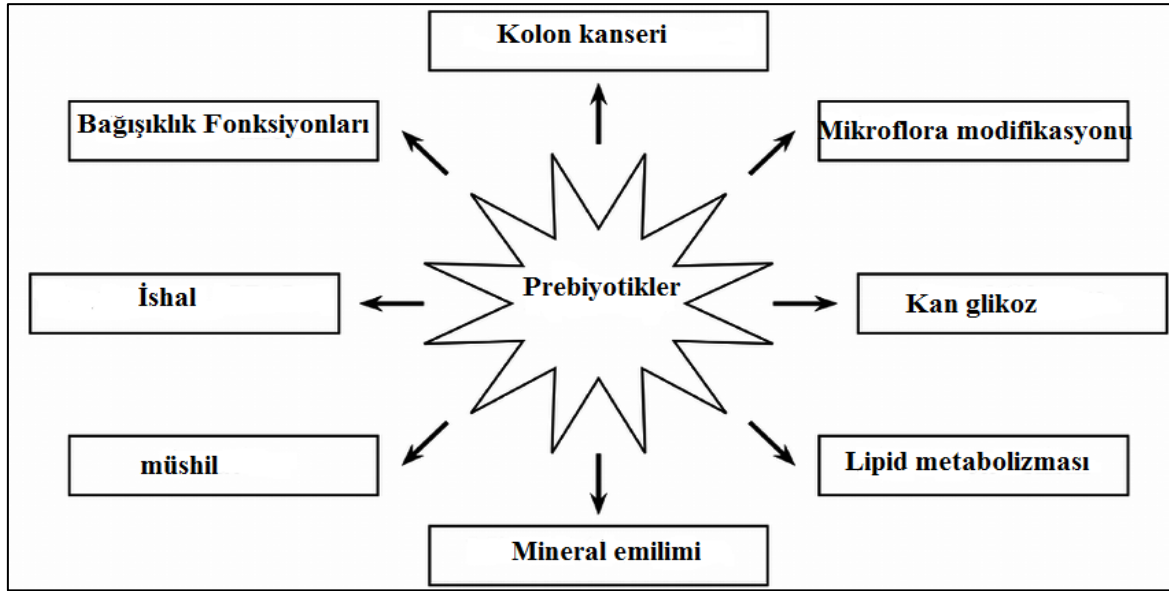
Nişasta ve Glikozdan Türetilen Oligosakkaritler: Dirençli nişasta (RS) olarak bilinen üst bağırsak sindirimine dirençli bir tür nişasta mevcuttur. Dirençli nişasta, yüksek düzeyde bütirat üreterek sağığı geliştirebilir; bu nedenle prebiyotik olarak sınıflandırılması önerilmiştir (Fuentes-Zaragoza vd. 2011). *In vitro* bir çalışma, dirençli nişastanın *Ruminococcus bromii* ve *Bifidobacterium adolesan* tarafından ve ayrıca daha az ölçüde *Eubacterium rectale* ve *Bacteroides thetaiotaomicron* tarafından da parçalanabileceğini göstermiştir. Bununla birlikte, karışık bakteri ve dışkı inkübasyonlarında, *R. bromii*'nin yokluğunda dirençli nişasta bozunmasının imkansız olduğu bildirilmiştir (Ze vd., 2012). Polidekstroz, glikoz türevli bir oligosakkarittir. Çok sayıda dalı ve glikozidik bağlantıları olan glukandan oluşmaktadır. Bifidobakterileri uyarabileceğine dair bazı kanıtlar mevcut olmasına rağmen henüz doğrulanmamıştır (Costabile vd., 2012).

Pektik-Oligosakkaritler: Pektik-oligosakkaritler (POS'ler), galakturonik asit (homogalakturonan) veya ramnozun (rhamnogalakturonan I) uzantısına dayanmaktadır. Karboksil grupları, metil esterleştirme ile ikame edilebilir ve yapı, C2 veya C3'te asetillenebilir. Çeşitli şeker türleri (arabinoz, galaktoz ve ksiloz gibi) veya ferulik asit, yan zincirlere bağlıdır (Yoo vd. 2012). Yapıları, pektik-oligosakkaritler kaynaklarına bağlı olarak önemli ölçüde farklılık göstermektedir (Gullón vd. 2013).

Karbonhidrat Olmayan Oligosakkaritler: Kakao türevi flavanoller gibi karbonhidrat olarak sınıflandırılmayan ancak prebiyotik olarak sınıflandırılması önerilen bazı bileşikler vardır. *In vivo* ve *in vitro* deneyler, flavanollerin laktik asit bakterilerini uyarabildiğini göstermektedir (Tzounis vd. 2011).

Sağlık Yararları: Ön araştırmalar prebiyotiklerin olası sağlık yararının, kalsiyum ve diğer mineral emilimini arttırdığını (Scholz-Ahrens ve Schrezenmeir, 2007), bağışıklık sisteminin etkinliği arttırdığını (Lomax ve Calder, 2009; Lohne ve diğerleri, 2014), bağırsak asiditesini azalttığını, kolorektal kanser riski (Geier ve diğerleri, 2006), inflamatuvar bağırsak hastalığı (Crohn hastalığı veya ülseratif kolit) (Hedin ve diğerleri, 2007), hipertansiyon (Yeo ve diğerleri, 2009) ve dışkılama sıklığını (Roberfroid, 2010) azalttığını rapor edilmektedir (şekil 2.8). Prebiyotikler, 0-24 aylık çocuklarda antibiyotik gerektiren enfeksiyöz atak sayısını ve toplam enfeksiyon sayısını azaltmada etkili olabileceği ifade edilmektedir (Lohne vd. 2014). Hiçbir iyi kanıt, prebiyotiklerin alerjileri önlemede veya tedavi etmede etkili olduğunu göstermemiştir (Cuello-Garcia vd. 2017). Araştırmalar, prebiyotiklerin kısa zincirli yağ asitlerinin (SCFA) artan üretimine yol açtığını gösterse de

(Macfarlane ve diğerleri, 2006), doğrudan bir nedensel bağlantı kurmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu belirtilmektedir. Prebiyotikler, kolonik duvarlar için besin olarak kısa zincirli yağ asitlerinin üretimi ve ülseratif kolit semptomlarının hafifletilmesi yoluyla inflamatuvar bağırsak hastalığına veya Crohn hastalığına faydalı olabileceği bildirilmiştir (Guarner, 2005).



Şekil 2.8. Prebiyotiklerin olası sağlık yararı (Cummings ve Macfarlane 2002)

Diyete önemli miktarlarda ani prebiyotiklerin eklenmesi, fermentasyonda artışa neden olarak gaz üretiminde artışa, şişkinliğe veya bağırsak hareketine neden olabilir (Marteau ve Seksik, 2004). Kısa zincirli yağ asitlerinin üretimi ve fermentasyon kalitesi, düşük lif alımının uzun süreli diyetleri sırasında azalmaktadır (Thambiraj vd., 2018). Bağırsak bakterilerini rehabilite etmek veya eski haline getirmek için bakteri mikrobiotası kademeli olarak oluşturulana kadar, besin emilimi bozulabilir ve daha yüksek prebiyotik alımının hızlı bir şekilde eklenmesiyle kolonik geçiş süresi geçici olarak uzayabilmektedir (Marteau ve Seksik, 2004).

Gıda Uygulamaları: Prebiyotik içerikli fonksiyonel gıdaların üretimi, son yıllarda gıda endüstrisinde baskın bir konuma sahip olan bir alandır ve sadece ekonomik nedenlerle değil, faydalarına dair bilimsel kanıtlarla da oldukça umut verici bir pazardır (Burgain vd., 2011). Bazı prebiyotikler, özellikle inülin ve fruktooligosakkarit, süt ürünleri, ekmekler, tahıllar, diyet takviyeleri ve diğerleri gibi doğal bir diyetin parçası olan çok çeşitli yiyecek ve içeceklerle dahil edilmiştir. Bu büyüme sayesinde tüketiciler lezzetli yemeklerin tadını çıkarırken kendi sağlıkları için faydalı etkileri teşvik edebilmektedirler (Kumar vd., 2012).

Bebek formülüne prebiyotiklerin eklenmesi dışkıyı yumuşatmaktadır. Pazarlama sonrası yayınlanan araştırmalar, formülde uzun zincirli bir inulin/galaktooligosakkarit karışımı (0.8 g/dl) ile beslenen bebeklerin normal şekilde büyüdüğünü ve hiçbir yan etkisinin olmadığını göstermiştir (Veereman-Wauters, 2005).

Spesifik prebiyotiklerin hem *in vitro* hem de *in vivo* spesifik kolon mikrobiyal popülasyonlarını teşvik ettiği bulunmuştur (Gibson ve Roberfroid, 1995). Örneğin, amilomaize nişastanın, bakteroidler ve koliformlar pahasına bifidobakterilerin büyümesini seçici olarak uyardığı bulunmuştur (Wang ve diğerleri, 2002). Benzer şekilde, laktulozun bifidobakterilerin büyümesini desteklediği ve sürekli bir kültür modelinde (Gibson ve Fuller, 2000) ve ayrıca insan kolonunda (Bouhnik ve diğerleri, 2004) bakteroidlerin sayısını azalttığı rapor edilmiştir. Ek olarak, *B. lactis*'in fekal seviyelerinin, galaktooligosakkaritlerin oral yoldan verilmesiyle arttığı bulunmuştur (Malinen vd. 2002). Aksine, β -glukanlar laktobasillerin büyümesini bifidobakterilerden daha fazla desteklemektedir (Kadlec ve Jakubec, 2014).

Prebiyotikler, gelişmiş bir organoleptik kalite ve daha dengeli bir besin bileşimi gibi çifte fayda sağlamak için kullanılabilir (Younis, et al., 2015). Lif bileşenleri olarak inülin ve sindirilemeyen oligosakkaritlerin kullanımı basittir ve çoğu zaman tat ve dokuyu geliştirmeye yol açmaktadır. Bifidobakteriler ve laktobasil türleri gibi spesifik kolonik bakteriler, bu özel diyet lifi formlarını kolayca fermente eder ve kısa zincirli yağ asitlerinin paralel üretimiyle hücre popülasyonlarını yükseltir (Donovan, 2006). Bu asitler, başlıca bütirat, asetat ve propiyonat, konak için metabolik enerjinin yanı sıra bağırsağın asitlenmesini sağlamaktadır (Schaafsma, 2008).

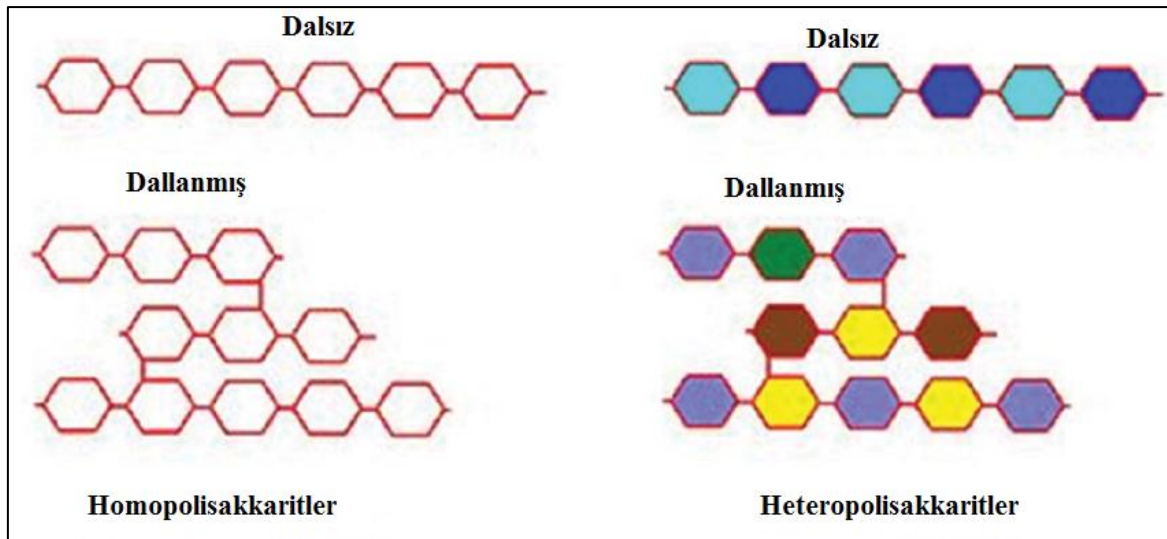
Ekzopolisakkaritler ve Prebiyotik Olarak Değerlendirilmesi: Polisakkaritler (glikanlar) uzun monosakkarit zincirleridir. Her monosakkarit, polisakkarit olarak bilinen polimerik yapıyı oluşturmak için glikozidik bağlarla birbirine bağlanır. Polisakkaritler biyokütlenin en büyük bileşenidir. Doğadaki karbonhidrat kütlesinin %90'ından fazlasının polisakkaritler şeklinde olduğu tahmin edilmektedir (Schmid ve Sieber, 2015). Polisakkaritler enerji depolamada hayati bir rol oynar ve glikojen ve nişasta gibi hücresel yakıt kaynağı görevi görürler. Selüloz gibi organizmaların yapısal bütünlüğünü korumaya, bitkilerde yapının korunmasına yardımcı olurlar. Ayrıca, şekli korumaya yardımcı olan hücreleri, dokuları ve organları destekleyen hayvan dokusu gibi hücre dışı boşlukta da bulunurlar. Polisakkaritler, hücreden hücreye iletişimin ve hücresel tanımanın ayrılmaz bir

parçasıdır. İki tip polisakkarit vardır: Homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler (Kumar ve Mody, 2009).

Homopolisakkaritler (HoPS): Tek tip şeker monomerinden oluşan nötr polisakkaritlerdir. Örneğin selüloz, beta-glikosidik bağlantılar yoluyla bağlanan glikoz monomerlerinden oluşan dalsız bir homopolisakkarittir; dektran, selüloz, glikojen, glikoz monomerlerinin alfa-glikosidik bağlarla birleştiği dallı bir formdur. Yapısındaki moleküllere bağlı olarak adlandırılırlar; Glukan (glikoz polisakariti), fruktan (fruktoz polisakariti), galaktan (galaktoz polisakariti), araban (arabinoz polisakariti) ve ksilan (ksiloz polisakariti) (Kumar ve Mody, 2009).

Heteropolisakkaritler (HePS): İki veya daha fazla monosakkarit türünden oluşan polisakkaritlerdir. Örneğin, peptidoglikan, agaroz ve glikozaminoglikanlar veya glukuronik asit (GlcA), heteropolisakkaritlerin tekrar eden birimleridir ve bazen fosfat, asetil ve gliserol gibi karbonhidrat olmayan ikame edicilerde içerirler (Kumar and Mody, 2009).

Her iki polisakarit türünde de monosakkarit doğrusal bir şekilde bağlanabilir veya karmaşık oluşumlara ayrılabilir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Ekzopolisakkarit türleri (Xie vd. 2016)

Homopolisakaritler ve heteropolisakaritler, sentetik enzimler ve sentez bölgeleri açısından da farklıdır. Homopolisakkaritlerin biyosentezi sakkaroz gibi spesifik substratlar gerektirirken, heteropolisakkarit kalıntıları hücre içinde üretilir ve öncüler hücre dışı

polimerizasyon için izoprenoid glikosil taşıyıcı lipidler tarafından zar boyunca yer alır (Nwodo ve diğerleri, 2012). Heteropolisakkaritler, birden fazla monosakkarit birimi içeren polisakkaritlerdir. Doğal olarak oluşan birçok heteropolisakkarit, peptitlere, proteinlere ve bunlara bağlı lipidlere sahiptir (Kumar ve Mody, 2009). Bazı heteropolisakkarit örnekleri şunlardır:

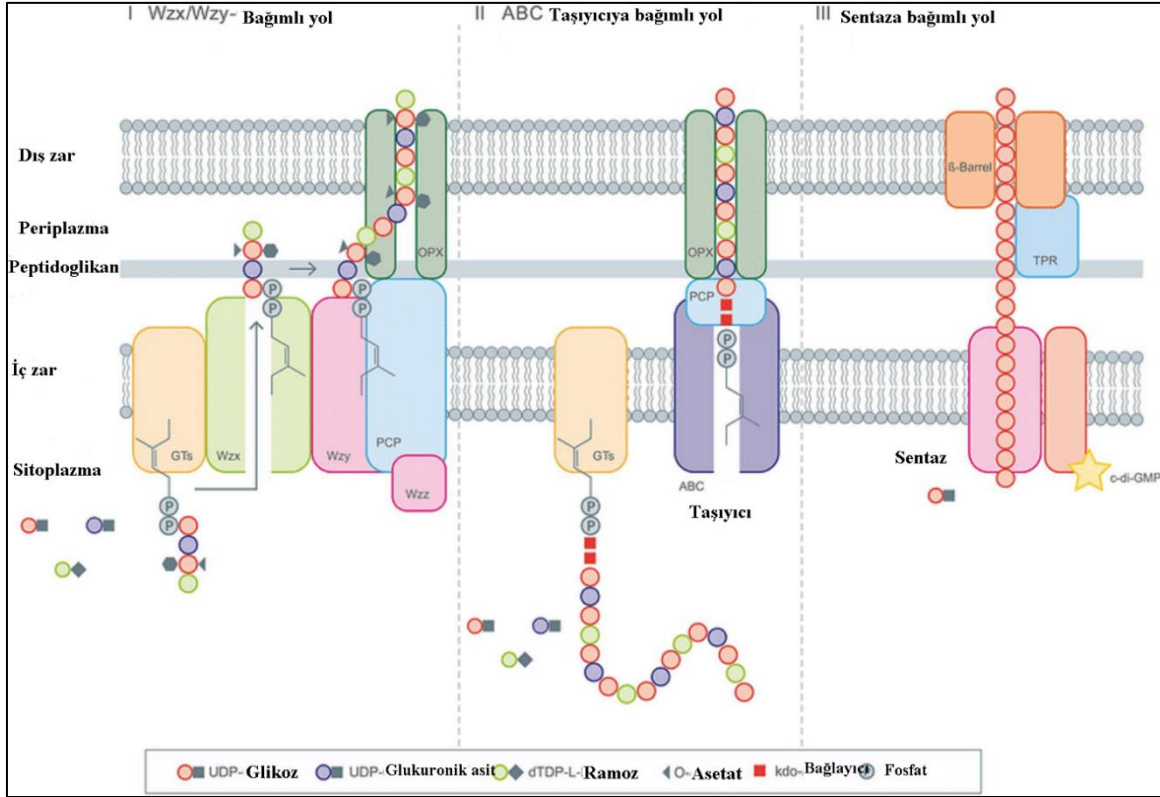
(i) Peptidoglikanlar (murein), hemen hemen tüm bakterilerin sitoplazmik zarının dışında bulunan bakteri hücre duvarının bir parçasıdır. Birincil rolü, turgora direnerek hücre bütünlüğünü korumaktır. Peptidoglikan, kısa peptitler ile birbirine bağlanan doğrusal polisakkarit zincirlerinden oluşmaktadır. Polisakkarit zincirleri, değişen N-asetilglukosamin (GlcNAc) ve N-asetilmuramik asit (MurNAc) kalıntılarını birbirine bağlayan 1,4 glikozidik bağlardan oluşmaktadır (Kumar ve Mody, 2009). GlcNAc ve MurNAc, kesin yapısı bakteri türüne bağlı olarak değişen kısa peptitler tarafından hücre duvarında çapraz bağlanan lineer polimerlerdir. Lizozim enzimi, GlcNAc ve MurNAc arasındaki -1,4 bağları hidrolize ederek bakterileri yok etmektedir. Gözyaşları, bakteri savunma mekanizması olarak işlev gören lizozimler içermektedir. Penisilin ve ilgili antibiyotikler, çapraz bağların oluşumunu bloke ederek bakterileri yok etmekte ve hücre duvarının ozmotik parçalanmaya dayanamayacak kadar kırılgan hale gelmesine neden olmaktadır (Schmid ve Sieber, 2015).

(ii) Agaroz, kırmızı deniz yosunundan elde edilen doğal bir heteropolisakkarittir ve hücre duvarlarının yapısal bir parçasıdır. Agaroz, agarbiyozun tekrarlayan birimlerden oluşan doğrusal bir polimerdir. D-galaktoz (-D-glalaktopiranoz) ve L-galaktoz türevi (3,6-anhidro—L-galaktopiranoz), agarbiyoz oluşturmak üzere -1,4 glikozidik bağlarla birbirine bağlanır. Agarbiyoz birimleri, 600-700 tortulu bir polimer oluşturmak için -1,3 glikozidik bağ ile birbirine bağlanır. Bir eter köprüsü, 3,6-anhidro—L-galaktopiranoz kalıntısındaki C3 ve C6'yı birbirine bağlar. C2 konumundaki bir sülfat esteri, 3,6-anhidro-L-galaktopiranoz kalıntılarının küçük bir yüzdesinde bulunabilir (Tang ve diğerleri, 2012).

(iii) Glikozaminoglikanlar, bitkilerde bulunmayan, yalnızca hayvanlarda ve bakterilerde bulunan heteropolisakkaritlerdir. Glikozaminoglikanlar, dokulardaki hücreleri birbirine bağlayan ve çok hücreli hayvanlarda besin ve oksijenin tek tek hücrelere ulaşması için gözenekli bir yol sağlayan hücre dışı matriste (ECM) bulunur. Glikozaminoglikanlar, tekrarlayan disakkarit birimlerinden oluşan bir lineer polimer türüdür. Bunlar, amino şekerlerin yanı sıra üronik asitleri içeren bir tür karmaşık karbonhidrattır. N-

asetilglukosamin veya N-asetilgalaktozamin, iki monosakkaritten biridir, diğeri ise normalde D-glukuronik veya liduronik asit gibi bir üronik asittir. Hyaluronik asit, kondroitin sülfat, heparin ve keratin sülfat, glikozaminoglikanların örnekleridir (Nwodo ve diğeri, 2012).

Biyopolimerler, tüm organizmaların doğal koşullar altında büyüme döngüleri sırasında üretilen polimerlerdir. Sonuç olarak, karbonhidratlar gibi doğal polimerler olarak da bilinirler (Bakshi ve diğeri, 2020). Biyopolimerler, mikroorganizmanın hücrelerinde karmaşık metabolik süreçlerle üretilir (Moradali ve Rehm, 2020). Şekil 2.10, mikrobiyal EPS'nin sentez yolunu temsil etmektedir. Biyosentetik yollar, (a) substrat sindirimini (Salazar ve diğeri, 2016), (b) ana metabolit yolunu (Tang ve diğeri, 2020) ve (c) polisakaritler sentezini (Sun ve Zhang, 2021) içerir. Substratın formuna bağlı olarak, pasif veya aktif taşıma sistemi, hücre tarafından emilebilir ve hücre içi fosforilasyon yoluyla katabolize edilebilir veya belki de doğrudan bir oksidatif periplazma geçip onu oksitleyebilir (Jiang ve diğeri, 2021). Glikoliz, sitoplazmadaki maddeyi katabolize etmek için kullanılır. Polisakkaritlerin üretimi, ağırlıklı olarak nükleosit difosfat şekerler (NDP-şekerler) olmak üzere fosforile şekerlerden üretilen enerji açısından zengin monosakkaritler olan etkili öncüllerin biyosentezini gerektirir (Mandakovic ve diğeri, 2020).



Şekil 2.10. EPS üretmek için sentez yolu (Schmid ve diğerleri, 2015)

Ekzopolisakkaritler (EPS), bakteriler, mayalar, algler, mantarlar tarafından üretilen çözünür veya çözünmez hücre dışı polimerik malzemelerdir. Kurutma, fagositoz, hücre tanıma, faj saldırısı, antibiyotikler veya toksik bileşikler ve ozmotik strese karşı en belirgin rolü oynarlar (Majee ve diğerleri, 2017). Ekzopolisakkaritler, gıda, kimya ve ilaç alanlarında ve gıda endüstrisinde özel ilgi kazanmıştır. EPS, fonksiyonel gıdaların ve nutrasötiklerin işlenmesi ve geliştirilmesinde ticari olanlara doğal gıda katkı maddesi olarak kullanılabilir (Afreen ve diğerleri, 2023). Maya ekzopolisakkaritleri, bakterilerin aksine iyi bilinen bir metabolit grubu değildir. Endüstriyel ölçekte üretimleri, temel olarak düşük biyosentez üretkenliği nedeniyle sınırlıdır. Bununla birlikte, fonksiyonel polisakkarit arayışındaki çabalar, düşük üretkenliğine rağmen, mayaların güvenli mikroorganizmalar olmaları ve tüketiciler için nadiren fırsatçı enfeksiyonlara neden olmalarından dolayı çekici bir kaynak haline getirmiştir (Rusinova-Videva vd., 2011). EPS üretimi, mayanın ikincil metabolizması ile ilgilidir ve yapısı ve fiziksel özellikleri, kültür ortamının bileşimi, pH, sıcaklık ve oksijen konsantrasyonu gibi fermantasyon koşullarını içeren birçok faktöre bağlıdır (Sanalibaba ve Çakmak, 2016). Hücresel lokasyonları, kimyasal ve fiziksel yapı özellikleri ile fonksiyonları esas alınarak mikrobiyal ekzopolisakkaritleri üç ana grup altında toplamak mümkündür. Bunlar; hücre yüzeyine kovalent bağlarla bağlı olan kapsüler polisakkaritler, hücre duvarının bir bileşeni olan polisakkaritler ve dış çevreye

salınan ya da hücre yüzeyi ile kovalent olmayan, gevşek bağlarla ilişkilenmiş polisakkaritlerdir (LAM). LAM' nın gıda endüstrisinde geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır. Üretilen EPS' nin yüzlerce polimerizasyondan sonra moleküler ağırlığının $1-2 \times 10^6$ olduğu bildirilmiştir (Hussain vd. 2017).

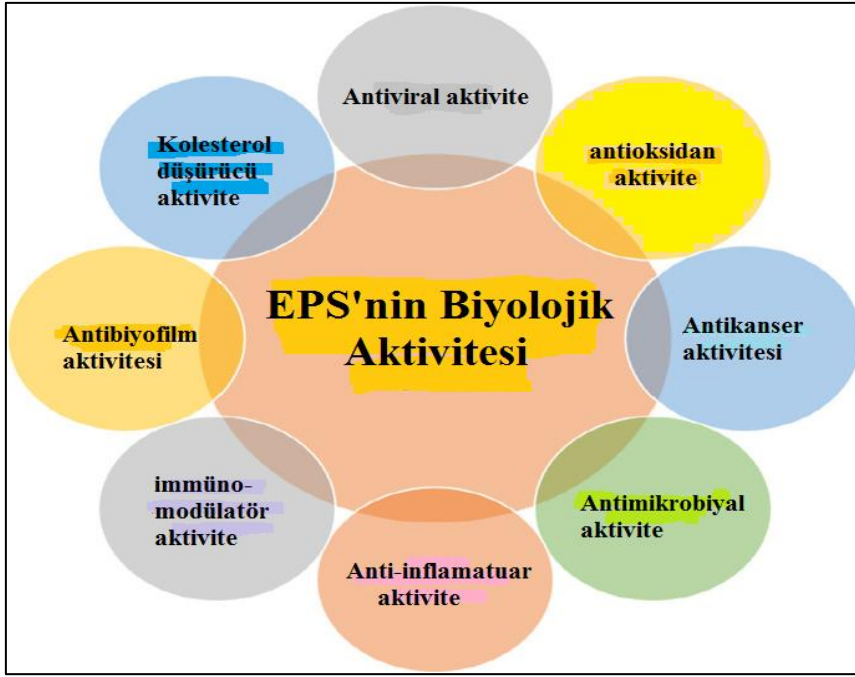
Ekzopolisakaritler, dallanmış, tekrarlayan şekerler veya şeker türevleri içeren uzun zincirli polisakkaritlerdir. Ekzopolisakkaritlerdeki başlıca şeker birimleri, farklı oranlarda glukoz, mannoz, galaktoz ve ramnozdur. Çeşitli endüstriyel uygulamalar için doğal polimerlere olan talep, ekzopolisakkaritlere olan ilginin artmasına neden olmuştur (Kharat ve diğerleri, 2018). EPS' nin fizyolojik işlevi, adezyon ve biyofilm oluşumunda rol oynayan antibiyotik, fagositoz, faj saldırısı ve fiziksel streslere karşı en önemli ve ilk biyolojik savunma sistemlerinden biridir (Rusinova-Videva vd., 2011; 2019).

Maya ekzopolimerlerinin yapısı karmaşıktır. Bunlar lineer mannanları, dallı heteropolisakkaritleri, pullulanı, galakto ve glukooligosakkaritleri içermektedir. Şekerlerin bağ yapıları α -1,2; α -1,3; α -1,6; β -1,3; β -1,4 glikozidik bağlar olabilir. Maya EPS' sinde mannoz ve glikoz monosakkaritleri en fazla bulunan monosakkaritler arasında yer almaktadırlar. Kimyasal bileşim, kültür koşullarından, özellikle karbon ve azot kaynaklarından ve ayrıca stres faktörlerinden etkilenmektedir. Maya ekzopolisakkaritlerinin biyosentezi için optimum koşullar, üretici suşların fizyolojisi nedeniyle güçlü oksijenlenme ve kültürün düşük sıcaklığını gerektirmektedir (Gientka vd. 2017). Maya ekzopolisakkaritleri, farklı şekillerde kullanılabilecek antitümör, immünostimülatör ve antioksidan aktivite gibi birçok özelliğe sahiptir. Bazıları ağır metalleri iyi emer ve bazıları da biyoaktif gıda bileşenleri olarak patentlidir (Rusinova-Videva vd. 2009). Ayrıca, maya EPS' lerinin koyulaştırıcı veya stabilizatör olarak potansiyeli gözlemlenmiştir (Chen ve diğerleri, 2016). Mikrobiyal polisakaritler ilginç ve çekici özelliklere sahiptir ve gıda, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde biyo-flokülanlar, biyo-absorbanlar ve ilaç taşıyıcı maddeler olarak kullanılmaktadırlar (Silva vd., 2019). Ekzopolisakaritler, *Pichia*, *Bullera*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Lipomyces*, *Pseudozyma Rhodotorula* ve *Sporobolomyces* cinsleri gibi birçok maya türü tarafından üretilmektedir (Rusinova-Videva ve diğerleri, 2010). Büyük miktarlarda EPS üretimi yapabilen izole psikrofilik suşlar, *Sporobolomyces*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula* ve *Pseudozyma* cinslerine aittir. Hücre dışı biyopolimer üretimi potansiyeli ile karakterize edilen mayaların kaynağının toprak olduğu bildirilmektedir (Ghada vd., 2012). Mayalardan elde edilen EPS, fermente ürünlerin

reolojisini, dokusunu ve ağız hissini iyileştirmede potansiyel uygulamaya sahiptir. Faydaları, tüketicilere sağlık yararları sağlayan suşun probiyotik özellikleri pekiştirilir (Yıldıran ve diğerleri, 2019).

Doğal polimerler, terapötik potansiyelleri nedeniyle bilimsel topluluklar arasında büyük ilgi görmektedir. Özellikle çeşitli karbonhidrat bileşimlerine sahip probiyotik mayalardan elde edilen EPS, birçok faydalı özelliğe sahiptir (Daliri ve Lee, 2015). Farklı probiyotik mikroorganizmalar, polisakkaritler formunda sağlığı geliştirici önemli özellikler gösterme yeteneklerini ifade etmede benzersiz davranışlara sahiptir. Alternatif ilaçların bu yeni çağında, bu polisakkaritler sentetik ilaçların ikamesi olarak kabul edilmektedir. EPS, tekstil, kozmetik, biyoremediasyon, gıda ve tedavi gibi çeşitli alanlarda uygulamaları bulunmaktadır (Angelin ve Kavitha, 2020).

Ekzopolisakkaritlerin Biyolojik Aktiviteleri: EPS'nin biyolojik potansiyeli, probiyotik mikroorganizmaların yetiştirilmesinde kullanılan fermantasyon koşullarından etkilenen kimyasal yapısına bağlıdır (Zannini vd., 2016). Farklı kaynaklardan elde edilen EPS, spesifik konformasyon, genişletilmiş zincir, moleküler ağırlık, monosakarit bileşimi, glikosidik bağlantı, kimyasal modifikasyonlar vb.'den etkilenmektedir (Wang ve diğerleri, 2019). Bu bileşenlerin oluşumu, EPS'nin sağlığı geliştirme faaliyetlerine katkıda bulunmaktadır. Probiyotik maya tarafından üretilen EPS, antimikrobiyal, immünomodülatör, anti-inflamatuar, antioksidan, anti-tümör, anti-viral, anti-diyabetik, anti-ülser ve kolesterol düşürücü aktiviteler gibi terapötik uygulamalarda çok önem kazanmıştır (Şekil 2.11) (Gientka ve diğerleri 2015; Shamekhi ve diğerleri, 2019).



Şekil 2.11. EPS'nin biyolojik aktiviteleri (Angelin ve Kavitha, 2020)

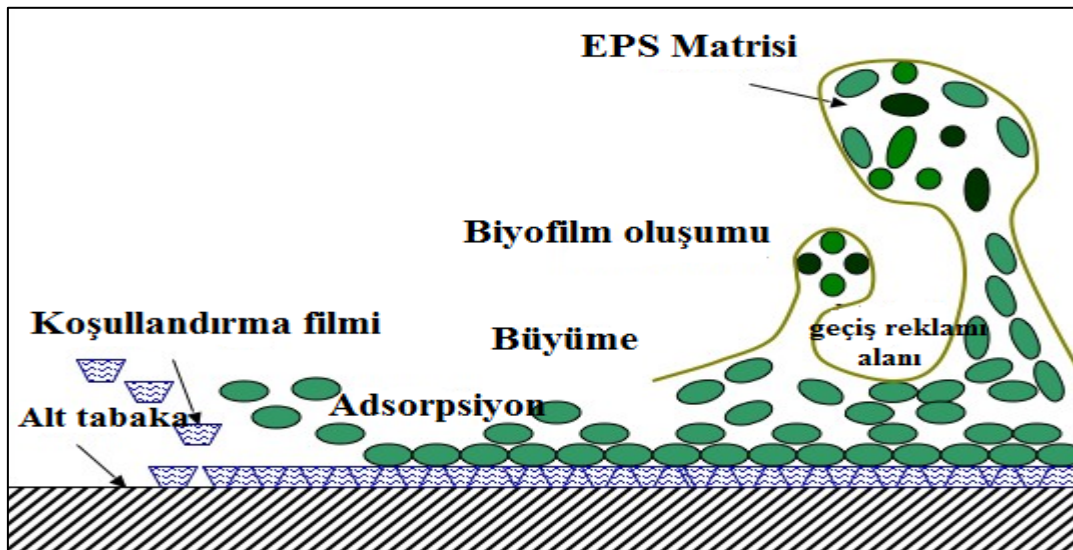
Antioksidan Aktivite: Maya, gıda işleme için güvenli bir içerik ve katkı maddesi kaynağıdır. Maya, hücre duvarındaki glutatyon, protein ve enzimler gibi antioksidan görevi görebilecek biyoaktif bileşikler sentezler. Maya özütü, maya hücrelerinin çözünür bileşenlerinin konsantreleridir ve genellikle otoliz ve plazmoliz ile üretilir. Serbest radikaller insan sağlığını büyük ölçüde etkileyebilir ve vücutta yaşlanma ve iltihaplanma gibi çeşitli hastalıklara neden olabilir; bu nedenle araştırmacılar her zaman antioksidan olan ve insan vücudunda serbest radikallerin neden olduğu zararı azaltabilecek biyopolimerler aramaktadırlar (Vargas-Ochoa vd., 2016). DPPH, süperoksit ve hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türleri (ROS), kanser, ateroskleroz, romatoid artrit ve nörodejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere insanlarda ciddi kötü etkilerden sorumlu normal hücrel metabolizmadan üretilir (Li ve diğerleri, 2014). Bu ROS tarafından oluşturulan oksidatif stres, proteinlerin hasar görmesine, DNA'da mutasyonlara, membran fosfolipidlerinin oksidasyonuna ve düşük yoğunluklu lipoproteinlerde doku hasarına ve ölüme yol açan modifikasyona neden olmaktadır (Yin ve diğerleri, 2010). Oksidatif stres, fizyolojik sistemin düzgün çalışması için insan sistemindeki oksidan ve antioksidan arasındaki dengeyi yeniden kurarak en aza indirebilir. Sentetik antioksidan maddelerin uygulanması bir çare olabilir ama aynı zamanda kalıntı etkisinden dolayı insan organlarını etkileyebilecek zararlı yan etkilere de yol açmaktadır (Bisht vd., 2019). Sentetik kimyasal maddeler kadar etkili olan doğal ürünler alternatif olarak değerlendirilebilir (Huang vd., 2005).

Bira endüstrisinde kullanılan yaygın olarak bulunan bira mayasının (*Saccharomyces cerevisiae*), sentetik kimyasal maddelerin yerine doğal maddelerden biri olduğu kanıtlanmıştır (Mojab ve diğerleri, 2003). Bira mayasının bu hücre içi aktivitesi, oksidatif stresle ilgili bozuklukların profilaksisi için kullanılabilecek potansiyel bir kaynaktır (Kaur ve diğerleri, 2007). Maya tarafından üretilen metabolitler, analjezik, antipiretik, anti-proliferatif ve sitotoksik antimikrobiyal özellikler gibi hayati farmasötik önemli maddeler sergilerler (Gous vd., 2017). Lavová ve Urminská, (2013) tarafından sunulan çalışma aynı zamanda *S. cerevisiae* suşlarının yüksek antioksidan aktivite göstermesi, beslenme veya sağlığı geliştirici özellikleri nedeniyle bir diyet takviyesi olarak uygunluğunu doğrulamıştır. *S. cerevisiae* mayasının vinil fenolik bileşikler ile antioksidan özellikleri, bu maya ekstraktının sadece bir antibiyotik olarak değil, aynı zamanda oksidanlar arasındaki dengeyi sağlamaya da yardımcı olabilecek birçok hastalığın tedavisi için potansiyel bir anti-sentetik madde olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Lavová ve Urminská, 2013). Maya biyoteknolojisi uygulamalarının çoğu *S. cerevisiae* suşları ile yapılmaktadır. Bununla birlikte, *S. cerevisiae*'nin sınırlı stres direnci, *Saccharomyces* spp. olmayan *Pichia* spp., *Debaryomyces* spp. ve *Kluyveromyces* spp. gibi mayalar üzerine daha fazla odaklanmaya yol açmıştır (Abdel-Banat vd., 2010). Bir çalışmada, 13 doğal maya izole edilmiş ve izolatların 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikal temizleme aktivitesi ile antioksidan aktiviteleri araştırılmış ve izolatlar arasında antioksidan aktivitede önemli bir değişiklik olmadığı kaydedilmiştir (Ooi vd., 2019). Kakaodan izole edilen 23 maya izolatının probiyotik olarak potansiyelleri açısından değerlendirildiği bir çalışmada, on izolat *Pichia kudriavzevii* olarak tanımlanmış suşların DPPH yöntemi ile antioksidan aktiviteleri çalışılmış ve *P. kudriavzevii* 2P10 suşunun fonksiyonel gıda geliştirme ve sağlık amaçları için umut verici bir probiyotik olabileceği açıklanmıştır (Wulan vd., 2021). Ogunremi ve diğerleri, (2015), tahıl bazlı gıdaların genel antioksidan kapasitesinin *P. kudriavzevii* OG32 tarafından fermantasyondan sonra arttığını bulmuştur. Bunun nedeninin, mayaların hücre bileşenleri veya antioksidan aktiviteye sahip metabolitleri olabileceği rapor edilmiştir.

Potansiyel antioksidan aktiviteye sahip probiyotik mayalardan EPS hakkında birçok rapor vardır. Genel olarak, bileşimlerinde %50'den fazla mannoz içeren maya EPS'lerinin biyolojik aktivitelerinin olduğu rapor edilmiştir (Van Bogaert ve diğerleri, 2009). Bununla birlikte, *Rhodotorula glutinis* tarafından üretilen, mannoz, glikoz ve arabinozdan (3.2:1.0:0.8 molar oranda) oluşan bir polimer, antioksidan, antiviral ve antitümör aktivite göstermiştir (Ghada ve diğerleri, 2012). Probiyotik maya suşu *Lipomyces starkeyi* VIT-

MN03 EPS'nin antioksidan özelliği, serbest radikal süpürücü aktivitesine dayalı olarak Ragavan ve Das (2019) tarafından değerlendirilmiştir. *L. starkeyi* VIT-MN03 den elde edilen EPS'nin radikalleri uzaklaştırabilen yaygın bir antioksidan olan askorbik asitten önemli ölçüde daha yüksek toplam antioksidan aktivite (%84), DPPH süpürme aktivitesi (%71) ve hidroksil radikal süpürme aktivitesi (%58) gösterdiği rapor edilmiştir.

Anti-biyofilm Aktivitesi: Çevre koşullarının mikroorganizmalara uyguladığı ekzojen stresin bir sonucu olarak, mikroorganizma grubu biyofilm oluşturur ve onları konakçı antagonistik aktivitesinden korumak için bağlanır. Bu biyofilmler gıda güvenliği için büyük bir tehdittir ve geleneksel tedaviye dirençlidirler (Madigan vd., 2019). Ekzopolisakkaritler, mikrobiyal biyofilmlerin geliştirilmesi ve sürdürülmesinde önemli bir yapısal ve işlevsel rol oynar. Bugüne kadar yapılan araştırmaların çoğu biyofilm oluşturan bakterilerin ekzopolisakkarit sistemlerine odaklanmış olsa da son çalışmalar *Candida albicans* ve *Aspergillus fumigatus* gibi tıbbi olarak mikroorganizmaların enfeksiyon sırasında da biyofilm oluşturduğunu göstermiştir (Sheppard ve Howell, 2016). Mantar biyofilmleri, konakçı dokulara ve biyomedikal cihazlara yapışmaya aracılık eder ve konakçı immün savunmalarından ve antifungal tedaviden koruma sağlar (Mitchell vd., 2015). Bir biyofilm, hücrelerin birbirine ve sıklıkla bir yüzeye yapıştığı herhangi bir sentrofik mikroorganizma konsorsiyumundan oluşur. Bu yapışık hücreler, hücre dışı polimerik maddelerden oluşan sümüksü bir hücre dışı matris içine gömülür. Biyofilm içindeki hücreler, tipik olarak hücre dışı polisakkaritler, proteinler, lipidler ve DNA'nın polimerik bir yığını olan EPS bileşenlerini üretir (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Biyofilmin oluşumu (Lindemann, 2018)

Mikroorganizmanın konak hücre gibi biyotik yüzeylere veya tıbbi cihazlar gibi abiyotik yüzeylere yapışmasına neden olan mikrobiyal biyofilmler antimikrobiyal dirence neden olur. Biyofilm üretimi ve gelişiminde yüzey proteinleri ve polisakkarit hücreler arası adezyonlar rol oynar (Kırmusaoğlu, 2019). Salgılanmış bir hücre dışı matrisin varlığına ek olarak, biyofilme gömülü hücreler tarafından gösterilen artan ilaç direnci aynı zamanda (i) hücre yoğunluğundaki yerel artış, (ii) akış pompalarının yukarı regülasyonu, (iii) değişimi ile zarlarındaki steroller ve (iv) stres tepki mekanizmalarının aktivasyonu da ilgilidir. Bu, biyofilmler içinde metabolik olarak uykuda olan maya hücrelerinin bir alt kümesi olan kalıcı hücrelerin başlamasına yol açar (Nett ve diğerleri, 2010). Vazquez-Rodriguez ve diğerleri, 2018, *E. coli* ile kültürlendiğinde Meksika Kuzeydoğusu *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L'den izole edilen doğal bir mayada ekzopolisakkarit üretiminin arttığını bildirmektedir. EPS'nin antibiyofilm aktivitesi, ekzopolisakkaritin antimikrobiyal spektrumunu belirlemek için bir Gram pozitif (*S. aureus* ATCC 6538) ve iki Gram negatif (*E. coli* ATCC 11229 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853) suşuna karşı analiz edildiğinde *R. mucilaginosa*'dan elde edilen EPS, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı antibiyofilm aktivitesi göstermiştir. Bu EPS antibiyofilm özellikleri, bakteri hücrelerinin dokuları ve tıbbi cihazları kolonize etmek veya endüstriyel süreci etkileyen yüzeylere tutunmak için biyofilmler oluşturduğu sağlık ve endüstriyel yerleşimlerdeki potansiyel uygulamaların engelini kaldırmaktadır. *R. mucilaginosa* UANL-001L tarafından üretilen EPS, bakteriyel biyofilm oluşumunu önlemek için yapışma önleyici veya biyolojik kirlilik önleyici madde olarak uygulamalara sahip olduğu rapor edilmiştir (Rendueles vd., 2013).

İnsanların en yaygın mantar patojeni olan *C. albicans*, enfeksiyon sırasında tıbbi cihazlarda ve mukozal yüzeylerde geniş biyofilmler oluşturur. Biyofilm matrisi çalışmaları, biyofilm yapısının geliştirilmesi ve sürdürülmesinde bir mannan-glukan kompleksi ile β -1,3-glukanların iş birliğine dayalı bir rolünü ortaya çıkarmıştır (Zarnowski vd., 2014). Mannan-glukan kompleksinin bileşenleri, hücre dışı matrikse özgü yapısal özellikler sergiler ve hücre duvarı benzerlerinde bulunmaz. Antifungal ajanları izole etmede ve mantar hücrelerinin nötrofiller tarafından tanınmasını engellemede önemli bir rol oynarlar (Xie vd., 2012).

Laktobasil ve Maya Gelişimini Düzenleyici Etki: Laktik asit bakterileri, hayvan bağırsak yolunun doğal mikrobiyotasının önemli bir bakteri grubunu oluşturmaktadır. Laktik asit bakterileri bakteriyosin sentezi, antibiyotik direnci, ekzopolisakkarit üretimi, bakteriyofaj

direnci ve gıdaların sindirilebilirliğini artırma gibi probiyotik özellikleri açısından yararlı etkileri ile öne çıkmaktadır (Sağlam ve Karahan, 2017).

EPS, çeşitli yiyecek ve içecek ürünlerinin duyuusal ve dokusal özelliklerini geliştirebilen fizikokimyasal özelliklere sahiptir. Geleneksel olarak laktik asit bakterileri ekzopolisakkaritleri fermente süt ürünlerinde önemli bir role sahiptir ve özellikle unlu mamullerin veya glütensiz ürünlerin iyileştirilmesi için uygulanmaktadır. EPS kullanımının hamurun daha fazla su emmesine, daha iyi hamur reolojisi ve işlenebilirliğine, ekmek hacminin artmasına ve ekmek bayatlama hızının azalmasına yol açtığını bildiren birçok çalışma vardır (Lynch ve diğerleri, 2018; Saadat ve diğerleri, 2019).

Laktik asit bakterilerinin ürettiği EPS'nin, T-lenfosit proliferasyonunu artırarak, makrofajları aktive ederek ve sitokin üreterek bağışıklık sistemini güçlendirdiği, böylece bağırsakta patojen kolonizasyonunu engellediği ve bağırsakları değiştirdiği bulunmuştur (Ruas-Madiedo ve Zoon, 2002). EPS'nin LGD etkisinin araştırıldığı bir çalışmada *Lactobacillus* cinsine ait bakterilerin gelişiminde kullanılan uygun besiyerinin glukoz kaynağı çıkarılıp yerine aynı oranda *L. buchneri* GM3701 ve *L. plantarum* RB-3 suşlarından elde edilen EPS'ler eklenmiştir. 24 saat inkübasyon sonunda laktobasillerin gelişimi ölçülmüş ve EPS'nin laktik asit bakterileri tarafından fermente edilebildiği bunun yanında EPS'nin laktik asit bakterilerinin gelişimini arttırdığı rapor edilmiştir (Tsuda vd., 2018). Mayalar, metabolik yollarla EPS üretmektedir (Li ve diğerleri, 2020). Maya probiyotikleri gıda endüstrileri için kritik öneme sahiptir. Probiyotik türevli EPS'ler, gıda katkı maddeleri olarak uygulanabilir veya başlatıcı mikroorganizmalar tarafından doğrudan yerinde sentezlenebilir (Fernández-Pacheco vd., 2019). Bağırsak mikrobiyotasının küçük bir oranı (<0,1) maya suşlarından oluşsa da gastrointestinal sağlık üzerinde olumlu etkileri vardır. Yüksek sayıda maya cinsi, insanlar için patojenik değildir ve insan vücudunun çeşitli fizyolojik koşullarında canlı kalabilirler. Bu fenomen, EPS'nin gıda endüstrilerinde potansiyel uygulamasına sahip prebiyotikler olarak değerlendirilmesiyle sonuçlanmıştır (Gomaa vd., 2020).

Mikrobiyal EPS açısından zengin biyolojik içerik elde etmek hala bir zorluktur. EPS üretimini daha büyük ölçekte iyileştirmeye yönelik alternatifler, EPS düzenlemesi ve biyosentezi, fermantasyon koşullarının optimize edilmesi ve tarım-gıda endüstrisinin çevresel yan ürünlerini temsil edebilen artık yan ürünlerini değerlendirmek için peynir altı

suyu (permeatı) gibi bakteri kültür ortamının formüle edilmesi hakkında daha derinlemesine bilgi gerektirmektedir (Sanalibaba ve Çakmak, 2016). Biyoteknolojide, ortak kültürün çevresel dalgalanmalara karşı daha sağlam olduğu ve farklı suşların metabolik kapasitelerinin kombinasyonu yoluyla daha karmaşık faaliyetler gerçekleştirebildiği gösterilmiştir (Smid ve Lacroix, 2013). Mikroorganizma fizyolojisini daha iyi anlamak, türler arası veya interkingdom (ökaryotlar-prokaryotlar) iletişimi sağlamak ve yeni maddeleri keşfetmek için de önemli bir araçtır (Goers vd., 2014). Karışık maya popülasyonları *S. cerevisiae* ve LAB, çok sayıda fermente üründe (kefir, kimchi, ekşi hamur, şarap ve kakao) birlikte bulunur, ancak bunların aralarındaki etkileşim tam olarak anlaşılamamıştır (Di Cagno ve diğerleri, 2014).

Prebiyotik Aktivite: Kısa zincirli yağ asitleri (SCFA), karbonhidratların mikrobiyal fermentasyonundan kaynaklanan ana ürünlerdir ve kolon epiteline enerji sağlayarak, bazı metabolik süreçleri modüle ederek, bağırsaktaki patojenik bakterileri baskılayarak ve bağışıklık uyarımı uygulayarak sağlık yararları sağlarlar (Topping ve Clifton, 2001). Spesifik karbonhidratlar, faydalı bakterileri uyardıkları kavramına dayalı olarak prebiyotik substratlar olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Flint ve diğerleri, 2008). İnülin ve fruktooligosakkaritler (FOS), başlangıçta, yararlı olduğu düşünülen ve yaygın olarak probiyotikler olarak kullanılan bağırsak mikroorganizmaları olan Bifidobakterileri seçici olarak uyaran prebiyotikler olarak önerilmiştir (Masco ve diğerleri, 2005). Başka bir araştırma, inülinin hayvanlarda ve insanlarda bağırsak mikrobiyotasını modüle edebileceği ve faydalı laktik asit üreten *Bifidobacteria* ve *Lactobacillus* türlerinin çoğalmasını teşvik edebileceğini ifade etmektedir (Delzenne vd., 2011). Ayrıca bağırsak mikrobiyotası ile diyabet ve obezite gibi metabolik hastalıklar arasındaki ilişki araştırmacılar tarafından doğrulanmıştır (Canfora vd., 2019).

Deneysel kanıtlar, inülin ve FOS'un bifidojenik etkisini doğrulamıştır (Belenguer ve diğerleri, 2006). Bununla birlikte, moleküler teknikleri kullanan ek çalışmalar ile, *Clostridium* ile ilgili türler de dahil olmak üzere çeşitli diğer bakteri gruplarının da inülin veya FOS'a yanıt verdiğini ortaya koyulmuştur (Kleessen ve diğerleri, 2001). Prebiyotiklere yanıt olarak çeşitlilik için olası açıklamalar arasında, karmaşık bağırsak mikrobiyal topluluklarının kapsamlı metabolik etkileşimleri içermesidir. Bir bakteri türü tarafından diyet prebiyotiklerinden üretilen metabolik ürünler, diğer popülasyonların büyümesini desteklemek için substratlar sağlayabilir (Falony ve diğerleri, 2006). Bazı laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS'nin insan sağlığı üzerinde sağladığı faydalı

etkileri Koraklı ve çalışma arkadaşları tarafından *Lactobacillus sanfranciscensis* suşu tarafından üretilen fruktan tipi EPS için başarıyla gösterilmiştir (Koraklı ve diğerleri, 2002). Bir çalışmada, dışkı bulamaç kesikli kültürlerinde farklı insan bağırsak *Bifidobacterium* suşlarından izole edilen ekzopolisakkaritler (EPS), bağırsak bakterileri için fermente edilebilir substratlar olarak hareket etme yetenekleri açısından glikoz ve prebiyotik inülin ile karşılaştırılmıştır. İnkübasyon sırasında, kısa zincirli yağ asitleri (SCFA) seviyelerindeki artışların EPS, glikoz ve inülin içeren kültürlerde karbonhidrat eklenmemiş kontrollere göre daha belirgin olduğu bulunmuş, bu da test edilen substratların bağırsak bakterileri tarafından fermente edildiğini göstermiştir (Salazar ve diğerleri, 2008). EPS ve inülin ile inkübasyon sırasında SCFA'nın molar oranlarındaki kaymaların asetik asit-propiyonik asit oranında bir azalmaya neden olduğu durumlarda, prebiyotiklerin hipolipidemik etkisinin olası bir göstergesi olduğu ifade edilmiştir (Salazar ve diğerleri, 2008).

Gıda kaynaklı patojenlerin neden olduğu gastrointestinal enfeksiyonlar önemli bir klinik problemdir. Gıda kaynaklı patojenlerin bağırsak yolunda hayatta kalması, diyet prebiyotikleri tarafından potansiyel olarak modüle edilebilir. Fruktoligosakkaritler (FOS) ve inülini içeren prebiyotikler, kolondaki bir veya sınırlı sayıda bakterinin büyümesini ve/veya aktivitesini seçici olarak uyararak bağırsak enfeksiyonlarına karşı direnci artırabilir (Gibson ve Roberfroid, 1995). Diyet prebiyotikleri tarafından endojen mikrofloranın uyarılması (Kleessen ve diğerleri, 2001), organik asitlerin üretilmesi ve besinler ve mukozal yapışma bölgeleri için rekabet ederek bağırsak patojenlerinin kolonizasyonunu engelleyebilir (Orrhage ve Nord, 2000). Bununla birlikte, FOS'un istilacı gıda kaynaklı patojen *Salmonella enterica* serovar Enteritidis'e karşı direnci azalttığı da gösterilmiştir (Ten Bruggencate vd., 2003). FOS'un bağırsak mikroflorası tarafından hızlı fermantasyonu, yüksek lümen organik asit konsantrasyonlarına yol açmaktadır. Bu organik asitler, mukozal bariyere zarar verebilir ve dolayısıyla bağırsak patojenlerine karşı direnci azaltabilir (Bovee-Oudenhoven vd., 2003). Ayrıca, önceki çalışmalar, inülin ve FOS'un sıçanlarda ve insanlarda bağırsak bifidobakterilerini ve laktobasilleri uyardığını göstermiştir (Kleessen ve diğerleri, 2001).

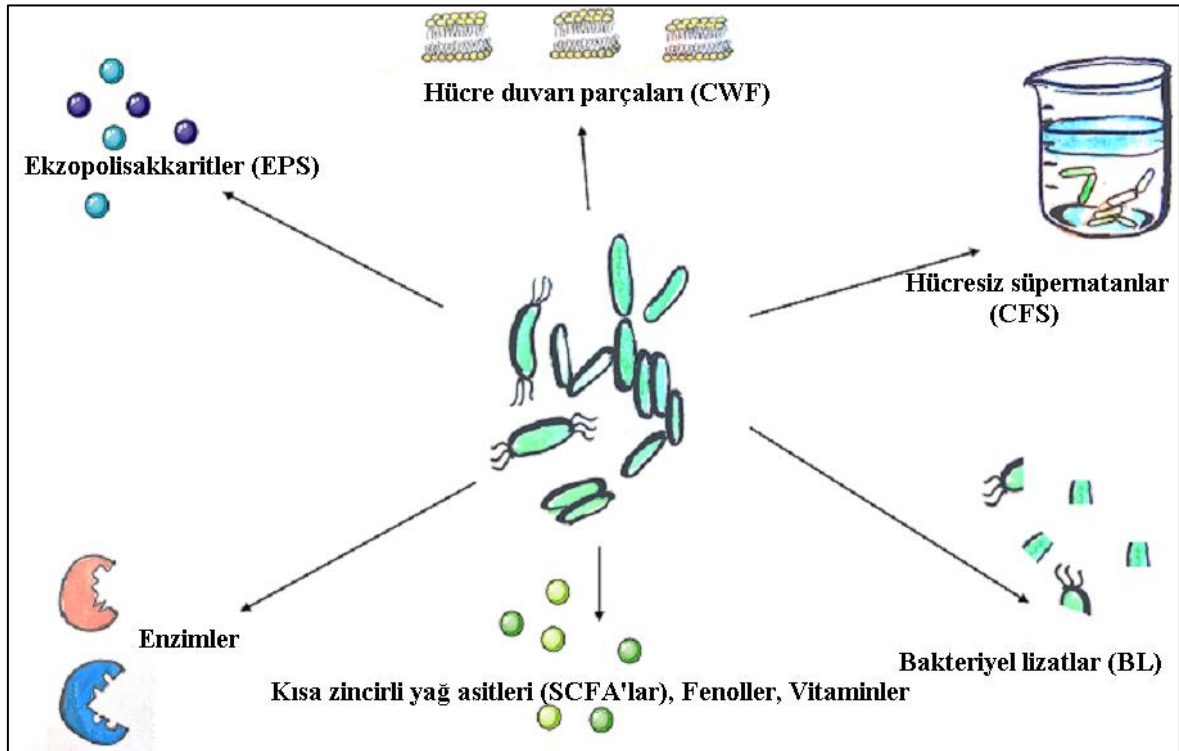
Bir çalışmada, inülin ve FOS, bağırsak mikroflorasının uyarılmasına rağmen, çekumda *Salmonella* kolonizasyonunu arttırmıştır (Ten Bruggencate ve diğerleri, 2004). Hem inülinin hem de FOS'un fermantasyonu, yüksek fekal laktat konsantrasyonu ve düşük çekal pH ile gösterilen, distal bağırsakta 33 organik asitlerin üretimi ile sonuçlanmıştır. Organik

asitlerin ve diğer fermentasyon metabolitlerinin birikmesi, mukozal bariyerin tahriş olmasına ve bozulmasına neden olabilmektedir (Letellier ve diğerleri, 2000). Bağırsak mukozası, mukus atılımını artırarak bu tahriş edici bileşenlere yanıt vermektedir (Barcelo ve diğerleri, 2000). Birkaç çalışma, laktobasil ve bifidobakterilerin prebiyotik karbonhidratları fermente etme yeteneğinin hem suşa hem de substrata özel olduğunu göstermiştir (Schrezenmeir ve de Vrese, 2001; Watson vd., 2013; Renye vd, 2021). Ek olarak, belirli suşların seçici büyümesi için hangi prebiyotik karbonhidratların en uygun substratlar olduğu açık değildir. *In vitro* fermentasyon koşulları sırasında prebiyotiklerin fonksiyonel aktivitesini belirlemek için birkaç kantitatif yaklaşım geliştirilmiştir. Genel olarak, bu yöntemler, belirli bir prebiyotiğin belirli etkiler üretme nispi kabiliyetini yansıtan ve mikrobiyal popülasyonların, büyüme oranlarının, substrat asimilasyonunun ve/veya kısa zincirli yağ asidi üretiminin ölçümüne dayanan indeksler sağlamaktadır (Vulević vd., 2004; Sanz ve diğerleri, 2005). İndeksler daha sonra çeşitli karbonhidratları karışık mikrofloranın belirli üyelerinin büyümesini teşvik etme potansiyellerine göre sıralamak için kullanılmıştır. Bununla birlikte, prebiyotiklerin fermentasyonu prebiyotiğin türü yerine bakteri türüne bağlı olduğundan, özellikle kullanım amacı için belirli bakteri türleri tarafından prebiyotik metabolizmasının ne ölçüde gerçekleştiğini anlamak önemlidir (Dahiya ve Nigam, 2022).

2.2.3. Postbiyotikler

Postbiyotik terimi, uluslararası bilimsel probiyotikler ve prebiyotikler derneği (ISAPP) tarafından "canlı organizmalarla ilgili veya bunlardan kaynaklanan" olarak tanımlanan "biyotik" ile "sonra" anlamına gelen bir önek olan "post" un bir bileşimi olarak seçilmiştir. Bu terimler bir arada 'yaşamdan sonra' anlamına gelir; yani cansız organizmalardır (Salminen ve diğerleri, 2021). Bu malzemeleri tanımlamak için çeşitli tanımlar da kullanılmıştır, postbiyotikler probiyotiklerin/hücreli süpernatantların (CFS) metabolitleri veya fermentasyon gibi bağırsaktaki probiyotik aktiviteden kaynaklanan bileşenlerdir (Gibson ve diğerleri, 2017). Postbiyotiklere ilgiyi artıran önemli bir faktör hem endüstriyel işlemler hem de depolama sırasında doğal stabiliteLERİDİR. Birçok probiyotik organizma oksijene ve ısıya duyarlı olduğundan, canlı mikroorganizmaların stabilitesini korumak teknolojik bir zorluktur, ancak cansız mikroorganizmalar için uzun raf ömrüne sahip ürünler kolayca elde edilebilir. Güvenilir soğuk zincirleri olmayan veya ortam sıcaklığının canlı mikroorganizmaların depolanması için sorunlara neden olduğu coğrafi bölgeler için postbiyotikler ayrıca probiyotiklerden daha uygun olabilir. Farklı postbiyotik türleri vardır

(Şekil 2.13). Bunlar arasında; kısa zincirli yağ asitleri (SCFA'lar), safra tuzu hidrolazı (BSH), lipopolisakkaritler (LPS), hücre dışı polisakkaritler, hücre duvarı parçaları (CWF), bakteriyel lizatlar (BL), hücre dışı süpernatantlar (CFS) ve gibi çeşitli diğer metabolitler (vitaminler, amino asitler, mikrobiyal ilişkili moleküler model (MAMP), model tanıma reseptörü (PRR), T hücresi reseptörü, TH hücresi, T yardımcı hücresi, Treg hücresi ve düzenleyici T hücresi yer almaktadır (O'Grady ve diğerleri, 2019; Salminen,ve diğerleri, 2021). Hücre dışı süpernatantlar (CFS), mikrobiyal büyümeden geride kalan metabolitleri ve büyüme ortamından emilmemiş herhangi bir besin maddesini içeren sıvılardır. Mikroorganizmalar fermente edildiğinde oluşan CFS, antiinflamatuar, antioksidan ve antitümör özelliklere sahiptir ve ayrıca ishali tedavi etmek için kullanılmaktadır (Lee ve ark., 2022).



Şekil 2.13. Postbiyotikler sınıflandırmanın şematik gösterimi (Żółkiewicz ve diğerleri, 2020)

Mikroorganizmalar arasında hassas ve karmaşık ekolojik ilişkiler vardır. Aynı ortamda yaşarken, mikroorganizmalar arasında besinler için karşılıklı talep veya rekabet ve metabolitlerin karşılıklı kullanımı söz konusu olabilir. Bunların metabolitlerinin etkileşimleri, ortak kültür sistemlerinde verimi etkiler. Laktik asit bakterileri (LAB) ve mayalar uzun süredir günlük üretiminde kullanılmaktadır. Fermente ürünler eşsiz lezzet maddeleri içerir ve dokuları iyileştirilir. Bu nedenle fermente gıda üretmek için sıklıkla

birlikte kullanılırlar (Kadian ve diğerleri, 2021). Fermantasyonunda LAB ve maya kullanımı, tek başına LAB ile karşılaştırıldığında antioksidan aktiviteyi önemli ölçüde iyileştirmiştir (Freire ve diğerleri, 2017). Bunun nedeni, mayanın antioksidan aktivitesinin LAB'ninkinden daha fazla olması olabilir (Gil-Rodriguez ve diğerleri, 2015). Ekşi mayanın maya ile fermantasyonu ekmeğin lezzetini, dokusunu ve raf ömrünü iyileştirmiştir (Plessas ve diğerleri, 2008). Ayrıca ortak kültür, gıdalardaki mikotoksin düzeylerini de azaltmıştır (de Melo Pereira ve diğerleri, 2016). Maya ve bakteri tarafından üretilen amino asitler, vitaminler ve piruvatlar, gıdaların ve günlük ürünlerinin kalitesini iyileştirmek için kullanılabilir (Viljoen ve Greyling, 1995).

LAB tarafından üretilen CFS, organik asitler, proteinli moleküller ve yağ asitleri nedeniyle antibakteriyel etkiye sahip olabilir. Diğer bileşiklerle birlikte laktik ve asetik asit, LAB kaynaklı CFS'nin antibakteriyel aktivitesinden birincil derecede sorumludur (Mani-López, ve diğerleri, 2022). Farklı mikroorganizma kültürleri veya suşları, değişen aktivitelerle CFS üretilir. *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus casei*'den üretilen CFS'nin antioksidan ve antiinflamatuvar etkilere sahip olduğu bulunmuştur (De Marco ve ark., 2018). *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium*'un *E. coli* suşlarını inhibe ederek antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir (Khodaii vd., 2017). *Saccharomyces bouldarii* gibi maya kültürleri de antioksidan ve antiinflamatuvar aktivite gösterirken (De Marco ve diğerleri, 2018), *Lactobacillus rhamnosus* GG ve *Lactobacillus casei* kolonda antikanser özellikler göstermiştir (Escamilla ve diğerleri, 2012). CFS, güvenli bakteri ve mayadan üretildiklerinden, yaygın antimikrobiyallere bir alternatif olarak kullanılma potansiyeline sahiptir ve insan sağlığı için güvenli kabul edilebilir (Mani-López ve ark., 2022).

Postbiyotikler, aktif mikroorganizmaların etkinliğini arttırmanın veya onları fonksiyonel bileşenlere dönüştürmenin yolunu açabilmektedir. Buna ek olarak, yüksek dozlarda üründe canlı ve kararlı mikroorganizmaların etkin bir şekilde kolonizasyonu ve korunmasına yönelik teknik zorlukların üstesinden gelebilmektedir (Olle, 2013). Postbiyotikler, bağırsak mikroorganizmalarının varlığından ve hayatta kalmasından doğal olarak ortaya çıkar ve terapötik prosedürlerle doğrudan eklenir (Fiore ve diğerleri, 2005). Araştırmalar, probiyotiklere atfedilen olumlu etkilerin çoğunun aslında postbiyotiklerden kaynaklandığına dair kanıtlar sunmaktadır (Gibson vd., 2017; Sadeghi vd., 2022). Ayrıca, sağlıklı bir prebiyotik popülasyonunu başka bir şekilde teşvik ederek, prebiyotiklerin uygun şekilde işlenmesi için temeller sağlayabilirler (Swanson ve diğerleri, 2020). Postbiyotikler probiyotik fermantasyonun bir yan ürünü olduğundan, postbiyotiklerin

doğrudan kaynağı probiyotiklerdir (Dunand ve diğerleri, 2019). Postbiyotik üreten suşlar, bakteri ve mantar türleri olan *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Akkermansia muciniphila*, *Saccharomyces boulardii*, *Eubacterium hallii*, *Faecalibacterium* dur (Thorakkattu ve diğerleri, 2022). Bağırsaktaki postbiyotik konsantrasyonunu artırmaya yardımcı olabilecek yiyecekler arasında ise yoğurt, lâhana turşusu, miso çorbası, yumuşak peynirler, kefir, ekşi mayalı ekmek, yağlı süt, turşu gelmektedir. Ayrıca postbiyotikler laboratuvarlarda üretilip, tedavi amaçlı kullanılmak üzere ekstrakte edilebilmekte, hap ve direkt uygulama yoluyla iletilebilmektedir (Dunand ve diğerleri, 2019).

Postbiyotikler bağırsakta sağlığı geliştiren birkaç önemli fonksiyondan sorumludur. Kan şekerini düşürmeye ve obeziteyi önlemeye yardımcı olabilir (Holmes ve diğerleri, 2012). Birkaç araştırma çalışması, postbiyotiklerin immünomodülatör (Żółkiewicz, et al., 2020) ve klinik olarak önemli etkilere sahip olabileceğini göstermiştir ve sağlıklı bireylerde kullanımlarının genel sağlığı iyileştirdiği ve bebeklerde ve çocuklarda reflü gibi bir dizi hastalıkta semptomları hafiflettiği bildirilmiştir (Wegh ve ark., 2019). Yakın tarihli bir çalışma (Morales-Ferre ve diğerleri, 2022), anne sütünde bulunana benzer bir postbiyotik ve prebiyotik kombinasyona dayalı bir formülasyonla günlük takviyenin sonuçlarını, bir rotavirüs (RV) enfeksiyonu modelinde araştırmışlardır. Araştırmacılar, *Lactofidus*TM, kısa zincirli galaktooligosakaritler (scGOS)/uzun zincirli fruktooligosakharit (lcFOS) ve bunların kombinasyonunun emziren farelerde RV'nin neden olduğu ishali önlediği ve azalttığı sonucuna varmışlardır.

Postbiyotik takviye, irritabl bağırsak sendromu ve inflamatuvar bağırsak hastalığı semptomlarının yanı sıra solunum yolu enfeksiyonlarını önlemeye yardımcı olabilir (Thorakkattu ve diğerleri, 2022). Postbiyotikler ayrıca antiinflamatuvar, antioksidan, antibiofilm ve antikanser özelliklere de sahiptir (Żółkiewicz ve diğerleri, 2020). Chang ve diğerleri (2020), *Lactiplantibacillus plantarum* suşlarının organik asit üretimi ile postbiyotik metabolitler arasındaki pirol türevleri gibi hücre içi bileşenleri ve başarılı oksidatif inhibitör aktivitesi arasında pozitif bir bağlantı bulunduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca, *Lactobacillus casei* ve *Bacillus coagulans* suşlarından elde ettikleri postbiyotiklerin çok işlevli özelliklerinin *in vitro* değerlendirmelerini yaparak, postbiyotiklerin antioksidan aktivitelerini ortaya koymuşlardır (Aguilar-Toala ve diğerleri, 2020). Diğer bir çalışmada, *Lactobacillus* spp.'nin üç farklı suşundan elde edilen postbiyotiğin patojenik organizmaların kolonizasyonunu önleme potansiyeli olduğunu bildirmişlerdir (Moradi ve ark. 2019; 2021). LAB türlerinin üç suşunun hepsinde

%50'sinin üzerinde *Listeria monocytogenes*'in biyofilm oluşumu engellediğini gözlemişlerdir. Araştırmacılar, kontrollü patojenik mikrobiyal büyümeyi engelleden LAB'nin postbiyotiklerin (bakteriyosinler, hidrojen peroksit, organik asitler vb.) salgılanmasıyla ilişkilendirmişlerdir.

Etki Mekanizmaları: Heterojen bir bileşen karışımı olabilen bir postbiyotiğin, hedef konakta bir sağlık etkisine aracılık etme yeteneği, birçok farklı mekanizma tarafından yönlendirilebilir. Bu tür mekanizmalar bağımsız olarak veya kombinasyon halinde hareket edebilir. Postbiyotikler cansız olduğundan, bu biyoaktif moleküller, inaktivasyondan önce progenitor mikroorganizmalar tarafından ve yararlı bir etkiyi indüklemek için yeterli miktarlarda sentezlenmelidir. Efektör moleküllerin aktivitesi ve postbiyotiklerin hücresel yapısı, bağışıklık reseptörleri ile etkileşimlerde artan aktivite veya konakçıda aktif moleküllerin kalış süresini artırarak korunur (Salminen ve diğerleri, 2021). Biyomalzemelerin gıda ve ilaç endüstrilerinde yaygınlaşması, uygun endüstriyel koşullarda ve kalite kontrol standartlarına sıkı sıkıya bağlı kalınarak üretilmesi ihtiyacını artıracaktır. Bu çalışmalar güvenli, doğal, temiz, bozulmamış ürünlerin üretilmesine ve böylece insan sağlığının korunmasına yardımcı olacaktır. Bu nedenle, postbiyotikler sürekli gelişmektedir ve gelecekteki araştırma yönleri, postbiyotiklerin sağlık etkileri ile bunların spesifik mekanizmaları arasındaki ilişkiyi kurmaya vurgu yapmalıdır (Thorakkattu ve diğerleri, 2022).

Postbiyotiklerin beş etki mekanizması olduğu varsayılmaktadır; (i) yerleşik mikrobiyotanın modülasyonu, (ii) epitel bariyer fonksiyonlarının geliştirilmesi, (iii) bağışıklık tepkilerinin modülasyonu, (iv) sistemik metabolik yanıtların modülasyonu ve (v) sinir sistemi yoluyla sinyal verme (Feng ve diğerleri, 2018; Iwasaki ve diğerleri, 2019; Gao ve diğerleri, 2019). Postbiyotiklerin, konaktaki etki mekanizmalarını daha iyi anlamak için ek araştırma yapılmalıdır.

2.2.4. Sinbiyotik

Sinbiyotik, tek bir üründe hem prebiyotiklerin hem de probiyotiklerin bir kombinasyonuna verilen bir terimdir. Bilim insanları yakın zamanda bunları "canlı mikroorganizmalar ve konakçı mikroorganizmalar tarafından seçici olarak kullanılan substrat(lar)dan oluşan ve vücuda sağlık yararı sağlayan bir karışım" olarak tanımlamışlardır (Salminen ve diğerleri, 2021). 'Sinbiyotik' terimi nispeten yenidir, ancak probiyotikler ve prebiyotiklerin bir

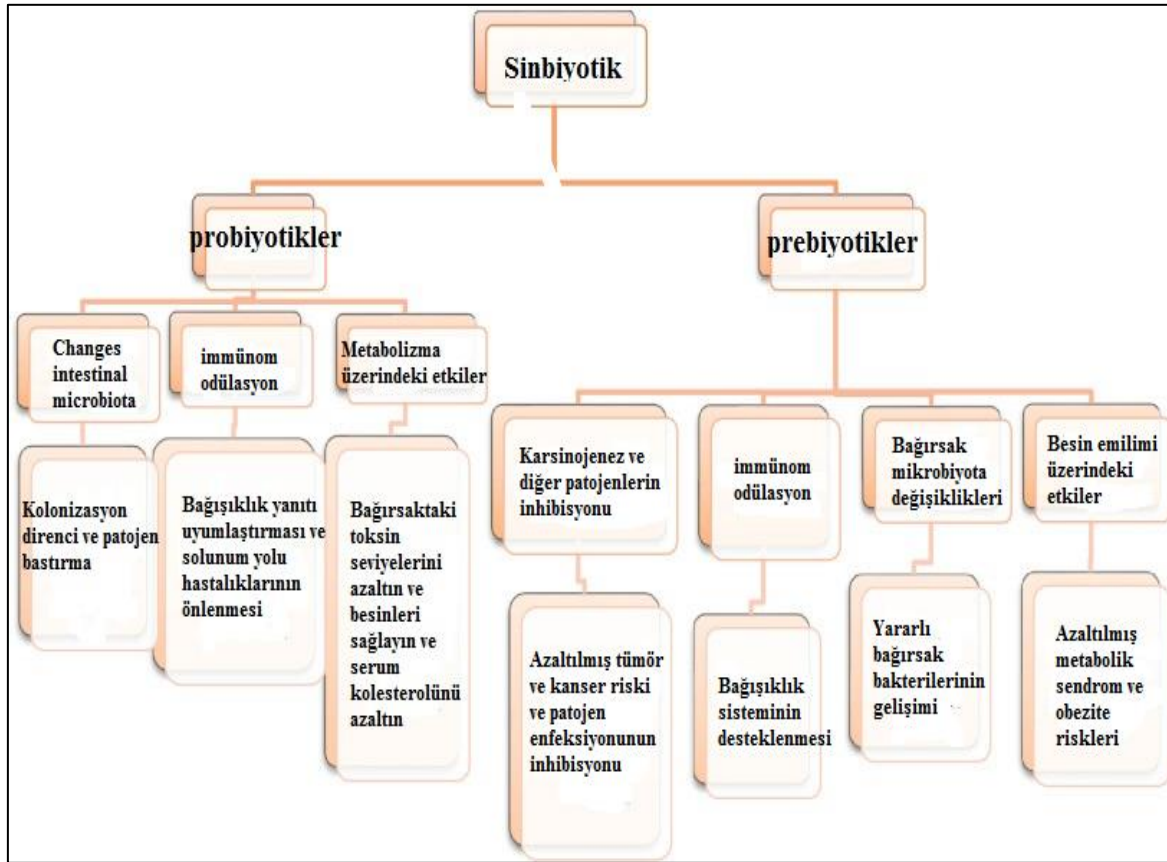
karışımını içeren takviyeler aslında uzun yıllardır mevcuttur. Sinbiyotikler, "sinerjistik" etkileri nedeniyle probiyotik ve prebiyotik bileşenler, bağırsakta yaşayan mikroorganizmaların popülasyonlarını olumlu yönde etkilemek için birlikte çalışırlar (Guiné ve Silva, 2016). Sinbiyotikler, dost bakterileri ve iyi bakteriler için uygun bir besin kaynağını tek bir takviyede birleştirdiklerinden, bağırsak mikrobiyomunun sağlığını geliştirmek için her zaman çekici bir seçim olmuştur. Takviye olarak veya gıdalarda sinbiyotik alınabilir. Araştırmacılar bunları makarnaya, içeceklere, şekerlemeye ve yoğurda eklemişlerdir (Szulofman ve Shemesh, 2021).

Uluslararası Bilimsel Probiyotikler ve Prebiyotikler Derneği'ne (ISAPP) göre, sinbiyotikler ayrıca iki alt gruba ayrılabilir: (i) tamamlayıcı sinbiyotikler ve (ii) sinerjik sinbiyotikler. Tamamlayıcı bir sinbiyotik, yerleşik bir probiyotik ve prebiyotikten oluşurken, sinerjik bir sinbiyotik, birlikte uygulanan mikroorganizma (mutlaka probiyotik değil) tarafından seçici olarak kullanılan bir substrattan (mutlaka bir prebiyotik değil) oluşur (Swanson ve diğerleri, 2020). Sinbiyotiklere Bifidobakteriler ve Fruktooligosakkaritler (FOS); *Lactobacillus rhamnosus* GG ve inülinler; FOS veya inulinler veya galaktooligosakkaritler (GOS) içeren bifidobakteriler veya laktobasiller ve Polifenol örnek verilebilir (Thilakarathna ve diğerleri, 2018).

Sinbiyotiklerin Etki Mekanizmaları: Bağırsak biyoyapısının korunması, faydalı mikrobiyota gelişimi ve GI yolunda bulunan potansiyel patojenlerin eşzamanlı inhibisyonu ile bağırsaktaki metabolik aktivitenin modülasyonu şeklinde ifade edilmektedir. Sinbiyotiklerin etkisi sonucu istenmeyen metabolitlerde bir azalma ve nitrozaminlerin ve kanserojen maddelerin inaktivasyonu meydana gelir. Bu ayrıca artan SCFA, keton, karbon disülfid ve metil asetat seviyelerinin bir sonucu olarak konağın sağlığı üzerinde olumlu etkilere yol açar (Gyawali ve Ibrahim, 2019). Sinbiyotikler, kolonda probiyotiklerin hayatta kalmasını ve implantasyonunu iyileştirerek, sağlığı teşvik eden bakterilerin (probiyotikler) büyümesini seçici olarak uyararak ve sindirim sisteminin mikrobiyal bileşimini iyileştirerek konağı faydalı bir şekilde etkilemek üzere tasarlanmıştır (Şekil 2.14).

Alerjisi olan bebeklerde anormal bir bağırsak mikrobiyotası olduğuna dair kanıtlar (Pabst ve Mowat, 2012) ve bağırsak mikrobiyotasının bağışıklık sistemi olgunlaşması üzerindeki kilit rolü (Arrieta ve diğerleri, 2014) göz önüne alındığında, uygun bir bağırsak mikrobiyotasının geliştirilmesi için sinbiyotikler güçlü bir aday olarak görülmektedir.

Yüksek alerji riski olan bebekler ve hali hazırda alerjisi olan bebekler için bebek formülünde kullanım için pre- ve probiyotik (sinbiyotik) karışımı kullanımı önerilmektedir. Prebiyotiklerin bir sinbiyotik karışımı (9:1 oranında scGOS/lcFOS veya scFOS/lcFOS) ve probiyotik suş *Bifidobacterium breve* M-16V şimdiden umut verici sonuçlar vermiştir. Bu sinbiyotik kombinasyonun, randomize, çift kör, kontrollü bir çalışmada sezaryen ile doğan 153 bebeklerde (vajinal yolla doğan bebeklere kıyasla) gecikmiş bifidobakteri kolonizasyonunu telafi ettiği rapor edilmiştir (Chua ve diğerleri, 2017).



Şekil 2.14. Sinbiyotiklerin etki mekanizması (Kaura ve diğerleri, 2021)

Sinbiyotik (inulin ve *Bifidobacterium* spp.'nin birlikte olduğu) etkilerini araştırıldığı bir çalışmada sağlıklı gönüllülerde ve dışkı örneklerinde bifidobakteri sayısında genel bir artış olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, yalnızca prebiyotik uygulanan gruplarda bifidobakteri popülasyonunda hiçbir gelişme olmadı bildirilmiştir (Bouhnik ve diğerleri, 2007). Sağlıklı kadınlarda 7 hafta boyunca *Lactobacillus acidophilus* + *B. longum* + FOS içeren sinbiyotik yoğurt tüketiminin ardından LDL/HDL kolesterol oranlarında önemli iyileşme gözlemlendiği ifade edilmiştir (Dahiya and Nigam, 2022). Arena ve diğerleri (2014), beta-glukan hapları içeren bir sinbiyotik ve bir laktobasil probiyotik suşunun konakçı hücreler üzerindeki *in*

vitro immünomodölatör etkiler üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Eşlik eden kombinasyonların umut verici sonuçlar gösterdiği bildirilmiştir. Ancak konakçı üzerindeki fizyolojik ve metabolik etkilerinin belirlenmesi için daha fazla çalışmaya ve daha uzun takip sürelerine ihtiyaç vardır (Lemaire ve ark., 2018).

S. boulardii ile probiyotik gıdaların formüle edilmesindeki son gelişmelere rağmen, maya, gıda matrislerinde nadiren sinbiyotikler ve postbiyotikler olarak uygulanmıştır. *S. boulardii* içeren gıdalara prebiyotik veya sinerjistik bir substrat eklenmesi, duyuşal özellikleri iyileştirmenin yanı sıra canlılığını ve etkinliğini artırabilir. Canlı olmayan *S. boulardii*, bunun hücre yapıları ve isteğe bağılı olarak fermantasyon metabolitlerini içeren gıdalar, stabilite ve güvenlik endişeleri olmaksızın canlı probiyotiğe eşdeğer işlevsellik sunabilir (Chan ve Liu, 2022).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Maya Suşu

Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji ve Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan Barhi Hurması, Irak da satışa sunulan hurma örneğinden izole edilen ve 18S rRNA dizi analizi ile moleküler tanımlaması yapılan *Pichia kudriavzevii* JD2 maya suşu (Akef, 2018) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan test bakterileri ve maya (Çizelge 3.1) Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Bölümü Kültür kolleksiyonundan temin edilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan bakteriler ve suş kodları

Bakteri/Maya	Kod
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11229
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>Plantarum</i>	DSM20246
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 29212
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BU19

3.2. Besiyerleri, Tampon ve Çözeltiler

Çalışma kapsamında kullanılan besiyeri, tampon ve çözeltilerin içerikleri Çizelge 3.2'de verilmiştir. Sıvı besiyeri hazırlamak için, çizelgede belirtilen miktarlarda maddeler tartılıp, bir miktar distile su ile maddeler tamamen çözülünceye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Maddeler tamamen çözüldükten sonra son hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmış ve uygun pH değerlerine ayarlanmıştır. Katı besiyeri hazırlamak için ise, sıvı ortama %1,5 Agar (Merck) ilave edilmiştir. Besiyerleri, tampon, çözeltiler ve kullanacak cam malzemeler 121°C'de 15 dakika otoklavda (Sanyo) steril edilmiştir. Sıcaklığa duyarlı tüm malzemelerin sterilizasyonu için ise 0,22 µm çapa sahip steril şırınga ucu membran filtreler (Whatman) kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri, tampon ve çözeltilerin içerikleri

Besiyeri/Çözelti/Tampon	İçerik/L
YPD (Maya Ekstrakt-Pepton-Dekstroz)	20 g D-Glikoz; 10 g Maya Ekstraktı; 20 g Pepton pH $6,5 \pm 0,2$
NB (Nutrient Broth)	10 g Pepton; 10 g Et özütü; 5 g Sodyum Klorür pH $7 \pm 0,2$
PBS Tamponu Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi	8,00 g Sodyum klorür; 0,20 g Potasyum klorür; 1,44 g Disodyum fosfat; 0,24 g Potasyum fosfat pH $7,0 \pm 0,2$
MRS (sıvı besiyeri içeriği)	10 g Pepton; Glukoz 20 g; 5 g Sodyum asetat; 5 g Yeast extract; 10 g Beef extract; 2 g Dipotasyum fosfat; 2 g Amonyum sitrat 0,2 g Magnezyum sülfat; 0,05 g Mangenez sülfat; 1,08 mL Tween 80 pH $6,2 \pm 0,2$
M9 minimal besiyeri	3,0 g KH_2PO_4 ; 6,0 g Na_2HPO_4 ; 1 g NH_4Cl ; 0,5 g NaCl ; 0,003 g CaCl_2 pH $6,2 \pm 0,2$

3.3. Kültürün Saklanması

Yeast Peptone Dextrose (YPD) sıvı besiyerine %2 oranında inoküle edilen *P. kudriavzevii* JD2 maya suşu, 37°C’da 24 saat inkübe edilmiş (Binder-78532), ardından 5000 rpm’de 5 dakika santrifüj (Nüve-NF 800) edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve hücreleri içeren pellet 1 mL steril serum fizyolojik (SF; %0,85 NaCl, Merck) ile iki kere yıkanmıştır. Daha sonra hücreler %50 gliserol (Merck) ile süspanse edilerek kriyoviallere aktarılmış ve -80°C’da saklanmıştır. Altı ayda bir stoklar yenilenmiştir (Stanislaw ve Todorov, 1999).

3.4. *P. kudriavzevii* JD2 Maya Suşunun Bazı Probiyotik Özellikleri

3.4.1. Antikolesterol aktivite

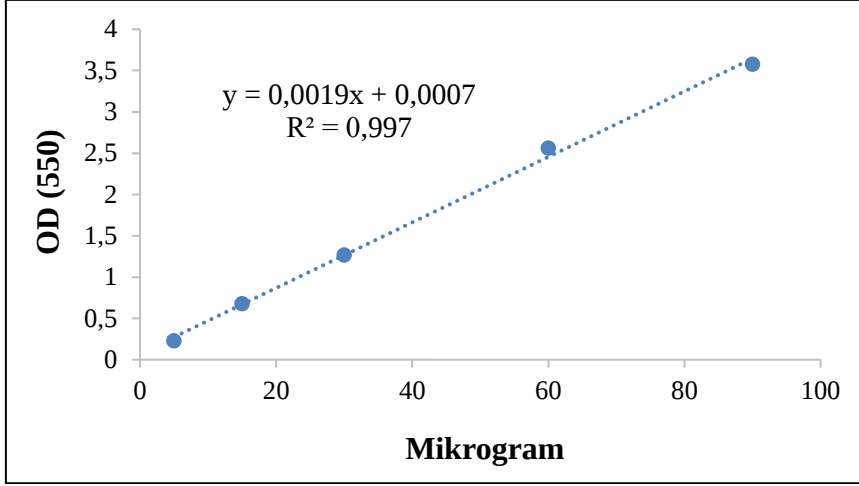
P. kudriavzevii JD2 maya suşunun kolesterol giderimleri, kolesterol giderim mekanizmalarından biri olan kolesterol ile dekonjuge safra tuzların düşük pH’da birlikte presipitasyonu yöntemine göre Yıldız vd. (2011)’nin modifiye ettiği metoda göre belirlenmiştir.

- %0,2, %0,4 ve %0,6 safra tuzları (oxgall) ve 100 µg/mL kolesterol (Sigma) 5 mL’lik YPD sıvı besi ortamına ilave edilmiştir. Ayrıca, prebiyotik ilavesinin kolesterol giderimine etkisini belirlemek amacıyla, 10 mg/mL EPS_{JD2} , %0,2, %0,4 ve %0,6 safra

tuzları (oxgall) ve 100 µg/mL kolesterol (Sigma) 5 mL'lik YPD sıvı besi ortamına ilave edilmiştir.

- Aktif *P. kudriavzevii* JD2 maya suşunun yoğunlukları OD₆₀₀'de bire ayarlanarak, farklı oranlarda safra ve kolesterol içeren besiyerlerine %2 oranında inoküle edilmiş ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Prebiyotik ilavesinin kolesterol giderimine etkisinin belirlenmesinde ise, 10 mg/L EPS_{JD2}, farklı oranlarda safra ve kolesterol içeren besiyerlerine %2 oranında JD2 maya suşu inoküle edilmiş ve gelişimleri için inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon süresinin sonunda, kültürler 10000 rpm'de 4°C'de 20 dk santrifüjlenerek, süpervantadan 0,5 mL temiz bir test tüpüne alınmış ve üzerine 3 mL %95 etanol (Merck) ilave edilerek 1 dk boyunca vorteks (Four E's) ile karıştırılmıştır.
- Örnek üzerine 2 mL %50 KOH (Merck) çözeltisi ilave edilerek 1 dk süre ile vorteks ile karıştırılmıştır.
- Karışım daha sonra 10 dk boyunca 65°C'lik sıcak su banyosunda (Memmert) inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon süresinin sonunda, test tüpleri oda sıcaklığına (22°C) gelinceye kadar soğutulmuştur.
- Soğuyan tüplerin üzerine 5 mL hekzan (Merck) ve 3 mL saf su ilave eklenerek hekzan fazının ayrılmasını sağlamak için 1 dk boyunca vorteks ile karıştırılmıştır.
- Ayrılan hekzan fazından 2,5 mL temiz bir test tüpüne alınarak hekzan 60°C'lik sıcak su banyosunda uçurulmuştur.
- Kalan tortuya 4 mL o-ftalaldehit reaktifi (0,5 mg o-ftalaldehit (Sigma) 1 mL glasiyel asetik asit (Merck) içerisinde çözülerek hazırlanmıştır) ilave edilerek 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Örneklerle 2 mL sülfirik asit (Merck) eklenerek 1 dk süresince vorteks ile karıştırılarak oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir.
- Daha sonra örneklerin optikal yoğunluğu spektrofotometrede (Hitachi) 550 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Kolesterol giderimi miktarlarını belirlemek için 10–150 µg/mL arasında değişen oranlarda saf kolesterol (Sigma) kullanılarak standart bir eğri çıkarılmış (Şekil 3.1) ve verilen bu standarda göre örneklerin kolesterol miktarları µg/mL olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.1. Kolesterol standart eğrisi

Suşun % kolesterol giderim değerleri ise aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır;

$$A = 100 - [(B / C) \times 100]$$

A: Kolesterolün giderimi (%).

B: İnokülasyon yapılan besiortamındaki kolesterol miktarı (µg/mL).

C: İnokülasyon yapılmayan (kontrol) besiortamındaki kolesterol miktarı (µg/mL).

3.4.2. Yapay mide ve bağırsak sıvılarında canlılık

P. kudriavzevii JD2 maya suşunun gastrointestinal sisteme toleransı yapay mide ve bağırsak sıvılarında canlılık durumlarına göre belirlenmiştir.

- *P. kudriavzevii* JD2 maya suşu YPD sıvı besiortamında ard arda iki kez 37°C’de 24 saat aktifleştirilmiştir.
- 24 saatlik aktif kültürden 1 mL alınarak 10000 rpm’ de 5 dk santrifüj edilerek pellet elde edilmiştir.
- Santrifüj sonrası elde edilen hücresel peletler toplanmış ve fosfat tamponu ile 3 kez yıkanmıştır.
- Yıkanan hücreler PBS tamponu ile başlangıç hacmine yeniden süspanse edildikten sonra farklı pH’larda (2, 3, 4 ve 6,2) hazırlanan yapay mide sıvısı (%0,5’lik serum fizyolojik içinde son konsantrasyonu 3 g/L olacak şekilde pepsinin (Sigma, 1:10000 ICN) çözülmesiyle hazırlanmıştır) ile resüspanse edilerek ve 37 °C’de 0 (kontrol), 60 ve 180 dakika inkübe edilmiştir (Huang vd., 2005).

- Diğer taraftan, bağırsak sıvısında maya canlılığını tespiti için yapay bağırsak sıvısı (%0,5'lik serum fizyolojik içinde son konsantrasyon 1 g/L olacak şekilde pankreatinin (Sigma, P-1500) çözülmesiyle hazırlanmış ve bağırsak sıvısı %0,30 safra tuzu (Sigma) ile süspanse edilerek, pH'sı 0,1 M NaOH ile 8,0'e ayarlanmıştır) ile resüspanse edilen kültürler, 37°C'de 0 (kontrol), 1 ve 240 dakika inkübe edilmiştir (Huang vd., 2003).
- İnkübasyon bitiminde kültürden seri dilisyonlar yapılarak YPD katı besiyortamına inoküle edilmiş, 37°C'de 36-48 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonunda gelişen koloniler sayılarak 1 mL'deki koloni oluşturan maya sayısı (kob-cfu; colony forming unit) olarak aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Kob/mL (cfu/mL)} = [\text{Koloni sayısı} \times \text{Seyreltme faktörü} / \text{Dilüsyon tüpünden petri kabına aktarılan örnek hacimi (mL)}].$$

$$\text{Seyreltme Faktörü} = [1 / \text{Seyreltme Oranı}]$$

- Ayrıca, *P. kudriavzeii* JD2 maya suşunun yapay mide ve bağırsak sıvılarındaki yüzde (%) canlılıkları tespit edilmiştir.

$$\% \text{ Canlılık} = [\text{OD}_{\text{Muameleden sonra}} / \text{OD}_{\text{Muameleden önce}}] \times 100$$

3.4.3. Hidrofobisite

P. kudriavzeii JD2 maya suşunun hidrofobikliği, Rosenberg ve diğerlerinin (1980) metodunda bazı değişiklikler yapılarak tespit edilmiştir. Maya suşu, YPD sıvı besiyerinde 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Aktif kültürler, 5000 rpm'de 15 dakika santrüfuj edilmiştir. Elde edilen pellet, iki kez fosfat tamponu ile yıkanmış ve 0,1 M KNO₃ (pH 6,2) tamponu içinde tekrar çözülerek hücre süspansiyonunun yoğunluğu spektrofotometrede 600 nm'de ölçülmüştür (A₀).

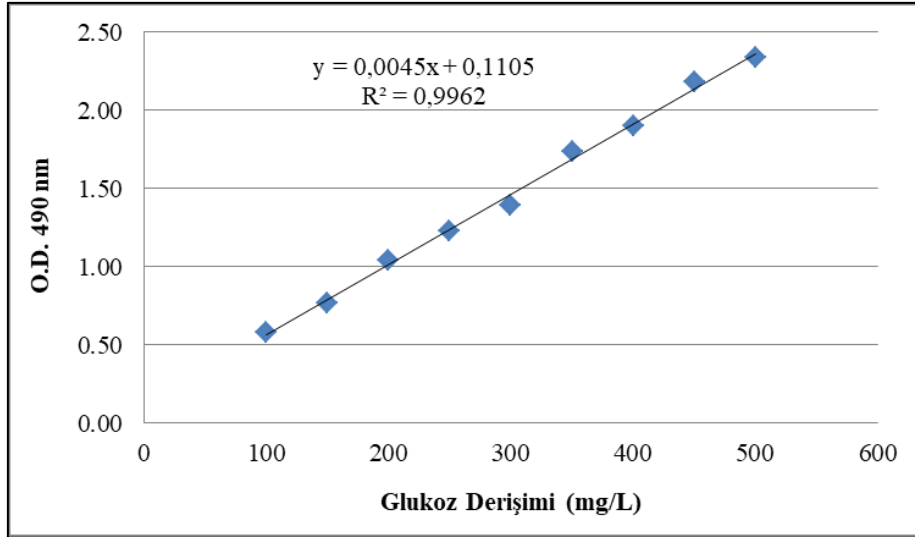
Maya süspansiyonundan 2 mL alınarak, 0,5 mL toluen (Merck) (polar olmayan nötral çözücü), hekzon (Merck) (monopolar asidik çözücü) ve aseton (Merck) (monopolar bazik çözücü) hidrokarbonları karıştırılmıştır. Ön inkübasyondan sonra ayrılan iki faz 2 dakika vorteks ile karıştırılarak tekrar oda sıcaklığında 4 saat bekletilmiştir. İnkübasyondan sonra sulu fazın OD'si spektrofotometrede (600 nm) ölçülmüştür (A₁). Maya izolatının hidrokarbonlara mikrobiyal tutunma yüzdesi aşağıdaki verilen formüle göre hesaplanmış

ve hidrofobiklik yüzdesi, %0-35; düşük hidrofilik, %36-70; orta hidrofobiklik ve %71-100; yüksek hidrofobiklik olarak değerlendirilmiştir (Mladenović ve diğerleri, 2020).

$$\% \text{Hidrofobosite} = (1 - A_1/A_0) \times 100$$

3.5. Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimi

P. kudriavzevii JD2 maya suşu YPD sıvı besiyerinde en az iki kez aktifleştirildikten sonra McFarland cihazında (Biosan Den-1) 7'ye ayarlanarak YPD sıvı besiyerine %2 oranında inoküle edilmiştir. Aşılınmış örnek ve kontrol amaçlı boş besiyeri içeren tüp 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kültürden ve kontrol tüpünden 1 mL alınarak 95°C'de 10 dakika ısıtılmıştır. Örnekler soğuduktan sonra 1,7 µL TCA (trikloroasetik asit, Merck) eklenerek yarım saat bekletilerek, 4°C'de 13000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni mikrofüj tüpüne alınarak üzerine 1(örnek):3(alkol) oranında %96'lık etanol eklenmiştir. Bu aşamada iki paralel olacak şekilde örnekten mikrofüj tüplerine 500 µL alınarak, üzerine 1,5 mL etanol (Merck) eklenmiştir. 4°C'de 13000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilmiş dipte kalan pelletin üzerine 500 µL etanol ilave edilerek aynı koşullarda santrifüjlenmiş ve 24 saat etüv içerisinde bekletilmiştir. Alkol uçurulduktan sonra, örnek 500 µL deiyonize suda çözülerek 1 mL olacak şekilde mikrofüj tüpünde toplanmıştır (Tsuda ve diğerleri, 2008). Örneğin üzerine 0,5 mL fenol (Sigma) ve 5 mL sülfirik asit (Merck) ilave edilerek oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra iyice vortekslenerek 37°C'de 20 dakika bekletilmiş ve örnek 490 nm dalga boyunda spektrofotometre de (T60UV-Visible) optik yoğunluğu ölçülmüştür. Kültürün ürettiği EPS miktarlarını hesaplamak için 100-500 mg/L arasında değişen oranlarda glukoz (Merck) çözeltisi kullanılarak bir standart çıkarılmış (Şekil 3.2) ve bu standarta göre üretilen EPS miktarı mg/L cinsinden belirlenmiştir (Dubois ve diğerleri, 1956).



Şekil 3.2. Glikoz standart grafiği

3.6. Örneklerin Hazırlanması

3.6.1. Probiyotik (JD2)

P. kudriavzevii JD2 maya suşu YPD sıvı besiyerinde 2 kez 37°C'de 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. İnkübasyon bitiminde örnek 10000 rpm'de 15 dk santrifüj (Eppendorf) edilip, elde edilen pellet fosfat tamponu (PBS) ile 3 kez yıkanıp, 1 mL PBS ile resüspanse edilmiştir. Hücre yoğunlukları 0,5 Mc Farland yoğunluğuna ayarlanan maya süspansiyonu (1 mL) çalışmalarda kullanılmıştır.

3.6.2. Prebiyotik (EPS_{JD2})

P. kudriavzevii JD2 maya suşu YPD sıvı besiyerine %2'lik ekim yapılarak 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. 800 mL'lik YPD sıvı besiyerine aktif kültürden %2 oranında ekilerek aynı sıcaklık ve sürede inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra örnek 80°C'de 10 dk sıcak su banyosunda inkübe edilmiş ve sonrasında oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Ardından örneğe %4 TCA (Merck) eklenerek manyetik karıştırıcıda (VELP) TCA çözünene kadar karıştırılmıştır. TCA çözündükten sonra örnek 4000 rpm'de 25 dk santrifüjlenmiş (SIGMA Model 2-16KC) ve süpernatant mezürde toplanmıştır. Toplanan süpernatant ölçülerek süpernatantın 2 katı alkol (%96'lık) eklenmiş ve uygun şişelere paylaştırıldıktan sonra +4°C'de 1 gece bekletilmiştir. Örnek 4000 rpm'de 25 dk santrifüjlenerek süpernatant atılmış ve kalan alkol uçurulmuştur. Her bir falkondaki pellet 2 mL distile suda çözündürülmüştür. Örnek, 500'er µL olacak şekilde viyallere dağıtılarak -

80°C’de 1 gece bekletilmiş ve daha sonra EPS liyofilizatör cihazında (CHRIST alpha 2-4 LD plus, Resim 3.1), dondurulup kurutularak toz haline getirilmiştir (Kanmani vd., 2011; Shi vd., 2014; Yi vd., 2008). Edilen liyofilize EPS “prebiyotik” olarak adlandırılmış ve çalışmalarda “EPS_{JD2}” kodu ile kullanılmıştır. Örnekte protein bulaşı Bradford protein kiti (Sigma-Aldrich) ile nükleik asit bulaşı ise 280 ve 260 nm’de UV-spektrofotometrede (Hitachi U-1800) (pik görülmemesi) araştırılmıştır.



Resim 3.1. Çalışmada kullanılan liyofilizatör cihazı (CHRIST alpha 2-4 LD plus)

P. kudriavzevii JD2 maya suşundan izole edilerek kısmi saflaştırılan EPS’ler karboksimetilasyon yöntemi ile (Kagimura ve diğerleri, 2015a) suda çözünür hale getirilmiştir. 90 mg EPS üzerine 5,4 mL 2-propanol (Sigma) eklenerek 15-30 dakika karıştırılmıştır. Karışımın üzerine yavaş yavaş %30’luk NaOH’dan 10 mL ilave edilmiş ve 50°C’de 15-30 dakika karıştırılmıştır. 1,1 g monokloroasetik asit (MCA) (Carlo Erba) 2-3 mL distile suda çözülürülerek karışıma eklenmiş ve 8 saat 50°’de bekletilmiştir. Karışım oda sıcaklığında soğutulduktan sonra çözeltinin pH’ı 0,5 M HCl (Merck) ile 7’ye ayarlanmıştır. Çözelti %96’lık alkol (Teksol) (1:1 oranda) ile nötralize edilerek filtrelenmiş ve evaporatör cihazında (BUCHI) alkol uçurulmuştur. Edilen örnek distile suda çözülürülerek liyofilize edilmiştir.

Çalışmalarda, liyofilize ve karboksimetilenmiş EPS_{JD2}’den 0,2 g/mL’lik ana stoktan son konsantrasyonu 0,5, 1, 5 ve 10 mg/mL olan EPS’ler hazırlanarak kullanılmıştır.

3.6.3. Postbiyotik (CFS_{JD2})

P. kudriavzevii JD2 maya suşu YPD sıvı besiyerinde 2 kez 37°C'de 24 saat inkübe edilerek aktiveştirilmiştir. İnkübasyon bitiminde 5000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant 0,22 µm çaplı steril membran filtreden (Whatm) geçirilmiştir. Laktobasil ve maya gelişimini düzenleici etkinin belirlenmesi çalışmalarında liyofilizatörde toz haline getirilerek hazırlanan örnek kullanılırken diğer çalışmalarda süpernatant kullanılmıştır (Mohammedsaeed vd. 2014).

3.6.4. Sinbiyotik (JD2+EPS_{JD2})

P. kudriavzevii JD2 maya suşu YPD sıvı besiyerinde 2 kez 37°C'de 24 saat inkübe edilerek aktiveştirilmiştir. İnkübasyon bitiminde örnek 10000 rpm'de 15 dk santrifüj (Eppendorf) edilip, elde edilen pellet fosfat tamponu (PBS) ile 3 kez yıkanıp, 1 mL PBS ile resüspanse edilmiştir. Hücre yoğunlukları 0,5 Mc Farland yoğunluğuna ayarlanmıştır. 3.6.2'de belirtilen metoda göre 0,5, 1, 5 ve 10 mg/mL'lik konsantrasyonlarda EPS_{JD2} hazırlanmış ve dimetil sülfoksit (DMSO; Merck)'te çözülmüştür. Çalışmalarda 1:1 (v/v) oranında karıştırılarak kullanılmıştır.

3.6.5. Postbiyotik+Prebiyotik (CFS_{JD2}+EPS_{JD2}) uygulama

Postbiyotik+Prebiyotik (CFS_{JD2}+EPS_{JD2}) uygulamanın postbiyotiği Bölüm 3.6.3'de ve prebiyotiğide Bölüm 3.6.2'de verilen metotlara göre hazırlanmıştır. Çalışmalarda postbiyotik ve prebiyotik 1:1 (v/v) oranında karıştırılarak kullanılmıştır.

3.7. EPS_{JD2}'nin Karakterizasyonu

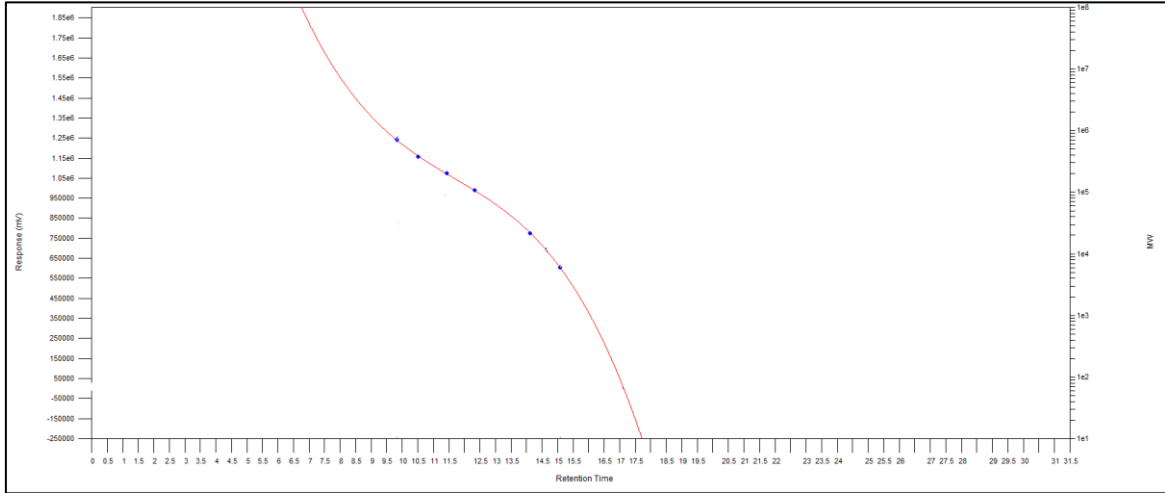
P. kudriavzevii JD2 maya suşundan elde edilen EPS'nin (EPS_{JD2}) karakterizasyonu HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi), NMR (nükleer manyetik rezonans) analizi ve SEC (büyüklükçe ayırma kromatografisi) analizleri ile hizmet alımıyla yaptırılmıştır.

EPS_{JD2}'nin monomer kompozisyonu ODTÜ Merkez Laboratuvarında hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Monomer yapının belirlenmesi amacıyla glukoz, maltoz, galaktoz, ramnoz, riboz, rafinoz, mannoz, arabinoz, sukroz ve fruktoz şekerleri analiz edilmiştir. 10 mg/mL'lik EPS_{JD2}'nin asit hidrolizi için; örnek 1 M H₂SO₄ ile 3 saat 90°C'de inkübasyona

bırakılmıştır. Örneğin nötralizasyon işlemi 1 M NaOH ile yapılmış ve 0,45 µm mikrofiltasyon (Whatman) ile sterilize edilerek (Ledezma ve diğerleri, 2016) hazırlanan numuneler analize gönderilmiştir. Analiz, Refraktif İndeks Dedektör taşıyan AGILENT 1260 serisi HPLC cihazı kullanılarak yapılmış, ayırım için Metacarp 67C (300 mm x 6,5 mm) kolonu ve Microsorb-Mv-100-5 Amino kolonu kullanılmıştır. ACN: H₂O, mobil faz olarak kullanılmış, akış hızı 0,5 mL/dk. (90°C) ve enjeksiyon hacmi 25 µL olacak şekilde çalışılmıştır.

EPS_{JD2}'nin bağ yapısı Çankırı Karatekin Üniversitesi Araştırma Merkezi NMR Laboratuvarı'na hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Bağ yapısının belirlenmesi amacıyla ¹H-NMR, NOESY, COSY ve ¹³C-APT NMR analizleri yapılmıştır. Çalışmada, Agilent marka 600 MHz'lik frekansta, 14.1 Tesla alan gücüne sahip Premium Compact NMR cihazı kullanılmıştır. Çözücü olarak D₂O kullanılmıştır.

EPS_{JD2}'in (0,5 mg/mL) moleküler ağırlığı boyut dışlama kromatografisinde (Size Exclusion Chromatography, SEC) kırılma indisi dedektörü (Refraktif İndeks Dedektör, RID) kullanılarak hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir (Li vd. 2015). PL aquajel OH mixed kolonunda (8 µm) 0,6 mL/dk akışında ultra saf su mobil faz olarak kullanılarak 20 µL örnek enjeksiyonu yapılmıştır. Farklı dekstran standartları kullanılarak çizilen grafik Şekil 3.3'de verilmiştir.



Şekil 3.3. Dekstran standartları kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiği

3.8. EPS_{JD2} ve İnulinin Prebiyotik Aktivite Skorlarının Belirlenmesi

Prebiyotik aktivite, test edilecek substratın bir mikroorganizmanın gelişmesini diğer mikroorganizmalara göre olumlu yönde desteklediğini, prebiyotik olmayan bir karbonhidratla (örneğin glikoz) karşılaştırmalı olarak belirlenmesidir (Huebner vd., 2007).

Bu çalışmada, *P. kudriavzevii* JD2 suşundan elde edilen EPS_{JD2}'nin prebiyotik aktivite skoru Huebner vd., (2007) metoduna göre tespit edilmiştir. Bu amaçla, prebiyotik aday olarak *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* DSM20246 ve *Saccharomyces cerevisiae* BU19, enterik patojen olarak ise *Escherichia coli* ATCC 11229 suşu kullanılmıştır.

- Probiyotik *L. plantarum* subsp. *plantarum* DSM20246 için %2 EPS_{JD2}/inulin ve %2 glukoz içeren farklı MRS sıvı besiyeri ve *S. cerevisiae* BU19 suşu için ise %2 EPS_{JD2}/inulin ve %2 glukoz içeren farklı YPD sıvı besiyerleri hazırlanmıştır.
- Hazırlanan besiyerlerine *L. plantarum* subsp. *plantarum* DSM20246 ve *S. cerevisiae* BU19 suşlarının aktif kültürleri spektrofotometrede (Hitachi) 600 nm'de $0,6 \pm 0,02$ değerine ayarlanarak %2 oranında ekilmiş ve 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyonun 0, 24 ve 48. saatlerinde 100 µL örnekler alınarak serum fizyolojik (%0,875 NaCl) ile 10^{-1} 'den 10^{-7} 'ye kadar seri dilüsyonlar yapılmıştır. 10^{-1} - 10^{-7} dilüsyonlarından MRS/YPD katı besi ortamlarına yayma plak yöntemi ile ekimler yapılarak canlı bakteri sayısını tespit etmek üzere 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası besiyerinde oluşan tüm koloniler sayılmış ve Bölüm 3.10'da verilen koloni sayım formülüne göre toplam bakteri sayısı log kob/mL olarak (Gürgün ve Halkman, 1990).
- Bağırsak patojeni için %2 EPS_{JD2}/inulin ve %2 glukoz içeren iki farklı M9 Minimal sıvı besiyeri (Çizelge 3.2) hazırlanmıştır. *E. coli* ATCC 11229, suşu M9 minimal besiyerinde aktiveleştirilerek OD'si 600 nm'de $0,6 \pm 0,02$ 'ye ayarlanmıştır. Hazırlanan %2 EPS_{JD2}/inulin içeren M9 Minimal besiyeri ile %2 glukozlu M9 Minimal besiyerlerine OD'si ayarlanan *E. coli* ATCC 11229 suşundan %2 oranında ekim yapılmış ve 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 0, 24 ve 48. saatlerinde 100 µL örnekler alınarak serum fizyolojik ile 10^{-1} 'den 10^{-7} 'ye kadar seri dilüsyonlar yapılarak Bölüm 3.10'da verilen koloni sayım formülüne göre toplam bakteri sayısı log kob/mL olarak (Gürgün ve Halkman, 1990). EPS_{JD2} ve inulinin prebiyotik aktivitesi 24 ve 48 saat için ayrı ayrı belirlenmiştir.

- Probiyotik ve enterik mikroorganizmaların log kob/mL değerleri hesaplandıktan sonra aşağıda verilen formüle göre prebiyotik skor aktivitesi hesaplanmıştır (Huebner vd., 2007).

$$\text{Prebiyotik Skor} = \frac{\left[\begin{array}{l} 24. \text{ saatte prebiyotikli ortamda probiyotik bakterinin log kob/mL değeri} \\ -0. \text{ saatte prebiyotikli ortamda probiyotik bakterinin log kob/mL değeri} \end{array} \right]}{\left[\begin{array}{l} 24. \text{ saatte glukozlu ortamda probiyotik bakterinin log kob/mL değeri} \\ -0. \text{ saatte glukozlu ortamda probiyotik bakterinin log kob/mL değeri} \end{array} \right]} - \frac{\left[\begin{array}{l} 24. \text{ saatte prebiyotikli ortamda enterik bakterinin log kob/mL değeri} \\ -0. \text{ saatte prebiyotikli ortamda enterik bakterinin log kob/mL değeri} \end{array} \right]}{\left[\begin{array}{l} 24. \text{ saatte glukozlu ortamda enterik bakterinin log kob/mL değeri} \\ -0. \text{ saatte glukozlu ortamda enterik bakterinin log kob/mL değeri} \end{array} \right]}$$

3.9. EPS_{JD2}'nin Mide Sıvısında Hidrolizi

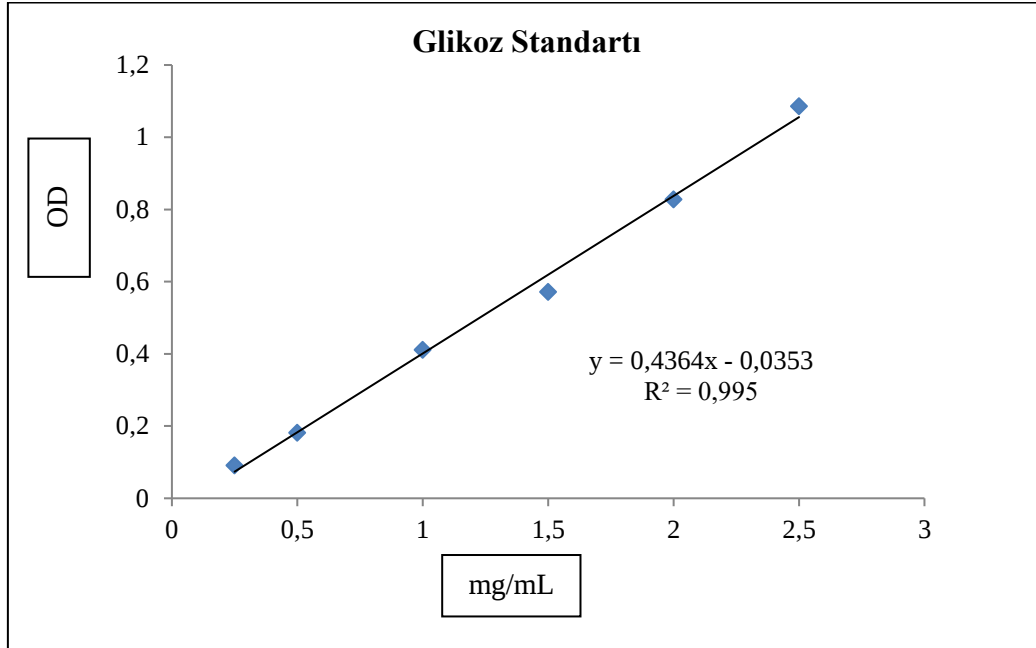
Bu çalışmada, maya suşu *P. kudriavzevii* JD2'den elde edilen prebiyotik EPS_{JD2} ve bitkisel kaynaklı ticari prebiyotik inülinin (kontrol) farklı pH değerlerindeki (pH 3 ve pH 5) mide suyunda ve farklı zaman aralıklarında (0, 1, 2 ve 3 saat) yüzde hidrolizi Wichienchot vd. (2009)'un metoduna göre tespit edilmiştir.

- ✓ İki paralel olacak şekilde yapay mide sıvısı aşağıda verilen oranlarda hazırlanmış ve 5 M HCL ile pH'ı 3 ve 5'e ayarlanmıştır.

Yapay Mide Sıvısı: 8 g/L NaCl; 0,2 g/L KCl; 8,25 g/L Na₂HPO₄.2H₂O; 14,35 g/L NaH₂PO₄; 0,1 g/L CaCl₂.2H₂O; 0,18 MgCl₂.6H₂O, pH 3/5

- ✓ Saf su içerisinde %1 oranında hazırlanan EPS_{JD2} ve inülin çözeltileri farklı pH'lardaki 5 mL'lik yapay mide sıvılarının üzerine ayrı ayrı %1 oranında (v/v) eklenerek 37°C'de 0, 1, 2 ve 3 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- ✓ İnkübasyonun sıfıncı, birinci, ikinci ve üçüncü saatinde EPS_{JD2} ve inulin içeren mide sıvılarından 150 µL örnek alınarak üzerine 150 µL dinitrosalisilik asit (DNS) çözeltisi eklenmiştir. Örnekler karıştırıldıktan sonra 100°C'de 5 dk sıcak su banyosunda bekletilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda örnekler hızlı bir şekilde buz üstünde soğutularak üzerine 1,5 mL saf su eklenmiştir.
- ✓ İndirgen şeker miktarını belirlemek için spektrofotometrede 540 nm'de optikal yoğunlukları belirlenmiştir. Kör için 75 µL saf su ile içerisinde EPS_{JD2} veya inülin bulunmayan mide sıvısından 75 µL eklenerek DNS metodu uygulanmıştır (Robertson vd., 2001). 0,5-2,5 mg/mL arasında değişen oranlarda glukoz çözeltisi kullanılarak bir

standart çıkartılmış ve indirgen şekerlerin miktarı kalibrasyon eğrisi kullanılarak mg/mL cinsinden değerlendirilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. DNS metodu için hazırlanan glukoz standardı

- ✓ EPS_{JD2} ve inülin %1 oranında steril saf suda çözündürülmüş ve şeker miktarları fenol sülfirik asit metoduna göre belirlenmiştir (Dubois, 1956). Örneklerden 1 mL alınarak üzerine 0,5 mL fenol ve 5 mL sülfirik asit (H₂SO₄) eklendikten sonra oda sıcaklığında 10 dk boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örnekler vorteks yardımıyla karıştırılmış ve 30°C’de 15 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örneklerin optikal yoğunluğu spektrofotometrede 490 nm’de ölçülmüştür. EPS_{JD2} ve inülinin farklı pH’daki mide sıvılarında ve farklı saatlerdeki hidroliz yüzdeleri aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır (Wichienchot vd. 2009).

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

İndirgenmiş şeker miktarı: DNS metoduna göre hesaplanan şeker miktarı,

Total şeker miktarı: Fenol sülfirik asit metoduna göre hesaplanan şeker miktarı;

Başlangıçtaki şeker miktarı: 0 saatte hesaplanan şeker miktarı.

3.10. Postbiyotik (CFS_{JD2}) İçeriğinin Belirlenmesi

Postbiyotiğın içerik analizi Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Farmabiyotik Teknolojileri Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

3.10.1. Şeker

Şeker analizi, UV Dedektörlü Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi cihazında (HPLC, High Performance Liquid Chromatography, Shimadzu Prominence Series HPLC-20A, Japonya) (Resim 3.2) 210 nm’de tespit edilmiştir. Mobil faz olarak 0,08 M H₂SO₄, sabit faz (kolon) olarak ise Transgenomic (Merck-Concise) marka 87H-3 iyon değıştirme reçinesi özelliğinde 250 mm x 4,6 mm x 5 µm kolon kullanılmıştır. 0,22 µm çapına filtreden geçirilen örnekten cihaza 20 µL enjeksiyon edilerek standart ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Postbiyotik içeriğinde glukoz, ksiloz, galaktoz, maltoz, arabinoz+manno, fruktoz, sakkaroz (0,0075 g/100 g) şekerleri taranmıştır.



Resim 3.2. HPLC, yüksek performanslı sıvı kromatografisi, shimadzu prominence serisi HPLC-20A, Japonya

3.10.2. Amino asitler

Amino asit analizi, UV Dedektörlü Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi cihazında (HPLC, High Performance Liquid Chromatography, Shimadzu Prominence Series HPLC-20A, Japonya) 350 nm’de tespit edilmiştir. 1 g numune 100 mL 0,1 M HCl içinde özölmüştür. 15 µL seyreltilmiş çözeltiye sırasıyla 90 µL 3-merkaptopropiyonik asit (3-MPA), 44 µL O-

fitaldehit (OPA) ve 20 µL florenilmetiloksikarbonil (FMOC) eklenmiş ve karıştırılmıştır. Mobil faz olarak 20 mM potasyum fosfat buffer (pH 6,9) ve asetonitril/metanol/su (%45:45:10) kullanılmıştır. Cihaza 5 µL numune enjekte edilerek amino asit karışımı (Sigma) standardı ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Postbiyotik içeriğinde taranan amino asitler ve standart konsantrasyonları Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Amino asitler ve konsantrasyonları

No	Amino Asitler	Standart Konsantrasyon (g/100g)
1	Aspartik asit	0,001665
2	Glutamik asit	0,00184
3	Serin	0,001315
4	Glutamin	0,001
5	Histidin	0,00194
6	Glisin	0,00094
7	Treonin	0,00149
8	Sitrülin	0,001
9	Arginin	0,002175
10	Alanin	0,0001115
11	Tirozin	0,002265
12	Sistin	0,0015
13	Valin	0,00147
14	Metionin	0,001865
15	Tryptofan	0,001
16	Fenilalanin	0,002065
17	İzolösin	0,001645
18	Lösin	0,001655
19	Lizin	0,001825
20	Hidroksi prolin	0,001
21	Prolin	0,00144

3.10.3. Yağ asiti

Örneğin yağ asiti analizi, Gaz Kromatografi-Kütle Spektroskopisi (GC-MS, Gas Chromatography-Mass Spectrometry, Shimadzu GC-MS QP2020, Japonya) (Resim 3.3) cihazı ile belirlenmiştir. %99,999 saflıktaki Helyum taşıyıcı gaz olarak, kolon olarak Restek marka 2560 (orta polarite özellikte ve 100 mm X 0,25 mm X 0,25 µm boyutlarında), standart olarak ise Restek marka 37 adet FAME (Fatty Acids Methyl Esters, yağ asiti metil esterleri) karışımı kullanılmıştır. Örnek, GC-MS cihazına sıvı olarak enjekte edilebilmesi için metil esterleri haline uçucu özellik kazandırılmıştır. Bu amaçla 0,1 g örnek üzerine 10 mL hekzan (Merck) eklenmiş, iyice çalkalanarak metanolde çözünmüş ve 2 M KOH eklenerek karıştırılmıştır. 1-2 saat karanlık ortamda bekletildikten sonra üst fazdan 1 µL alınarak cihaza enjeksiyon yapılmış, sonuçlar standarda karşı yapılan ölçüm

kalibrasyon eğrisi kullanılarak belirlenmiştir. Postbiyotik içeriğinde taranan yağ asitleri Çizelge 3.4’te verilmiştir.



Resim 3.3. GC-MS, gaz kromatografisi-kütle spektrometresi, shimadzu GC-MS QP2020, Japonya

Çizelge 3.4. Yağ asitleri

No	Kapalı Formül	Bileşik, Ağırlıkça %
1	C4:0	Metil butirat (623-42-7), %4
2	C6:0	Metil kaproat (106-70-7), %4
3	C8:0	Metil kaprilat (111-11-5), %4
4	C10:0	Metil dekanoat (110-42-9), %4
5	C11:0	Metil undekanoat (1731-86-8), %2
6	C12:0	Metil dodekanoat (111-82-0), %4
7	C13:0	Metil tridekanoat (1731-88-0), %2
8	C14:0	Metil miristat (124-10-7), %4
9	C14:1 cis-9	Metil miristoleat (56219-06-8), %2
10	C15:0	Metil pentadekanoat (7132-64-1), %2
11	C15:1 cis-10	10 Metil pentadekenoat (90176-52-6), %2
12	C16:0	Metil palmitat (112-39-0), %6
13	C16:1 cis-9	Metil palmitoleat (1120-25-8), %2
14	C17:0	Metil heptadekanoat (1731-92-6), %2
15	C17:1 cis-10	Metil heptadekenoat (75190-82-8), %2
16	C18:0	Metil stearat (112-61-8), %4
17	C18:1 trans-9	Metil oktadekanoat (1937-62-8), %2
18	C18:1 cis-9	Metil oleat (112-62-9), %4
19	C18:2 trans-9,12	Metil linolelaidat (2566-97-4), %2
20	C18:2 cis-9,12	Metil linoleat (112-63-0), %2
21	C20:0	Metil araşidat (1120-28-1), %4
22	C18:3 cis-6,9,12	Metil linolenat (16326-32-2), %2
23	C20:1 cis-11	Metil eikosenoat (2390-09-2), %2
24	C18:3 cis-9,12,15	Metil linolenat (301-00-8), %2
25	C21:0	Metil heneikosanoat (6064-90-0), %2
26	C20:2 cis-11,14	Metil eikosadienoat (2463-02-7), %2
27	C22:0 FAME	Metil behenat (929-77-1), %4
28	C20:3 cis-8,11,14	Metil eikosatrienoat (21061-10-9), %2
29	C22:1 cis-13	Metil erükat (1120-34-9), %2
30	C20:3 cis-11,14,17	Metil eikosatrienoat (55682-88-7), %2
31	C20:4 cis-5,8,11,14	Metil araşidonat (2566-89-4), %2
32	C23:0	Metil trikozanoat (2433-97-8), %2
33	C22:2 cis-13,16	Metil dokosadienoat (61012-47-3), %2
34	C24:0	Metil lignoserat (2442-49-1), %4
35	C20:5 (tümü-cis-5,8,11,14,17)	Metil eikosapentaenoat (2734-47-6), %2
36	C24:1 cis-15	Metil nervonat (2733-88-2), %2
37	C22:6	Metil dokosaheksaenoat (2566-90-7), %2

3.10.4. Fenolik bileşikler

Fenolik bileşiklerin analizi, UV Dedektörlü Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi cihazında (HPLC, High Performance Liquid Chromatography, Shimadzu Prominence Series HPLC-20A, Japonya) 210 nm’de tespit edilmiştir. Mobil faz olarak metanol (Merck) ve %1’lik formik asit (Merck), sabit faz (kolon) olarak ise Transgenomic (Merck-Concise) marka 87H-3 iyon değiştirme reçinesi özelliğinde 150 mm x 4,6 mm x 3 µm kolon kullanılmıştır. 0,22 µm çapına filtreden geçirilen örnekten cihaza 20 µL enjeksiyon edilerek standart ile

karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Postbiyotik içeriğinde taranan fenolik bileşikler ve standart konsantrasyonları Çizelge 3.5’te verilmiştir.

Çizelge 3.5. Fenolik bileşikler ve konsantrasyonları

No	Fenolik Bileşikler	Standart Konsantrasyon (ppm)
1	Hidroksitrezol	5,2
2	2,4 Hidroksifeniletanol	14,8
3	Katesin	10
4	Kafein	12,4
5	Kafeik Asit	12,4
6	Siringik Asit	12,4
7	Oleuropein	12,4
8	p-Kumarik Asit	12,4
9	Rutin	12,4
10	Ferrulik Asit	12,4
11	Resveratrol	12,4
12	Elajik Asit	12,4
13	Kuinik Asit	12,4

3.10.5. Vitamin

Örneğin, yağda ve suda çözünen vitaminlerin analizi Sıvı Kromatografi Üçlü Kütle Spektroskopisi/Likit Kromatografi Tandem Kütle Spektroskopisi (LC-MS MS, Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry, Shimadzu LC-MS 8045, Japonya) (Resim 3.4) belirlenmiştir. Mobil faz olarak gradient karışımla %0,1’lik formik asitli su ve %0,1’lik formik asitli metanol, kolon olarak da Inertsil Sustain marka C18 (Apolar; 50 mm x 2,1 mm x 1,8 µm boyutlarında) kullanılmıştır. 0,22 µm filtrelerden geçirilen örnek, 10 µL olarak enjeksiyon edilmiş ve standart karışımı ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Postbiyotik içeriğinde taranan vitaminler Çizelge 3.6’da verilmiştir.



Resim 3.4. LC-MS MS, Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry, Shimadzu LC-MS 8045, Japonya

Çizelge 3.6. Yağda ve suda çözünür vitaminler ve konsantrasyonları

No	Vitamin	Standart Konsantrasyon (ppb)
1	Vitamini D2	397,5000>107,10
2	Vitamini K1	451,5000>187,00
3	Vitamini K2	445,3000>81,10
4	Vitamini K3	173,1000>105,10
5	Vitamini B2	377,2000>243,20
6	Vitamini B3	123,3000>80,10
7	Vitamini B12	678,5000>147,10
8	Vitamini D3	385,4000>367,20
9	Vitamini B5	220,3000>90,15
10	Vitamini B1	265,3000>122,10
11	Vitamini B6	170,1000>134,05
12	Vitamini E1	431,4000>165,20
13	Vitamini A	269,2000>92,90
14	Vitamini E	531,4000>265,10

3.11. Laktobasil ve Maya Suşlarının EPS_{JD2}'yi Fermente Etmesi

Laktobasil ve maya suşlarının EPS_{JD2} ve inulini (kontrol) fermente etme yeteneklerinin belirlenmesinde, test mikroorganizmaları olarak Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı Kültür Koleksiyonunda bulunan *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* DSM20246 ve *Saccharomyces cerevisiae* BU19 suşları kullanılmıştır. Çalışmada, *L. plantarum* subsp. *plantarum* DSM20246 için MRS, *S. cerevisiae* BU19 için ise YPD besiyeri pozitif kontrol olarak ve glukozsuz MRS/YPD besiyerleri ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. EPS_{JD2} ve inülinin, *L. plantarum* DSM20246 ve *S. cerevisiae* BU19 tarafından fermente edilebilme kapasitesi, glukozsuz MRS ve YPD sıvı besiyerlerine 0,45 µm por çaplı disposable filtreden geçirilen

ve %2 oranında (glukoz ile aynı oran) EPS_{JD2} ve inulin ilave edilen besiyerlerinde tespit edilmiştir. *L. plantarum* subsp. *plantarum* DSM20246 ve *S. cerevisiae* BU19 suşları, %2 oranında besiyerlerine aşılanarak 37°C’de 24 saat inkübe edilmiş ve inkübasyonun ardından vortekslenmiştir. 30 dk 3000 rpm de santrifüjlendikten sonra süpernatantlar dökülmüştür. Pelletlerin üzerine 5 mL SF ilave edilerek vortekslenmiş ve bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır. Pelletler 1 mL SF içerisinde çözülerek McFarland 7 bulanıklık değerine (~7,3 log kob/mL) ayarlanmıştır. İçerisinde 900 µL steril SF bulunan ependorflara 100’er µL aktararak 10⁻¹ ile 10⁻⁸ dilüsyonları arasında MRS/YPD agar besiyerlerine yayma ekimleri yapılmış ve 37°C’de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası besiyerinde oluşan 30-300 arasındaki koloniler sayılarak koloni sayım formülüne göre toplam bakteri sayısı log kob/mL cinsinden hesaplanmıştır (Gürgün ve Halkman, 1990).

$$\text{kob/mL} = \frac{\text{Ortalama Koloni sayısı} \times \text{Dilüsyon faktörü}}{\text{Petri kutularına aktarılan inokulum miktarı (0,1 mL)}}$$

3.12. Prebiyotik (EPS_{JD2}), Postbiyotik (CFS_{JD2}) ve Ticari İnülinin Bakteri (LGD) ve Maya (MGD) Gelişimini Düzenleyici Etkisi

P. kudriavzevii JD2 maya suşundan elde prebiyotik (EPS_{JD2}), postbiyotik (CFS_{JD2}) ve ticari prebiyotik inülinin bakteri (LGD) ve maya (MGD) gelişimini düzenleyici etkisinin belirlenmesinde, test mikroorganizmaları olarak Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı Kültür Koleksiyonunda bulunan *L. plantarum* subsp. *plantarum* DSM20246 ve *Saccharomyces cerevisiae* BU19 suşları kullanılmıştır.

Laktobasil Gelişimini Düzenleyici (LGD) ve Maya Gelişimini Düzenleyici (MGD) etkilerin belirlenmesinde, prebiyotik (EPS_{JD2}) ve inulin örnekleri Bölüm 3.6.2’de, postbiyotik örneği ise Bölüm 3.6.3’te belirtildiği şekilde hazırlanmıştır. Liyofilizasyon işlemi ile toz formda elde edilen 500 mg/mL’lik ana stok (postbiyotik) steril distile su ile sulandırılmış ve 0,22 µm çaplı membran filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir. Ana stoktan son konsantrasyonu 0,5, 1, 5 ve 10 mg/mL olacak şekilde farklı konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Çalışmada, *L. plantarum* subsp. *plantarum* DSM20246 için MRS, *S. cerevisiae* BU19 için ise YPD besiyeri kullanılmıştır. Glukozu tamamen çıkarılmış steril 5 mL MRS/YPD sıvı besiyerlerine 0,5, 1, 5 ve 10 mg/mL’lik konsantrasyonlarında prebiyotik (EPS_{JD2}), postbiyotik (CFS_{JD2}) ve inülin ilave edilmiştir. Hazırlanan besiyerlerine McFarland 7 bulanıklık değerine (~7,3 log kob/mL) ayarlan *L. plantarum*

subsp. *plantarum* DSM20246 ve *S. cerevisiae* BU19 suşları %2 oranında uygun besiyerlerine aşılanmış ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda içerisinde 900 µL steril SF bulunan ependorflara 100'er µL mikroorganizma örnekleri aktararak Bölüm 3.10'da belirtilen şekilde canlı hücre sayısı log kob/mL cinsinden hesaplanmıştır (Gürgün ve Halkman, 1990). Glukozsuz MRS/YPD (C-MRS/C-YPD) besiyerleri negatif kontrol, MRS/YPD sıvı besiyerleri ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.13. Probiyotik (JD2), Prebiyotik (EPS_{JD2}), Postbiyotik (CFS_{JD2}), Sinbiyotik (JD2+EPS_{JD2}) ve Postbiyotik+Prebiyotik (CFS_{JD2}+EPS_{JD2}) Uygulamanın Bazı Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.13.1. Antioksidan aktivite

Probiyotik (JD2), postbiyotik (CFS_{JD2}), farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 5, 10 mg/mL) prebiyotik (EPS_{JD2}), sinbiyotik (JD2+EPS_{JD2}), postbiyotik+prebiyotik (CFS_{JD2}+EPS_{JD2}) uygulamanın, bitkisel kaynaklı ticari prebiyotik inülinin ve pozitif kontrol olarak askorbik asidin antioksidan aktivitesi 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), süperoksit anyon ve hidroksil radikalini süpürücü aktivitesi metotları ile belirlenmiştir.

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali giderme

Yöntemin temeli DPPH içeren çözelti ile hidrojen atomu verme eğilimi olan bir molekülün (antioksidan) çözeltisinin karıştırılması sonucu DPPH radikalini indirgenmesine ve çözeltinin başlangıçta mor olan renginin kaybolmasına dayanmaktadır. Mor renkli çözeltinin 517 nm civarındaki absorbansının azalması ölçülerek reaksiyon takip edilmektedir. 1 mL'lik örneklerin (probiyotik, postbiyotik, sinbiyotik, postbiyotik+prebiyotik, inulin ve askorbik asit) üzerine 1 mL 1,1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH) çözeltisi (metanolde çözülmüş %0,008 w/v DPPH) eklenerek karanlıkta 1 saat bekletilmiştir. Süre bitiminde örnekler 4000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilerek süpernatantların optikal yoğunlukları 517 nm dalga boyundaki spektrofotometrede (Hitachi) ölçülmüştür. Kör olarak 1 mL DMSO, kontrol olarak 1 mL DMSO+DPPH çözeltisi kullanılmıştır (Li ve diğerleri, 2014). Örneklerin DPPH radikalini giderme yüzdesi aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır:

$$A = [1 - (B_{517} / C_{517})] \times \%100$$

A: Antioksidan aktivite (%)

B₅₁₇: DPPH ile muamele edilen örneklerin optikal yoğunluğu

C₅₁₇: Kontrol grubunun (Boş PBS ve DPPH çözeltisi) optikal yoğunluğu

Süperoksit anyon radikalı süpürücü aktivitesi

Probiyotik, postbiyotik, farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 5 ve 10 mg/mL) prebiyotik, sinbiyotik, postbiyotik+prebiyotik uygulaması, ticari prebiyotik olan inülin ve askorbik asitin (kontrol), süperoksit anyon radikal süpürme aktivitesi Wang ve diğerlerinin (2015) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yukarıda belirtildiği (Metot 3.6) şekilde hazırlanan 1 mL'lik örneklerin üzerine 25°C'de ısıtılan 0,2 mL pirogallol (3 mM, Sigma) ilave edilmiştir. Karışımın absorbans değeri spektrofotometrede (Hitachi) 325 nm dalga boyunda ölçülmüş ve yüzde süperoksit anyon radikal süpürme aktivitesi aşağıdaki denklem kullanılarak belirlenmiştir.

$$\% \text{ Süperoksit anyonu radikalini süpürücü aktivitesi} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A₁: Örneklerin absorbans değeri

A₀: Örnek içermeyen çözeltinin absorbans değeri

Hidroksil radikalini süpürücü aktivite

Hidroksil radikal süpürme aktivite, probiyotik, postbiyotik ve farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 5 ve 10 mg/mL) prebiyotik, sinbiyotik, postbiyotik+prebiyotik uygulaması, ticari prebiyotik olan inülin ve askorbik asitte (kontrol) tespit edilmiştir (Wang ve diğerleri, 2015). Yukarıda belirtildiği (Metot 3.6) şekilde hazırlanan 1 mL'lik örneklerin üzerine 1 mL brilliant blue (0,435 mM, Sigma), 2 mL FeSO₄ (0,5 mM, Sigma), 1,5 mL H₂O₂ (%3, w/v Sigma) eklenerek 37°C de 1 saat inkübe edilmiştir. Bekleme sonunda örnekler 4000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiş ve spektrofotometrede (Hitachi) 624 nm de absorbanslarını ölçülmüştür. Örneklerin hidroksil radikalini süpürücü etkisi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Hidroksil Radikalı Süpürücü Aktivite} = [(A_0 - A_1) / (A - A_1)] \times 100$$

A₀: Belirli bir konsantrasyonda örnek içeren çözeltinin absorbans değeri

A₁: Örnek olmadığında çözeltinin absorbans değeri

A: Örnek ve Fenton reaksiyon sistemini içermeyen çözeltinin absorbans değeri

3.13.2. Antibiyofilm aktivite

Çalışmada, probiyotik (JD2), postbiyotik (CFS_{JD2}), farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 5, 10 mg/mL) prebiyotik (EPS_{JD2}), sinbiyotik (JD2+ EPS_{JD2}), postbiyotik+prebiyotik (CFS_{JD2}+EPS_{JD2}) uygulama ve ticari prebiyotik inülinin (kontrol, Sigma) antibiyofilm aktiviteleri kristal viyole boyama esasına göre kolorimetrik olarak belirlenmiştir (Sandasi vd., 2010; Chaieb vd., 2011). Test bakterisi olarak, biyofilm yapma yeteneği daha önceki çalışmalar ile (Sarıkaya ve diğerleri, 2017; Bikriç ve diğerleri, 2022) belirlenen biyofilm yapma yeteneğine sahip *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* 29212 ve *Escherichia coli* ATCC 11229 suşları kullanılmıştır. Bölüm 3.6’da belirtilen şekillerde hazırlanan örneklerden 20 µL 96 kuyucuklu mikropate plaklara aktarılmıştır. Örneklerin üzerlerine, aktifleştirilmiş ve yoğunluğu McFarland densitometre cihazında (Resim 3.2) 0,5’e ayarlanmış olan test bakterilerinden 180 µL aktarılmıştır. Negatif kontrol olarak serum fizyolojik (%0,85 SF) içeren kuyular, pozitif kontrol olarak ise test bakterilerini içeren kuyular kullanılmıştır. Örnekler ve kontrol grupları 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyulardaki sıvılar uzaklaştırılmış ve planktonik formdaki hücrelerin uzaklaştırılması için de üç kez steril SF ile yıkanmıştır. Yıkamadan sonra mikropate plakalar oda koşullarında kurumaya bırakılmış ve sonra kuyulara 150’şer µL %95’lik metanol (Merck) ilave edilerek fikse edilmiştir. Boşaltılan kuyuların üzerine 200’er µL %0,1’lik kristal viyole çözeltisi (Merck) eklenmiştir. Mikropalakalar oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra kuyular steril distile su ile yıkanarak tutunmayan boyalar uzaklaştırılmıştır. Plakalar kurutulduktan sonra, kuyulara % 33’lük glasiyel asetik (Merck) eklenmiş ve kuyu çeperlerindeki biyofilm yapılarına tutunmuş boya çözdürülmüştür. Çözünen boya kristal viyole renginin optik yoğunluğu 570 nm’de eliza okuyucuda (Epoc, Biotek) absorbans değerleri belirlenmiştir. Biyofilm inhibisyonunun yüzde oranını aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

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



Resim 3.5. McFarland densitometre cihazı

3.14. İstatistiksel Analizler

Tüm çalışmalar 2 paralelli ve 3 tekerrürlü olarak yapılmış ve bulunan değerlerin ortalama sonuçları verilmiştir. İstatistiksel analizlerde SPSS Inc. Software (22.0 versiyonu, SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılmıştır. Yapay mide ve bağırsak sıvısı çalışmasında, farklı pH ve safra konsantrasyonu ile canlılık arasındaki, kolesterol giderimi çalışmasında, artan safra konsantrasyonu ve kolesterol giderimi arasındaki ve antioksidan/antibiyofilm çalışmasında prebiyotik ve sinbiyotik uygulamalarda konsantrasyon artışı ile antioksidan/antibiyofilm arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak için regresyon analizi uygulanmıştır ($p<0,05$). Regresyon analizinde, 0,75'ten yüksek çoklu R değerleri güçlü bir korelasyon olarak kabul edilmiştir. Ayrıca mayanın hidrofobisitelerini belirlemek için kullanılan çözücüler arasında ve antioksidan aktivitenin belirlenmesinde kullanılan farklı yöntemler arasında anlamlı bir fark olup olmadığını belirlemek için tek yönlü ANOVA testi yapılmış ve $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. *P. kudriavzevii* JD2 Maya Suşunun Bazı Probiyotik Özellikleri

4.1.1. Antikolesterol aktivite

P. kudriavzevii JD2 maya suşunun kolesterol giderme yeteneği, safrasız (kontrol), %0,2, %0,4 ve %0,6 safra tuzları (oxgall, Sigma) ve 100 µg/mL kolesterol içeren YPD sıvı besi ortamlarındaki kolesterol presipitasyonları ve % kolesterol giderimleri olarak tespit edilmiştir.

P. kudriavzevii JD2 suşunun son kültür pH değerleri incelendiğinde, en düşük pH değeri %0,2 safra içeren besiyerinde (pH 6,49), en yüksek pH değeri ise %0,6 safra içeren besiyerinde (pH 6,58) bulunmuş ancak safra konsantrasyonunun ortamın pH'ında fazla bir değişikliğe sebep olmadığı gözlemlenmiştir. Çalışmada test edilen suş, %51-62 kolesterol giderimi ve 33,8 ve 38,2 µg/mL arasında kolesterol presipitasyonu yaptığı tespit edilmiştir. (Çizelge 4.1). Artan safra konsantrasyonuna bağlı olarak kolesterol gideriminde ve presipitasyonunda azalma gözlenmiş ancak kolesterol giderimi/kolesterol presipitasyonu ile safra konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Çalışmada ayrıca, artan safra konsantrasyonu ile suşun kolesterol giderimi/presipitasyonu arasındaki ilişki regresyon analizi ile belirlenmiştir. Çoklu R değerleri 0,75'ten büyük olduğu için kontrole göre orta ve negatif korelasyon olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. *P. kudriavzevii* JD2 suşunun 100 µg/mL kolesterol varlığında safrasız, %0,2, %0,4 ve %0,6 safra tuzları içeren YPD besiyerinde kolesterol presipitasyonu ve giderimi

	JD2+Kolesterol	JD2+%0,2 Safra	JD2+%0,4 Safra	JD2+%0,6 Safra
Kültür pH'ı	6,46±0,02	6,49±0,04	6,51±0,03	6,58±0,01
Kolesterol presipitasyonu (µg/mL)	38,2±2,0	35,9±5,0	34,1±3,0	33,8±2,0
%Kolesterol giderimi	62	55	52	51

10 mg/mL prebiyotik (EPS_{JD2}) ilavenin kolesterol giderimi ve kolesterol presipitasyonuna etkisinin belirlendiği çalışmada, *P. kudriavzevii* JD2 suşunun EPS_{JD2} içeren ortamda son kültür pH değerleri incelendiğinde, prebiyotik ilavesiz ortamda olduğu gibi en düşük pH değeri %0,2 safra içeren besiyerinde (pH 6,50), en yüksek pH değeri ise %0,6 safra içeren besiyerinde (pH 6,56) bulunmuştur. Safra konsantrasyonunun ve prebiyotiğin ortamın pH'ında fazla bir değişikliğe sebep olmadığı gözlemlenmiştir. JD2 suşunun EPS_{JD2} içeren ortamdaki kolesterol giderimi yüzdesi %52-65 arasında ve kolesterol presipitasyonu 34,8-41,2 µg/mL arasında değişmiştir (Çizelge 4.2). Artan safra konsantrasyonuna bağlı olarak kolesterol gideriminde ve presipitasyonunda azalma gözlenmiş ancak kolesterol giderimi/kolesterol presipitasyonu ile safra konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Çalışmada ayrıca, artan safra konsantrasyonu ile suşun kolesterol giderimi/presipitasyonu arasındaki ilişki regresyon analizi ile belirlenmiştir. Çoklu R değerleri 0,75'ten büyük olduğu için kontrol grubuna göre güçlü ve negatif bir korelasyon olduğu belirlenmiştir. Deney sonucunda, prebiyotiğin (EPS_{JD2}) *P. kudriavzevii* JD2'nin kolesterol giderme ve biriktirmesinde çok önemli bir farklılığa ($p>0,05$) neden olmadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. *P. kudriavzevii* JD2 suşunun 10 mg/mL EPS_{JD2} ve 100 µg/mL kolesterol varlığında safrasız, %0,2, %0,4 ve %0,6 safra tuzları içeren YPD besiyerinde kolesterol presipitasyonu ve giderimi

	JD2+EPS _{JD2} +Kolesterol	JD2+EPS _{JD2} +%0,2 Safra	JD2+EPS _{JD2} +%0,4 Safra	JD2+EPS _{JD2} +%0,6 Safra
Kültür Ph	6,44±0,03	6,50±0,02	6,52±0,01	6,56±0,05
Kolesterol presipitasyonu (µg/mL)	41,2±2,0	37,9±5,0	35,1±3,0	34,8±2,0
%Kolesterol giderimi	65	58	55	52

4.1.2. Yapay mide ve bağırsak sıvılarında canlılık

Mide ve bağırsak sıvılarına toleransı, mikroorganizmaların gastrointestinal sistemden geçişlerine izin verdiği için önemli probiyotik özelliklerinden biridir.

P. kudriavzeii JD2 maya suşunun yapay mide sıvısında canlılığı;

Bu çalışmada, *P. kudriavzeii* JD2'nin mide sıvısına toleransı, farklı pH'larda (2, 3, 4 ve 6,2-kontrol) hazırlanan yapay mide sıvısında 0 (kontrol), 60 ve 180. dakikalardaki canlılıklarına (log kob/mL ve % canlılık) göre belirlenmiştir (Çizelge 4.3, Şekil 4.1). Suşun farklı pH ortamlarına karşı tolereanslılıkları farklılıklılık gösterirken, genel olarak ortam asitliliğinin yükselmesi (pH'ın düşmesi) ve sürenin artması ile suşun canlılığın da azalış gözlemlenmiştir. İnkübasyondan 60 ve 180 dakika sonra en yüksek canlı hücre sayısı, pH 3'te (sırasıyla 5,82 log kob/mL, 5,48 log kob/mL) tespit edilmiştir.

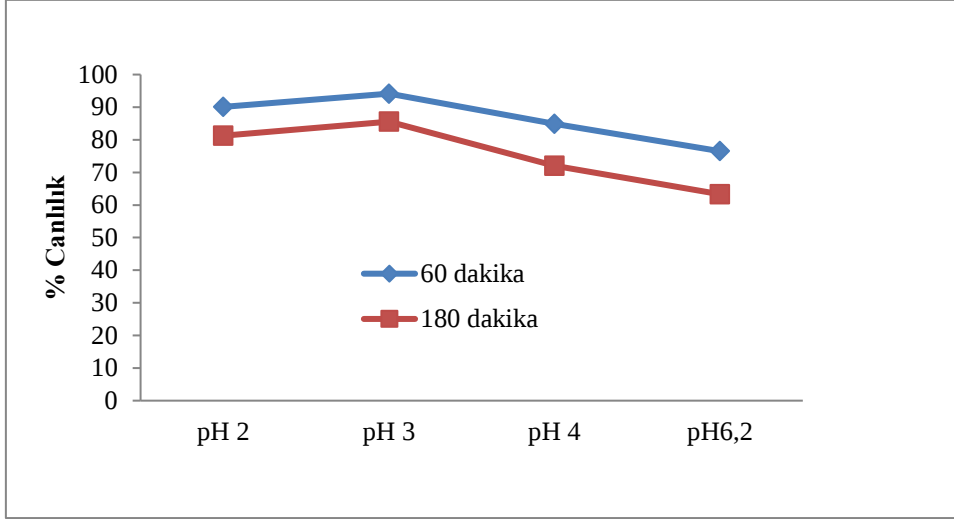
P. kudriavzeii JD2 suşunun pH 2 ve pH 3 yapay mide sıvılarında 60 ve 180 dakikalık inkübasyon sonrası canlılıklarının pH 4 ve pH 6,2 ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Midenin pH'sına en yakın olan pH 3,0'te suşun yüksek direnç gösterdiği gözlemlenmiştir. pH değeri ile suşun canlılığı arasındaki korelasyon regresyon analizi ile belirlenmiştir. Sıfırıncı dakikada; çoklu R değerleri 0,75'ten büyük olduğundan, güçlü ve pozitif bir korelasyon ve 60. ve 180. dakikalarda ise çoklu Rdeğerleri 0,75'ten küçük olduğundan, zayıf ve negatif bir korelasyon belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlarda safra ve pH 3 içeren bağırsak sıvısında *P. kudriavzeii* JD2 mayasının canlı hücre sayısı ve % canlılığı

pH	Canlı Hücre Sayısı (logkob/mL)			% Canlılık		Multiple R değeri	Significant F
	0 dk	60 dk	180 dk	60 dk*	180 dk**		
2	4,64±0,4	4,18±0,9	3,77±0,7	90,08	81,25	0,85	0,15
3	5,82±0,1	5,48±0,8	4,98±0,4	94,15	85,56	-0,25	0,75
4	5,44±1,3	4,62±0,7	3,92±0,2	84,92	72,05	-0,56	0,44
6,2	5,83±0,3	4,46±0,9	3,69±0,3	76,50	63,29		

* %Canlılık= (60/0)×100

** %Canlılık= (180/0)×100



Şekil 4.1. *P. kudriavzeii* JD2 suşunun farklı pH'larda 60 ve 180 dakikada % canlılığı

P. kudriavzeii JD2 maya suşunun yapay bağırsak sıvısında canlılığı;

Bu çalışmada, *P. kudriavzeii* JD2'nin bağırsak sıvısına toleransı, farklı safra oranlarda (%0,06, %0,15 ve %0,30) hazırlanan yapay bağırsak sıvısında 0 (kontrol), 1 ve 240. dakikalardaki canlılıklarına (log kob/mL ve % canlılık) göre belirlenmiştir (Çizelge 4.4, Şekil 4.2). Suşun farklı safra ortamlarına karşı tolereanslılıkları farklılıklılık göstermekle birlikte genel olarak ortamdaki safra konsantrasyonu ve süre arttıkça suşun canlılığı azalmıştır. Maya en yüksek canlılığı 0. dakika ve %0,06 safra konsantrasyonunda (5,95 log kob/mL) gösterirken inkübasyondan 1 ve 240 dakika sonra canlı hücre sayısında azalma (sırasıyla, 5,37 log kob/mL, 4,81 log kob/mL) tespit edilmiştir.

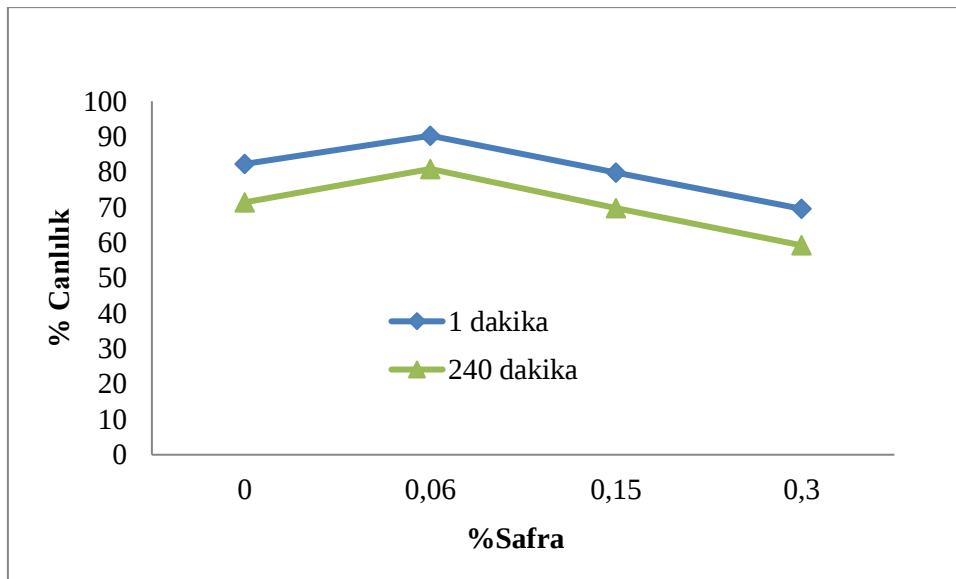
Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyonlarda safra ve pH 3 içeren bağırsak sıvısında *P. kudriavzeii* JD2 mayasının canlı hücre sayısı ve % canlılığı

%Safra	Canlı Hücre Sayısı (logkob/mL)			% Canlılık		Multiple R değeri	Significant F
	0 dk	1 dk	240 dk	1 dk*	240 dk**		
0	5,41±0,41	4,45±0,20	3,86±0,11	82,25	71,34	-0,92	0,08
0,06	5,95±0,23	5,37±0,40	4,81±0,12	90,25	80,84	-0,99	0,01
0,15	4,60±0,24	3,67±0,21	3,21±0,30	79,78	69,78	-0,96	0,04
0,30	3,68±0,40	2,56±0,30	2,18±0,50	69,56	59,23		

* %Canlılık= (1/0)×100

** %Canlılık= (240/0)×100

P. kudriavzeii JD2 suşunun yapay bağırsak sıvısındaki en yüksek canlılığı %0,06 safra konsantrasyonunda %90,25 bulunmuştur. %0,06 safra konsantrasyonu *P. kudriavzeii* JD2 suşunun büyümesini uyarmıştır. *P. kudriavzeii* JD2 suşunun canlılığı artan safra konsantrasyonları ve zamana bağlı olarak azalmıştır. Çizelge 4.4'te gösterildiği gibi, sırasıyla %0,15 ve %0,30 safra konsantrasyonlarında 240 dakikada canlılıkları sırasıyla (%69,78 ve %59,23) olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, ortamdaki safra konsantrasyonu arttıkça bakteri canlılığında önemli ($p<0,05$) bir düşüş meydana gelmiştir. Safra konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak suşun canlılığının azalması arasındaki korelasyon ise regresyon analizi ile belirlenmiş ve çoklu R değerleri 0,75'ten büyük olduğu için güçlü ve negatif bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir.

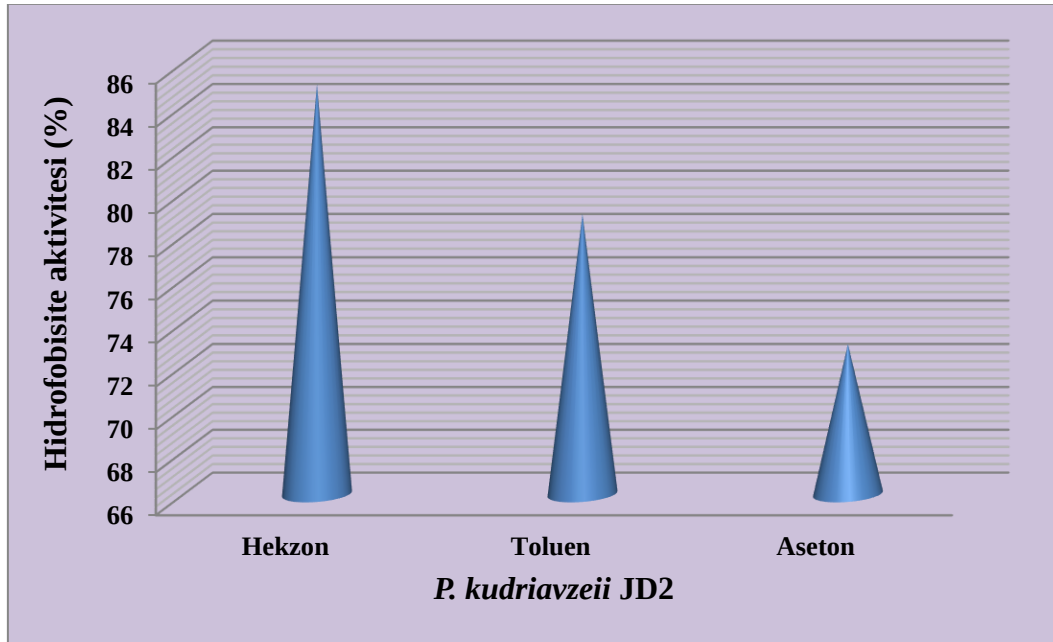


Şekil 4.2. *P. kudriavzeii* JD2 suşu farklı safra konsantrasyondaki yapay bağırsak sıvısında canlılıkları

4.1.3. Hidrofobosite

P. kudriavzeii JD2 suşunun hidrofobikliği, *P. kudriavzeii* JD2 suşunun hidrofobikliği, toluen, hekzon ve aseton hidrokarbonlarına mikrobiyal tutunma yüzdesi ile belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 4.3.'te verilmiştir.

P. kudriavzeii JD2, monopolar bazik çözücü aseton hidrokarbonuna %73 hidrofobosite gösterirken, polar nötral çözücü toluen hidrokarbonuna %79 ve monopolar asidik çözücü hekzon %85 hidrofobosite göstermiştir. Maya suşunun üç çözücünde de hidrofobosite göstermesi suşun hücre yüzey yapısının kompleks olduğunu göstermiştir. Hidrofobosite çalışmalarında kullanılan çözücülerin mayanın hidrofobikliği üzerinde bir etkisinin olup olmadığı istatistiksel olarak belirlenmiş ve kullanılan çözücüler arasında önemli bir fark olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$).



Şekil 4.3. *P. kudriavzeii* JD2 maya suşunun hidrokarbonlara karşı hidrofobisitesi (%)

4.2. Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimi

P. kudriavzeii JD2 maya suşunun kültür ortamındaki EPS miktarı 192 ± 2 mg/L liyofilizasyondan sonraki toplam karbohidrat miktarı ise 246 ± 2 mg/L olarak belirlenmiştir. Kültür ortamındaki EPS ve liyofilize EPS (Resim 4.1) de protein ve nükleik asit bulaşı görülmemiştir. Liyofilizasyondan sonra EPS miktarının yüksek olmasının yüksek

hacimlerde kültür kullanılması ve kısmi saflaştırma ile yüksek hacimlerde EPS elde edilmesi olduğu düşünülmüştür.

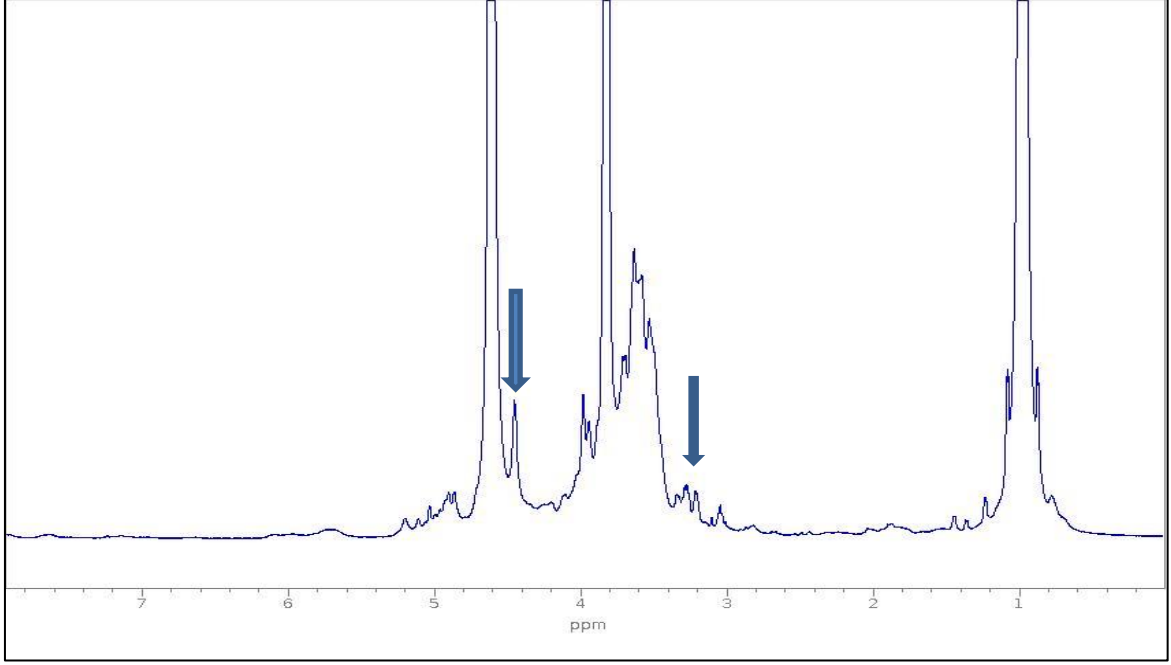


Resim 4.1. *P. kudriavzevii* JD2'den elde edilen ekzopolisakkaritin (EPS_{JD2}) liyofilizasyon sonrası görüntüsü

4.3. EPS_{JD2}'nin Karakterizasyonu

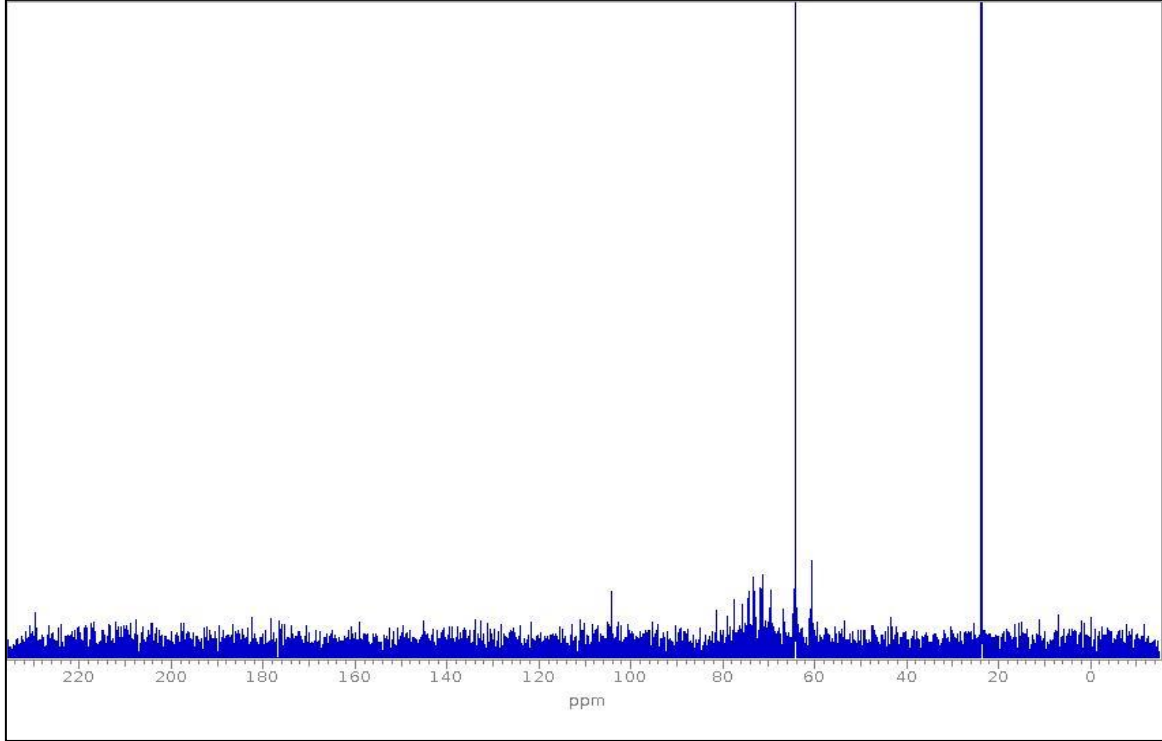
EPS_{JD2}'nin Monomer Bileşiminin Belirlenmesi (HPLC): HPLC analizi ile EPS_{JD2}'de 1,7 mg/mL miktarında glukoz tespit edilirken, maltoz, galaktoz, ramnoz, riboz, rafinoz, mannoz, arabinoz, sukroz ve fruktoz monomerlerine rastlanmamıştır.

EPS_{JD2}'nin Bağ Yapılarının Belirlenmesi (NMR): Bu çalışmada *P. kudriavzevii* JD2 suşundan elde edilen EPS_{JD2}'nin bağ yapılarını belirleyebilmek amacıyla bir ve iki boyutlu NMR yöntemleri kullanılmıştır. ¹H-NMR, COSY, NOESY ve HMQC, ¹³C-APT NMR analizleri yapılmıştır. Çalışılan EPS_{JD2}'lerin HPLC analizleri ile uyumlu olarak polisakkarit yapısında bulunan glukoz miktarları ¹H-NMR spektrumlarında anlamlı pikler verecek oranlarda bulunmuştur. ¹H-NMR spektrumunda, glikoz yapısında bulunan hidrojenlere ait piklerin kimyasal kayma değerleri genellikle üç bölgeye ayrılmaktadır. Aynı d.H₂O'da çözündüğünde proton NMR'si alındığında 4,4 ppm civarında ortaya çıkan pik α - (1 $\rightarrow$ 3)-glukozun protonuna ait olduğu belirlenmiştir. 3,15 ile 3,45 ppm arasındaki sinyaller β -D-glukozun 2 numaralı protonuna aitken, diğer sinyaller su pikinin altında olduğu için gözlenememiştir (Şekil 4.4).



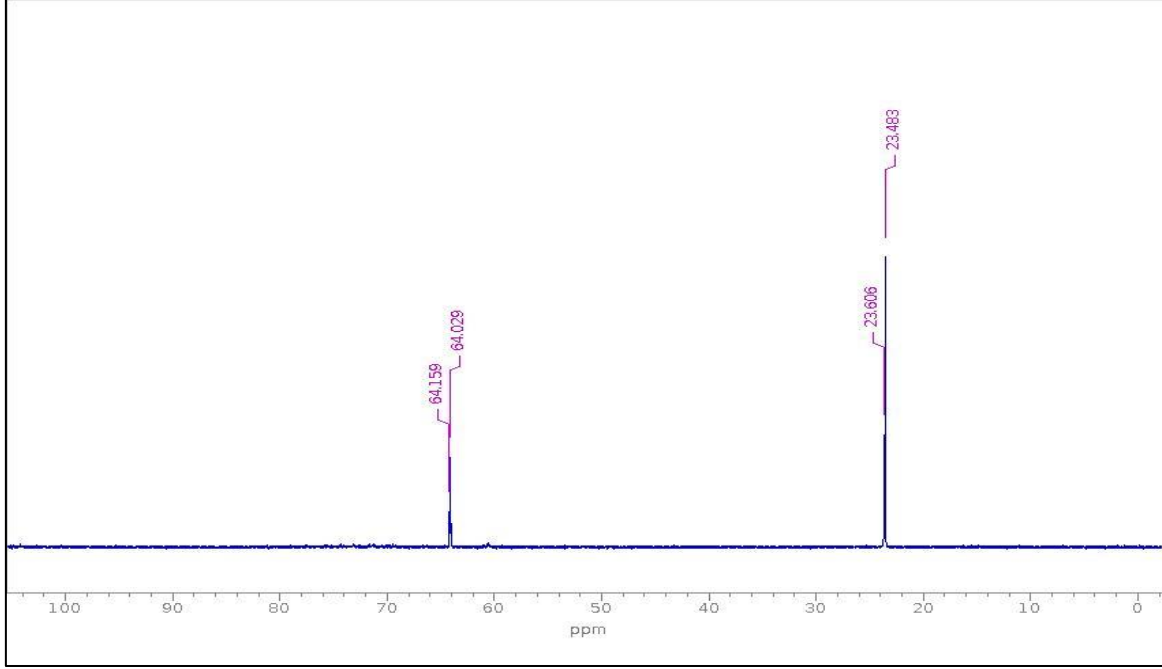
Şekil 4.4. ^1H -NMR spektrumunda, *P. kudriavzevii* suşu JD2'den izole edilen EPS_{JD2} 'lerin glukoz yapısındaki hidrojen kimyasal kayma değerleri

^{13}C -NMR spektrumunda (Şekil 4.5), δC 20,22 ve 60,24 ppm'deki C-1 sinyali bir α -D-glukoz α -heksopiranozil tortusuna atanmıştır. Anomerik karbon C-1 ve C-6, α -(1,6) bağlarını uzatan ve sırasıyla δC 20,22 ve 50,54 piklerine atanan zincirde yer alırken, δC 73,37; 71,37; 70,15 ve 69,50 pikleri C-3'ü temsil etmektedir. C-2, C-5 ve C-4'ün, sırasıyla dallanma ile ilgili olmadığı tespit edilmiştir. Anomerik bölgede (δC 110 ppm) C-2 için, bir piranoz halkası konfigürasyonuna sahip bir monomer şekeri düşündüren sinyal olmadığı gözlemlenmiştir. δC 102 ppm'nin üzerinde bir kimyasal kaymanın olmaması, glukoz birimi için bir α -konfigürasyonu göstermiştir. ^{13}C - ve ^1H - NMR spektrumlarında dallanma sinyali olmaması dallanmamış doğrusal polimer EPS yapısını doğrulamıştır.



Şekil 4.5. EPS'nin NMR spektrumu, ^{13}C -NMR spektrumu

Nükleer Overhauser Etkisi Spektroskopisi veya NOESY, diğer yöntemlerde görülen doğrudan bağ etkileşimlerinden ziyade molekül içindeki boşluk içi etkileşimleri göstermektedir. Bu yöntem özellikle bir moleküldeki stereokimyasal ilişkileri belirlemek için kullanışlıdır. İki stereoizomerde, atomların hepsi tam olarak aynı sırada ve aynı bağlarla bağlanır. Çalışmamızda NOESY spektrumunda aynı alanı paylaşan (birbirlerinin elektron yoğunluğunu etkileyen) protonların (H) çapraz pikleri gözlenmektedir. NOESY spektrumundaki çapraz pikler yardımıyla monomerlerin bağlanma sırası ve bu bağlanmaların stereokimyası belirlenmiştir. NOESY spektrumunda aynı uzayı paylaşan (birbirinin elektron yoğunluğunu etkileyen) protonlara (H) ait kross pikler gözlenmektedir. NOESY spektrumunda yer alan kross pikler yardımıyla monomerlerin hangi sırayla bağlandığı ve bu bağlanmaların stereokimyası belirlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. EPS'nin nükleer overhauser etkisi spektroskopisi (NOESY)

EPS_{JD2}'nin Molekül Ağırlığının Belirlenmesi (SEC): Standarda göre EPS_{JD2}'in moleküler ağırlığı belirlenmiş, sonuçlar Çizelge 4.5'de verilmiştir. Çizelgede verilen Mp değerleri en yüksek pike ait molekül ağırlığını, Mn değerleri sayıca ortalama moleküler ağırlığı, Mw değerleri ağırlıkça ortalama molekül ağırlığını, Mz değerleri Z ortalama moleküler ağırlığı, Pd değerleri polidispersite indeksini ve Rt değerleri alıkonma zamanını ifade etmektedir. Elde edilen sonuçların polidispers polimerler için $M_n < M_w < M_z$ kuralına uyduğu belirlenmiştir. Yüksek Pd değeri daha geniş moleküler ağırlığı dağılımı ifade etmektedir. EPS_{JD2}'in moleküler ağırlığı 42,309 kDa olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5. EPS_{JD2}'nin boyut dışlama kromatografi sonuçları

EPS _{JD2}	
Mp (kDa) (En yüksek pike ait molekül ağırlığı)	43,70
Mn (kDa) (Sayıca ortalama moleküler ağırlığı)	96,02
Mw (kDa) (Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı)	42,309
Mz (kDa) (Z ortalama moleküler ağırlığı)	98,988
Pd (Polidispersite indeksi)	4,4063
Rt (Alıkonma zamanı)	16,4952

4.4. EPS_{JD2} ve İnulinin Prebiyotik Aktivite Skorlarının Belirlenmesi

Çalışmada, prebiyotik aktivite skoru, belirli fermentasyon süresinde probiyotiklerin prebiyotik (EPS_{JD2} ve inülin) içeren ortamda büyümelerindeki fark ile belirli fermentasyon süresinde patojenin prebiyotik (EPS_{JD2} ve inülin) içeren ortamdaki büyüme farklılıklarından elde edilmiştir. Prebiyotik aktivite skorunun sonuçları Çizelge 4.6’de sunulmuştur. Sonuçlara göre EPS_{JD2}, *L. plantarum* subsp. *plantarum* DSM20246’a karşı 24 saatte denenen bağırsak patojeni *E. coli* ATCC 11229 da 1,33 prebiyotik skor aktivitesi gösterirken 48 saatte prebiyotik skor aktivitesi 2,44 olarak belirlenmiştir. *L. plantarum* subsp. *plantarum* DSM20246 suşunun EPS_{JD2}’deki prebiyotik skor aktivitesinin (1,33-2,44), inulinden düşük olduğu (2,45-4,21) tespit edilmiştir. EPS_{JD2}, *S. cerevisiae* BU19’a karşı 24 saatte denenen bağırsak patojeni *E. coli* ATCC 11229 da 0,48 prebiyotik skor aktivitesi gösterirken 48 saatte prebiyotik skor aktivitesi 1,17 olarak bulunmuştur. *S. cerevisiae* BU19 suşunun EPS_{JD2} deki prebiyotik skor aktivitesinin (0,48-1,77), inulinden yüksek olduğu (0,27-0,34) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.6. EPS_{JD} ve inulinin prebiyotik aktivite skoru (log kob/mL)

Suşlar	Prebiyotik Skor 24 saat		Prebiyotik Skor 48 saat	
	<i>E. coli</i> ATCC 11229		<i>E. coli</i> ATCC 11229	
	EPS _{JD}	İnulin	EPS _{JD2}	İnulin
<i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> DSM20246	1,33±0,50	2,45±0,11	2,44±0,24	4,21±0,40
<i>S. cerevisiae</i> BU19	0,48±0,25	0,27±0,21	1,17±0,03	0,34±0,12

4.5. EPS_{JD2}’nin Mide Sıvısında Hidrolizi

Çalışmada *P. kudriavzevii* JD2 suşundan elde edilen EPS_{JD2}’nin farklı pH’lardaki (pH 3 ve pH 5) mide sıvısına direnci 0, 1, 2 ve 3 saatlik inkübasyon sürelerinden sonra araştırılmış ve sonuçlar Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Farklı inkübasyon sürelerinde (1. saat hariç) pH 3’te EPS_{JD2}’nin yüzde hidrolizi pH 5’ten daha yüksek olarak bulunmuştur. EPS_{JD2}’nin en yüksek hidrolizi 3. saatte pH’ı 3 olan mide sıvısında (%4,88) gözlemlenmiştir. Bu ortamdaki inülinin yüzde hidrolizi ise EPS_{JD2}’den daha düşük (%3,42) bulunmuştur. pH 5 mide sıvısında tüm saatlerde EPS_{JD2}’nin

hidrolizinin kontrol olarak kullanılan inülinin hidrolizinden düşük olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.7). Hem inülin hem de EPS_{JD2} de farklı pH'daki mide sıvılarında 3. saat sonunda en yüksek yüzde hidroliz değerleri elde edilmiştir. Ticari bir prebiyotik olan inülin ile kıyaslandığında EPS_{JD2}'nin mide asidinde hidrolizinin daha düşük olduğu gözlemlenmiştir.

Hem EPS_{JD2} hem de inulinin pH 3 ve pH 5'teki mide asidinde farklı inkübasyon sürelerindeki hidrolizin ortalamaları arasındaki farkın önemi istatistiksel olarak araştırılmıştır. Farklı pH'daki mide sıvısı ve inkübasyon sürelerinde EPS_{JD2} ve inulinin (kontrol grubu) hidrolizlerinde anlamlı farklılıklar olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 4.7. EPS_{JD2} ve inülinin farklı pH'daki mide sıvısında farklı inkübasyon sürelerindeki % hidrolizi.

SAAT	pH 3		pH 5	
	EPS _{JD2}	İnulin	EPS _{JD2}	İnulin
0	1,01±0,30	1,37±0,05 ^a	0,80±0,06 ^a	2,23±0,00 ^a
1	1,65±0,85	1,87±0,57 ^b	2,27±0,46 ^b	3,66±0,00 ^b
2	3,89±0,22	2,68±0,50 ^c	2,71±0,14	4,18±0,00 ^c
3	4,88±1,40	3,42±0,52 ^d	3,56±0,20	4,79±0,00 ^d

a,b,c,d,: ortalama fark 0,05 düzeyinde anlamlıdır.

4.6. Postbiyotik İçeriği

Hüresiz süpernatant (Postbiyotik), mikrobiyal büyümeden kaynaklanan metabolitleri ve kullanılan ortamdan kalan besin maddelerini içeren bir sıvıdır. Bu çalışmada maya suşu *P. kudriavzevii* JD2'nin süpernatantının (postbiyotik) içeriğini belirlemek için yapılmıştır. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile şekerlerin, amino asitlerin, fenolik bileşiklerin, gaz kromatografisi (GC) ile yağ asitlerinin ve sıvı kromatografi üçlü kütle spektroskopisi/likit kromatografi tandem kütle spektroskopisi (LS-MS MS) ile yağda ve suda çözülen vitaminlerin varlığı ve miktarları tespit edilmiştir (Çizelge 4.8).

Postbiyotik (CFS_{JD2}) içeriğinde test edilen (glukoz, ksiloz, galaktoz, arabinoz + mannoz, fruktoz ve sakaroz) şekerlerin hepsine rastlanılmıştır. En yüksek şeker konsantrasyonu 11,8 g/100 g ile glukoz, ardından 5.9 g/100 g ile ksiloz olarak belirlenmiştir. Çalışmada, varlığı test edilen 21 amino asitten postbiyotik içerisinde 13 amino asit tespit edilmiştir

(aspartik asit, glutamik asit, serin, glutamin, histidin, glisin, treonin, arginin, alanin, sistin, valin, metiyonin ve prolin). 37 yağ asidinden, postbiyotikte sadece dört yağ asidi belirlenmiştir (kaproik asit (C6:0), palmitik asit (C16:0), stearik asit (C18:0) ve (Z)-9-oktadekenoik asit (C18:1 cis-9)). *P. kudriavzevii* JD2'den ekstrakte edilen postbiyotikte (CFS_{JD2}); hidroksitrezol, 2,4 hidroksifeniletanol, oleuropein, p-Kumariktrol asit, kuinik asit gibi fenolik bileşikler ve B1, B2, B3, B5, B12, D2, D3, E1 ve K1 vitaminlerinin varlığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.8).

4.7. Laktobasil ve Maya Suşlarının EPS_{JD2} ve İnulin'i Fermente Etmesi

Lactiplantibacillus plantarum subsp. *plantarum* DSM20246 suşunun EPS_{JD2} ve inulini fermente edilebilme kapasitesi %2 oranında (glukoz ile aynı oran) inulin ve EPS_{JD2} ilave edilen besiyerlerinde tespit edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.9'de verilmiştir.

L. plantarum subsp. *plantarum* DSM20246 suşunun glukozu çıkarılmış MRS besi ortamında (C-MRS) canlılığı 5,5 log kob/mL, MRS besi ortamında 6,5 log kob/mL, EPS_{JD2}'nin karbon kaynağı olarak eklendiği besi yerinde (EPS_{JD2}-MRS) 6,4 log kob/mL ve inülinli ortamda (İnulin-MRS) 6,0 log cfu/mL olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.9). EPS_{JD2}-MRS besi ortamında *L. plantarum* subsp. *plantarum* DSM20246 suşunun canlılığı kontrol MRS besi ortamındaki canlılığa yakın olması *L. plantarum* subsp. *plantarum* DSM20246 suşunun EPS_{JD2}'yi glukoz gibi fermente ederek gelişebildiğini göstermektedir. EPS_{JD2}-MRS besi ortamının pH değerinin (pH 6,2) MRS besiyerine yakın olması (pH 6,5) EPS_{JD2}'nin fermentasyonuna bağlı olarak yorumlanmıştır.

Çizelge 4.8. CFS_{JD2}'nin metabolit içerikleri

CFS _{JD2} 'nin içerikleri									
Şeker	Miktar (g/100g)	Amino asitler	Miktar (g/100g)	Yağ asitleri	Miktar %	Fenolik bileşikler	Miktar (ppm)	Vitamin	Miktar (ppb)
Glukoz	11,8	Aspartik asit	0,012	C6:0	0,019	Hidroksitrezol	22,06688	Vitami D2	0,15
Ksiloz	5,9	Glutamik asit	0,005	C16:0	0,038	2,4 Hidroksifeniletanol	38,22963	Vitami K1	0,1
Galaktoz	0,7	Serin	0,005	C18:0	0,028	Oleuropein	56,52975	Vitami B2	1,1
Arabinoz + Mannoz	1,2	Glutamin	0,003	C18:1 cis-9	0,015	p-Kumarik Asit	18,22365	Vitami B3	0,4
Fruktoz	0,7	Histidin	0,004			Resveratrol	6,58628	Vitami B12	0,8
Sakkaroz	0,1	Glisin	0,011			Kuinik Asit	11,74304	Vitami D3	1
		Treonin	0,001					Vitami B5	0,7
		Arginin	0,02					Vitami B1	0,5
		Alanin	0,006					Vitami E1	0,8
		Sistin	0,003						
		Valin	0,007						
		Metiyonin	0,014						
		Prolin	0,023						

Çizelge 4.9. *L. plantarum* subsp. *plantarum* DSM20246 suşunun farklı besiyerlerindeki canlılık sayıları (log kob/mL)

Bakteri	Besiyeri	Canlılık sayısı (log kob/mL)	pH
<i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> DSM20246	MRS ^a	6,5±1,3	6,2
	C-MRS ^b	5,5±1,1	6,4
	EPS _{JD2} -MRS ^c	6,4±1,1	6,2
	İnulin-MRS ^d	6,0±1,4	6,2

a, MRS besiyeri ortamı

b, Glukozu çıkarılmış MRS besiyeri ortamı

c, Glukozu çıkarılmış MRS besiyerine %2 oranında EPS_{JD2} ilavesi ile hazırlanmıştır

d, Glukozu çıkarılmış MRS besiyerine %2 oranında inulin ilavesi ile hazırlanmıştır

Saccharomyces cerevisiae BU19 maya suşunun EPS_{JD2} ve inulini fermente edilebilme kapasitesi, %2 oranında (glukoz ile aynı oran) inulin ve EPS_{JD2} ilave edilen besiyerlerinde tespit edilmiştir. *S. cerevisiae* BU19 suşunun glukozu çıkarılmış YPD besi ortamında (C-YPD) canlılığı 6,2 log kob/mL, YPD besi ortamında ve EPS_{JD2}'nin karbon kaynağı olarak eklendiği besi yerinde (EPS_{JD2}-YPD) 7,6 log kob/mL ve inülinli ortamda (İnulin-YPD) 6,8 log cfu/mL olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.12). EPS_{JD2}-YPD besi ortamında *S. cerevisiae* BU19 suşunun canlılığı kontrol MRS besi ortamındaki canlılık ile aynı olması *S. cerevisiae* BU19 suşunun EPS_{JD2}'yi glukoz gibi fermente ederek gelişebildiğini göstermektedir. *S. cerevisiae* BU19'un inülinli ortamdaki (İnulin-YPD) canlılığın kontrol ortamından (YPD) daha az (6,8 log cfu/mL) olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. *S. cerevisiae* BU19 farklı besiyerlerindeki canlılık sayıları (log kob/mL)

Maya	Besiyeri	Canlılık sayısı (log kob/mL)	pH
<i>S. cerevisiae</i> BU19	YPD ^a	7,6±1,4	6,2
	C-YPD ^b	6,2±1,1	6,5
	EPS _{JD2} -YPD ^c	7,6±1,2	6,2
	İnulin-YPD ^d	6,8±1,6	6,2

a, YPD besiyeri ortamı

b, Glukozu çıkarılmış YPD besiyeri ortamı

c, Glukozu çıkarılmış YPD besiyerine %2 oranında EPS_{JD2} ilavesi ile hazırlanmıştır

d, Glukozu çıkarılmış YPD besiyerine %2 oranında inulin ilavesi ile hazırlanmıştır

4.8. Prebiyotik (EPS_{JD2}), Postbiyotik (CFS_{JD2}) ve Ticari İnülinin Bakteri (LGD) ve Maya (MGD) Gelişimini Düzenleyici Etkisi

Laktobasil gelişimini düzenleyici (LGD) etki için çalışmada inulin, prebiyotik (EPS_{JD2}) ve postbiyotik (CFS_{JD2}) uygulamalarının *L. plantarum* subsp. *plantarum* DSM20246 suşunun gelişimini düzenleyici etkileri karşılaştırılmıştır. MRS besiyerine glukoz yerine, farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 5 ve 10 mg/mL) EPS_{JD2}, CFS_{JD2} ve inulin ilave edilmiştir

(Çizelge 4.11). Üç uygulamada da konsantrasyon artışına bağlı olarak laktobasil gelişimi kontrol ortamına (MRS) göre önemli ölçüde artmıştır ($p<0,05$).

0,5 mg/mL'lik postbiyotik (CFS_{JD2}) içeren ortamda *L. plantarum* subsp. *plantarum* DSM20246 suşunun canlılığı 6,5 log kob/mL iken 10 mg/mL'lik postbiyotik (CFS_{JD2}) içeren ortamda ise 8,0 log kob/mL olarak belirlenmiştir. *L. plantarum* subsp. *plantarum* DSM20246 suşunun 10 mg/mL'lik prebiyotik (EPS_{JD2}) içeren ortamda canlılığı 7,5 log kob/mL iken 10 mg/mL'lik inulin içeren ortamda ise canlılığı 6,5 log kob/mL olarak tespit edilmiştir. *L. plantarum* subsp. *plantarum* DSM20246 suşuna karşı postbiyotik uygulamanın prebiyotik ve inulin uygulamalarından daha yüksek bir LGD etkisi olmuştur. Laktobasil gelişimini düzenlemede, CSF_{JD2} ve EPS_{JD2} ticari prebiyotik olan inüline alternatif olarak kullanılabilecektir. Artan CSF_{JD2}, EPS_{JD2} ve inulin konsantrasyonları ile *L. plantarum* subsp. *plantarum* DSM20246 suşunun canlılığı arasındaki ilişki istatistiksel olarak regresyon analizi ile belirlenmiş ve çoklu R değerleri 0,75'ten büyük olduğundan (sırasıyla 0,94, 0,89 ve 0,98) konsantrasyon artışı ile canlılık arasında güçlü ve pozitif bir ilişki bulunmuştur.

Çizelge 4.11. Postbiyotik (CFS_{JD2}), Prebiyotik (EPS_{JD2}) ve ticari inülinin laktobasil gelişimini düzenleyici etkisi

Besiyeri	<i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> DSM20246 (log kob/mL)					
MRS ^a	6,5±1,3					
C-MRS ^b	5,3±1,1					
	0,5 (mg/mL)	1 (mg/mL)	5 (mg/mL)	10 (mg/mL)	Multiple R value	Significant F
CFS _{JD2} -MRS ^c	6,8±1,5	7,2±1,3	7,7±1,3	8,0±1,1	0,94	0,06
EPS _{JD2} -MRS ^d	6,4±1,2	6,9±1,4	7,3±1,2	7,5±1,2	0,89	0,11
İnülin-MRS ^e	5,5±1,4	5,8±1,0	6,2±1,2	6,7±1,3	0,98	0,02

a; MRS besi ortamı.

b; %2 glukozu çıkarılmış MRS besi ortamı

c; %2 glikoz çıkarılmış MRS ortamına eklenen farklı konsantrasyonlarda CFS_{JD2} içeren ortam.

d;%2 glikoz çıkarılmış MRS ortamına eklenen farklı konsantrasyonlarda L-EPS içeren ortam.

e; %2 glikoz çıkarılmış MRS ortamına eklenen farklı konsantrasyonlarda inülin içeren ortam.

Çizelge 4.12. CFS_{JD2}, EPS_{JD2} ve ticari inülinin maya gelişimini düzenleyici etkisi

Besiyeri	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BU19 (log kob/mL)					
YPD ^a	7,6±1,5					
C-YPD ^b	6,4±1,2					
	0,5 (mg/mL)	1 (mg/mL)	5 (mg/mL)	10 (mg/mL)	Multiple R value	Significant F
CFS _{JD2} -YPD ^c	7,2±1,4	7,7±1,2	8,3±1,3	8,7±1,2	0,94	0,06
EPS _{JD2} -YPD ^d	6,8±1,1	7,1±1,4	7,6±1,2	8,1±1,0	0,98	0,02
İnülin-YPD ^e	5,1±1,5	5,5±1,2	6,0±1,3	6,5±1,4	0,97	0,03

a; YPD besi ortamı.

b; %2 glukozu çıkarılmış YPD besi ortamı

c; %2 glikoz çıkarılmış YPD ortamına eklenen farklı konsantrasyonlarda CFS_{JD2} içeren ortam.

d; %2 glikoz çıkarılmış YPD ortamına eklenen farklı konsantrasyonlarda L-EPS içeren ortam.

e; %2 glikoz çıkarılmış YPD ortamına eklenen farklı konsantrasyonlarda inülin içeren ortam.

Maya gelişimini düzenleyici (MGD) etki için çalışmada inulin, prebiyotik (EPS_{JD2}) ve postbiyotik (CFS_{JD2}) uygulamalarının *S. cerevisiae* BU19 suşunun gelişimini düzenleyici etkileri karşılaştırılmıştır. YPD besiyerine glukoz yerine, farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 5 ve 10 mg/mL) EPS_{JD2}, CFS_{JD2} ve inulin ilave edilmiştir (Çizelge 4.12). Üç uygulamada da konsantrasyon artışına bağlı olarak maya gelişimi kontrol ortamına (YPD) göre önemli ölçüde artmıştır ($p<0,05$).

0,5 mg/mL'lik postbiyotik (CFS_{JD2}) içeren ortamda *S. cerevisiae* BU19 suşunun canlılığı 7,2 log kob/mL iken 10 mg/mL'lik postbiyotik (CFS_{JD2}) içeren ortamda ise 8,7 log kob/mL olarak belirlenmiştir. *S. cerevisiae* BU19 suşunun 10 mg/mL'lik prebiyotik (EPS_{JD2}) içeren ortamda canlılığı 8,1 log kob/mL iken 10 mg/mL'lik inulin içeren ortamda ise canlılığı 6,5 log kob/mL olarak tespit edilmiştir. *S. cerevisiae* BU19 suşuna karşı postbiyotik uygulamanın prebiyotik ve inulin uygulamalarından daha yüksek bir MGD etkisi olmuştur. Maya gelişimini düzenlemede, CSF_{JD2} ve EPS_{JD2} ticari prebiyotik olan inüline alternatif olarak kullanılabilecektir. Artan CSF_{JD2}, EPS_{JD2} ve inulin konsantrasyonları ile *S. cerevisiae* BU19 suşunun canlılığı arasındaki ilişki istatistiksel olarak regresyon analizi ile belirlenmiş ve çoklu R değerleri 0,75'ten büyük olduğundan (sırasıyla 0,94, 0,98 ve 0,97) konsantrasyon artışı ile canlılık arasında güçlü ve pozitif bir ilişki bulunmuştur.

4.9. Probiyotik (JD2), Prebiyotik (EPS_{JD2}), Postbiyotik (CFS_{JD2}), Sinbiyotik (JD2+EPS_{JD2}) ve Postbiyotik+Prebiyotik (CFS_{JD2}+EPS_{JD2}) Uygulamanın Bazı Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi

4.9.1. Antioksidan aktivite

Çalışmada, üç farklı metot (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), süperoksit anyon ve hidroksil radikalini süpürücü aktivitesi) ile probiyotik (JD2), postbiyotik (CFS_{JD2}), farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 5, 10 mg/mL) prebiyotik (EPS_{JD2}), sinbiyotik (JD2+EPS_{JD2}), postbiyotik+prebiyotik (CFS_{JD2}+EPS_{JD2}) uygulamanın, bitkisel kaynaklı ticari prebiyotik inülinin ve pozitif kontrol olarak askorbik asidin antioksidan aktiviteleri tespit edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.13 ve 4.14'te verilmiştir.

Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, en yüksek antioksidan aktivite DPPH metodunda 10 mg/mL'lik CFS_{JD2}+EPS_{JD2} (postbiyotik+prebiyotik) uygulamasında (%86,6), en düşük aktivite ise süperoksit anyon radikali süpürücü aktivitesi metodunda 0,5 mg/mL'lik EPS_{JD2}'de (%44,2) belirlenmiştir. Deneyler, DPPH radikal süpürme aktivitesi,

süperoksit anyon radikal süpürme aktivitesi ve hidroksil radikal süpürme aktivitesi dahil olmak üzere inülinin antioksidan aktivitelerinin, araştırmada incelenen tüm uygulamalara kıyasla zayıf olduğunu göstermiştir ($p<0,05$).

DPPH radikali giderme etkisinin belirlenmesi

P. kudriavzeii JD2 maya süspansiyonunun (probiyotik) antioksidan aktivitesi %67,2 olarak (Resim 4.2) tespit edilirken postbiyotik (CFS_{JD2}) uygulamada %75,4 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.13, Şekil 4.7).



Resim 4.2. Probiyotik *P. kudriavzeii* JD2'nin DPPH radikali giderim etkisi (0: Kontrol grubu, Boş PBS ve DPPH çözeltisi, 1: *P. kudriavzeii* JD2)

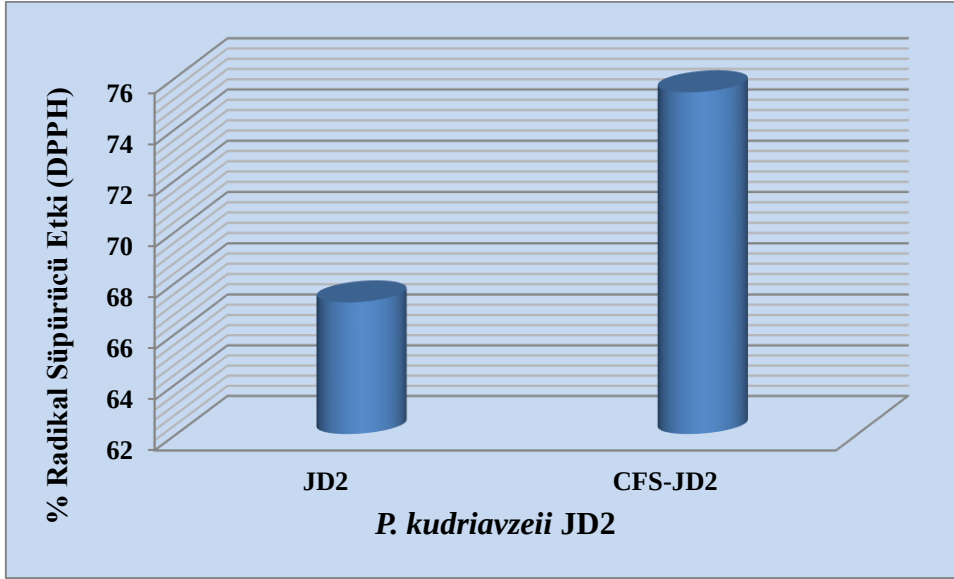
Çizelge 4.13. Probiyotik (JD2), postbiyotik (CFS_{JD2}) ve farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 5, 10 mg/mL) prebiyotik (EPS_{JD2}), sinbiyotik (JD2+EPS_{JD2}), postbiyotik+prebiyotik (CFS_{JD2}+EPS_{JD2}) uygulamanın antioksidan aktiviteleri (%)

Probiyotik	Postbiyotik	Farklı konsantrasyonlarda prebiyotik (mg/mL)						Farklı konsantrasyonlarda sinbiyotik (mg/mL)						Farklı konsantrasyonlarda postbiyotik+prebiyotik uygulama (mg/mL)					
JD2	CFS _{JD2}	EPS _{JD2}				Multiple R value	Significant F	JD2+EPS _{JD2}				Multiple R value	Significant F	CFS _{JD2} +EPS _{JD2}				Multiple R value	Significant F
		0,5	1	5	10			0,5	1	5	10			0,5	1	5	10		
1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini giderme (%)																			
67,2±0,4 ^b	75,4±0,3 ^{b,c}	63,2±0,4	68,2±0,3	73,8±0,3	79,3±0,8	0,96	0,04	66,3±0,6	73,6±0,5	78,4±0,4	83,3±0,3	0,92	0,08	69,8±0,1	74,1±0,3	80,5±0,3	86,6±0,6	0,97	0,03
Süperoksit anyon radikalı süpürücü aktivitesi (%)																			
71,7±0,1 ^a	63,4±0,4 ^{a,b}	44,2±0,4	58,4±0,1	62,6±0,3	67,5±0,8	0,82	0,18	59,0±0,4	68,4±0,5	73,8±0,1	78,4±0,3	0,89	0,11	53,2±0,8	65,3±0,4	69,7±0,6	72,8±0,9	0,81	0,19
Hidroksil radikalı süpürücü aktivitesi (%)																			
68,6±0,6	56,6±0,3	52,3±0,2	55,7±0,2	60,4±0,1	65,5±0,4	0,98	0,02	57,8±0,2	62,9±0,3	66,6±0,3	74,4±0,5	0,97	0,03	54,3±0,2	59,7±0,2	60,0±0,1	69,0±0,4	0,93	0,07

a,b,c,: ortalama fark 0,05 düzeyinde anlamlıdır.

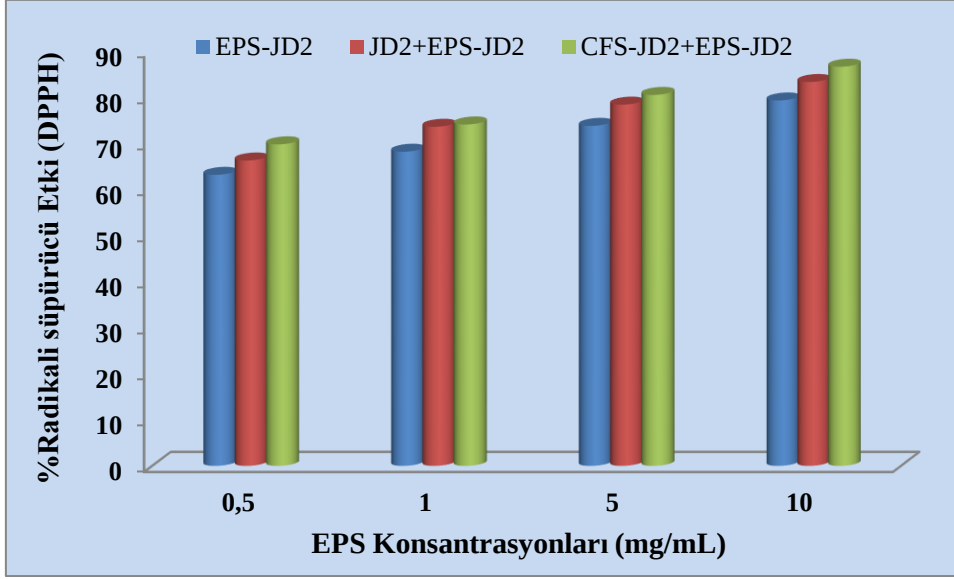
Çizelge 4.14. Farklı konsantrasyonlarda inülin ve askorbik asidin antioksidan aktivitesi (%)

	% Antioksidan Aktivite							
	İnülin (mg/mL)				Askorbik Asidin (mg/mL)			
Metot	0,5	1	5	10	0,5	1	5	10
DPPH	23,2±0,2	46,2±0,2	59,3±0,2	71,4±0,3	37,3±0,5	53,4±0,7	67,4±0,7	84,2±0,3
Süperoksit anyon radikali	22,4±0,7	27,8±0,4	32,2±0,2	41,4±0,5	34,1±0,5	44,6±0,3	52,3±0,4	67,3±0,6
Hidroksil radikali	37,8±0,1	41,9±0,3	56,3±0,4	67,4±0,2	49,4±0,5	58,7±0,4	66,5±0,8	77,9±0,3



Şekil 4.7. Probiyotik (JD2) ve postbiyotik (CFS_{JD2}) uygulamalarda DPPH radikalini giderme

Farklı konsantrasyonlarda prebiyotik, sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamada ise konsantrasyon artışına bağlı olarak DPPH radikali giderme etkisi artmıştır. Aynı zamanda 10 mg/mL'lık hem sinbiyotik (%83,3) hem de postbiyotik+prebiyotik (%86,6) uygulamalarda (Çizelge 4.13 ve Şekil 4.8), prebiyotik (%79,3) uygulamasına kıyasla DPPH radikalini gideriminde artış olmuştur. Kontrol olarak kullanılan ticari bir prebiyotik olan inulinde, 0,5-10 mg/mL konsantrasyonlarda DPPH radikalini süpürücü etkisi %23,2-71,4 arasında değişirken en yüksek giderim 10 mg/mL'lik inülinde belirlenmiştir. İnulinin kullanılan tüm konsantrasyonlarında giderim denenen tüm uygulamalardan az bulunmuştur. Pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asitin 0,5-10 mg/mL konsantrasyonlarda DPPH radikalini giderme aktivitesi %37,3-84,2 arasında değişmiştir (Çizelge 4.14). 10 mg/mL konsantrasyonda sinbiyotik uygulamada (%83,3) DPPH radikalini süpürme aktivitesi askorbik asitin giderimine (%84,2) yakın bulunurken aynı konsantrasyonda ise postbiyotik+prebiyotik uygulamasından (%86,6) daha düşük bulunmuştur. Sonuçlar, denenen uygulamaların DPPH radikalini gidermede güçlü antioksidan etkisi olduğunu göstermiştir.



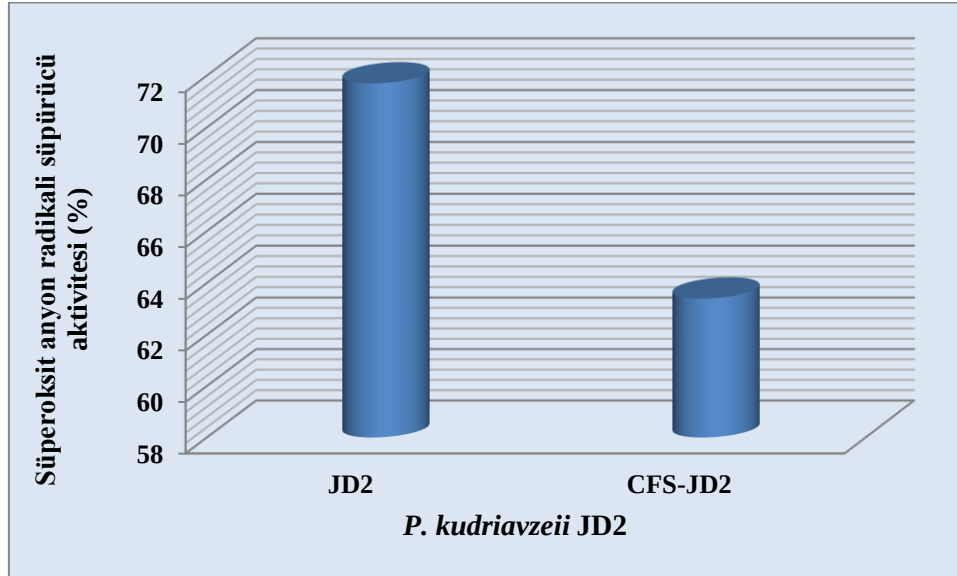
Şekil 4.8. Prebiyotiklerin, sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamalarda DPPH radikalini giderme

Prebiyotik, sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamalarında, artan EPS konsantrasyonları ile DPPH radikal süpürme etkisi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p < 0,05$). Ayrıca çalışmada, konsantrasyon artışı ile DPPH radikal süpürme etkisi arasındaki korelasyon regresyon analizi ile belirlenmiştir. Çoklu R değerleri 0,75'ten büyük olduğu için güçlü ve pozitif bir korelasyon olduğu belirlenmiştir.

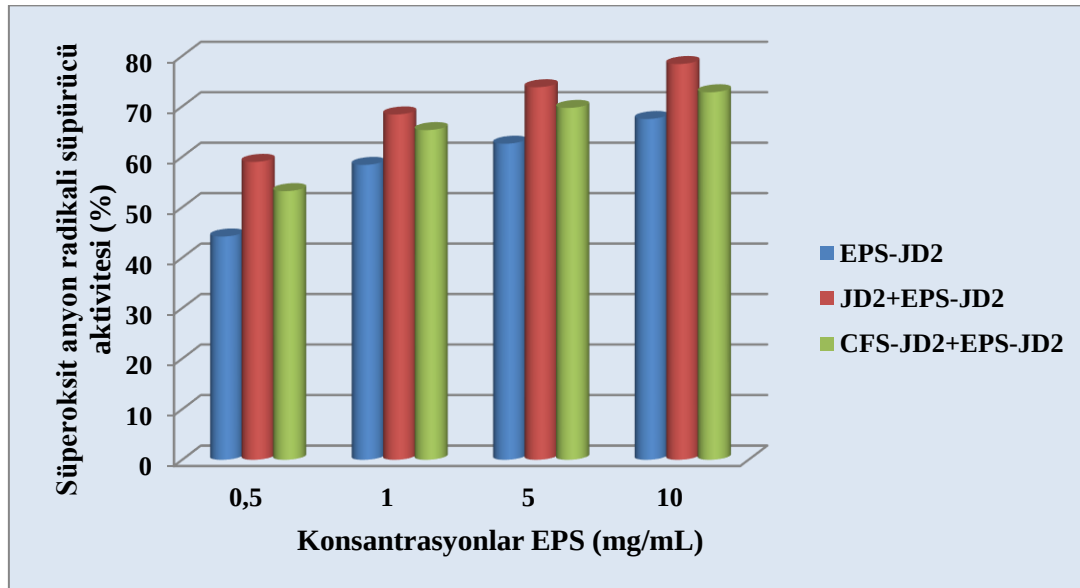
Süperoksit anyon radikalı süpürücü aktivitesi ($O_2^{\cdot-}$)

P. kudriavzeii JD2 maya süspansiyonunun (probiyotik) süperoksit anyon radikalı süpürücü aktivitesi %71,7 olarak tespit edilirken postbiyotik (CFS_{JD2}) uygulamada %63,4 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.9). Farklı konsantrasyonlarda prebiyotik, sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamada ise konsantrasyon artışına bağlı olarak süperoksit anyon radikalını giderme etkisi artmıştır. Aynı zamanda süperoksit anyon radikalının gideriminde, sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamada (Çizelge 4.13 ve Şekil 4.10) prebiyotik uygulamasına göre artış olmuştur. Kontrol olarak kullanılan ticari bir prebiyotik olan inulinde, 0,5-10 mg/mL konsantrasyonlarda süperoksit anyon radikalının süpürücü etkisi %22,4-41,4 arasında değişirken en yüksek giderim 10 mg/mL'lik inulinde belirlenmiştir. İnulinin kullanılan tüm konsantrasyonlarında giderim denenen tüm uygulamalardan az bulunmuştur. Pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asit 0,5-10 mg/mL konsantrasyonlarda süperoksit anyon radikalını aktivitesi %34,1-67,3 arasında değişmiştir (Çizelge 4.14). Farklı konsantrasyonlarda prebiyotik, sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamada süperoksit anyon radikalını aktiviteleri askorbik asitin

gideriminden daha yüksek bulunmuştur. Sonuçlar, denenen uygulamaların süperoksit anyon radikalini gidermede güçlü antioksidan etkisi olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.9. Probiyotik (JD2) ve postbiyotik (CFS_{JD2}) uygulamalarda süperoksit anyon radikalini süpürücü aktivite



Şekil 4.10. Prebiyotiklerin, sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamalarda süperoksit anyon radikalini süpürücü aktivite

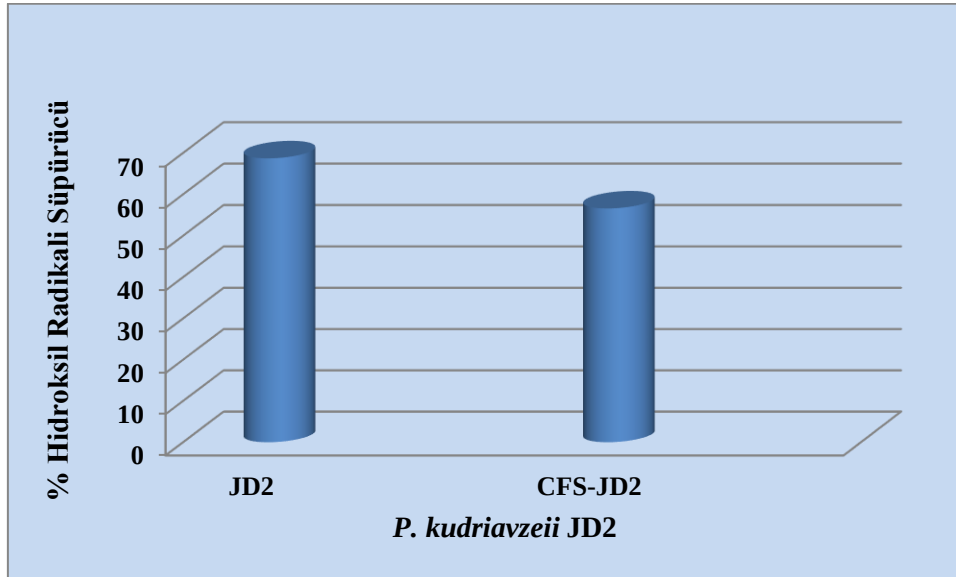
Prebiyotik, sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamalarda, artan EPS konsantrasyonlarıyla süperoksit anyon radikalini giderimi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiş ($p < 0,05$) ve konsantrasyon artışı ile süperoksit anyon radikalini gideriminde etkisi arasındaki korelasyon regresyon analizi ile de belirlenmiştir.

Çoklu R değerleri 0,75'ten büyük olduğu için güçlü ve pozitif bir korelasyon olduğu belirlenmiştir.

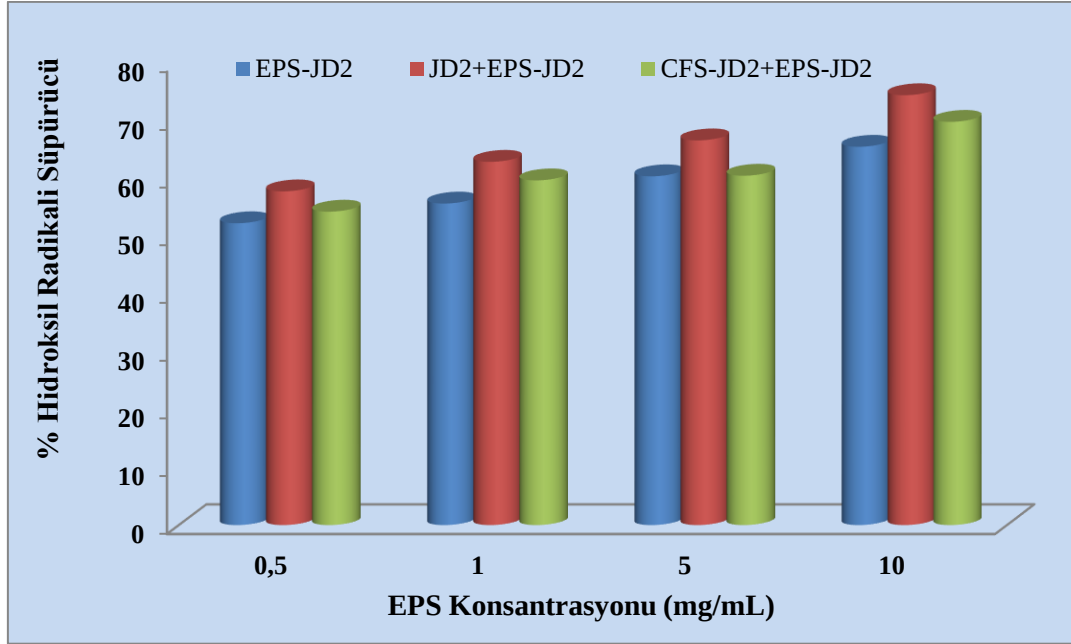
Hidroksil radikal süpürücü aktivitesi ($\cdot\text{OH}$)

P. kudriavzeii JD2 maya süspansiyonunun (probiyotik) hidroksil radikali süpürücü aktivitesi %68,6 olarak tespit edilirken postbiyotik (CFS_{JD2}) uygulamada %56,6 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.13, Şekil 4.11).

Farklı konsantrasyonlarda probiyotik, sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamada ise konsantrasyon artışına bağlı olarak hidroksil radikalini giderme etkisi artmıştır. Sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamada elde edilen sonuçlar ile probiyotik uygulamada elde edilen sonuçlar birbirine yakın değerlerde bulunmuştur (Çizelge 4.13 ve Şekil 4.12). İnulinin kullanılan tüm konsantrasyonlarında giderim denenen tüm uygulamalardan az bulunmuştur. Pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asit 0,5-10 mg/mL konsantrasyonlarda hidroksil radikalini giderme aktivitesi %49,4-77,9 arasında değişmiştir (Çizelge 4.14).



Şekil 4.11. Probiyotik (JD2) ve postbiyotik (CFS_{JD2}) uygulamalarda hidroksil radikali süpürücü aktivite



Şekil 4.12. Prebiyotik, sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamalarda hidroksil radikal süpürücü aktivitesi

Prebiyotik, sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamalarında, artan EPS konsantrasyonlarıyla hidroksil radikalini giderim arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p < 0,05$). Konsantrasyon artışı ile hidroksil radikalini giderme etkisi arasındaki korelasyon regresyon analizi ile de belirlenmiştir. Çoklu R değerleri 0,75'ten büyük olduğu için güçlü ve pozitif bir korelasyon olduğu belirlenmiştir.

4.9.2. Antibiyofilm aktivite

Probiyotik (JD2), postbiyotik (CFS_{JD2}), farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 5, 10 mg/mL) prebiyotik (EPS_{JD2}), sinbiyotik (JD2+EPS_{JD2}), postbiyotik+prebiyotik (CFS_{JD2}+EPS_{JD2}) uygulamanın ve ticari prebiyotik inülinin, biyofilm oluşturma kabiliyetine sahip bakteriler (*Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeruginosa* 29212 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) üzerindeki antibiyofilm etkisi 96 kuyucuklu mikropate plakalarda kristal viyole boyama esasına göre değerlendirilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.15'te verilmiştir. Genel olarak sonuçlar değerlendirildiğinde, en yüksek antibiyofilm inhibisyonunun 10 mg/mL'lik CFS_{JD2}+EPS_{JD2} (postbiyotik+prebiyotik) (%84) uygulamasında *E. coli* ATCC 11229'a karşı, en düşük inhibisyonun ise *P. aeruginosa* 29212'ye karşı 0,5 mg/mL'lik prebiyotik (EPS_{JD2}) ve *S. aureus* ATCC 25923'e karşı postbiyotik (CFS_{JD2}) (%40) uygulamalarda olduğu belirlenmiştir. Tüm uygulamalarda, *P. aeruginosa* 29212'nin oluşturduğu biyofilmin giderim yüzdelерinin düşük olduğu tespit

edilmiştir. Kontrol olarak kullanılan ticari bir prebiyotik olan inulinde, %45-68 arasında değişen oranlarda *E. coli* ATCC 11229'un oluşturduğu biyofilmi inhibe ettiği belirlenmiştir (Çizelge 4.15).

P. kudriavzeii JD2 maya süspansiyonu (probiyotik) *E. coli* ATCC 11229'un oluşturduğu biyofilmi %77 oranında inhibe ederken postbiyotik (CFS_{JD2}) uygulama %58 oranında inhibe etmiştir (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.13). Farklı konsantrasyonlarda prebiyotik, sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamada ise EPS konsantrasyonunun artışına bağlı olarak *E. coli* ATCC 11229'un oluşturduğu biyofilmin inhibisyonu da artmıştır. Aynı zamanda biyofilm inhibisyonu sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamalarda, prebiyotik uygulamaya göre artış olmuştur (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.14). Ticari prebiyotik olan inulinde, %45-68 arasında değişen oranlarda *E. coli* ATCC 11229'un oluşturduğu biyofilmi inhibe ettiği belirlenmiştir (Çizelge 4.16). Farklı konsantrasyonlarda prebiyotik, sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamada, *Escherichia coli* ATCC 11229 tarafından oluşturulan biyofilmin artan inhibisyonu ile EPS konsantrasyonlarındaki artış arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p<0,05$). Prebiyotik, sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamalarında, artan EPS konsantrasyonu ile biyofilm inhibisyonu arasındaki korelasyon regresyon analizi ile belirlenmiş ve çoklu R değerleri 0,75'ten büyük olduğu için güçlü ve pozitif bir korelasyon tespit edilmiştir.

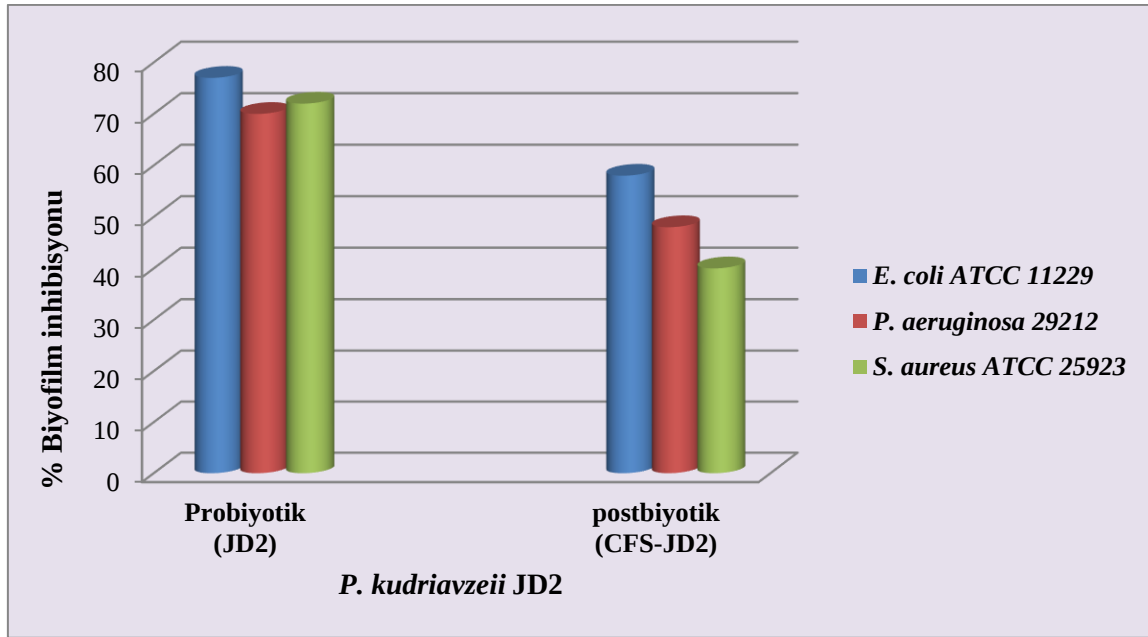
Çizelge 4.15. Probiyotik (JD2), postbiyotik (CFS_{JD2}) ve farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 5, 10 mg/mL) prebiyotik (EPS_{JD2}), sinbiyotik (JD2+EPS_{JD2}), postbiyotik+prebiyotik (CFS_{JD2}+EPS_{JD2}) uygulamanın biyofilm inhibisyonu (%)

Test Bakterisi	Probiyotik	Postbiyotik	Farklı konsantrasyonlarda prebiyotik (mg/mL)						Farklı konsantrasyonlarda sinbiyotik (mg/mL)						Farklı konsantrasyonlarda postbiyotik ve prebiyotik (mg/mL)					
	JD2	CFS _{JD2}	EPS _{JD2}				Multiple R value	Significant F	JD2+EPS _{JD2}				Multiple R value	Significant F	CFS _{JD2} +EPS _{JD2}				Multiple R value	Significant F
			0,5	1	5	10			0,5	1	5	10			0,5	1	5	10		
<i>E. coli</i> ^a	77±3 ^{b,c}	58±1 ^{b,c}	45±7	54±1	58±0	64±1	0,90	0,10	62±2	68±4	76±7	81±1	0,95	0,05	63±2	71±4	78±2	84±1	0,93	0,07
<i>P. aeruginosa</i> ^b	70±3 ^{a,c}	48±1 ^{a,c}	40±0	45±0	55±0	59±1	0,94	0,06	54±0	62±3	68±0	75±3	0,94	0,06	58±7	66±2	71±2	79±5	0,94	0,06
<i>S. aureus</i> ^c	72±1 ^{a,b}	40±1 ^{a,b}	42±4	50±3	53±2	59±1	0,90	0,10	58±4	63±4	72±0	77±0	0,96	0,04	63±0	70±1	76±7	80±2	0,91	0,09

a,b,c,d,e: ortalama fark 0,05 düzeyinde anlamlıdır

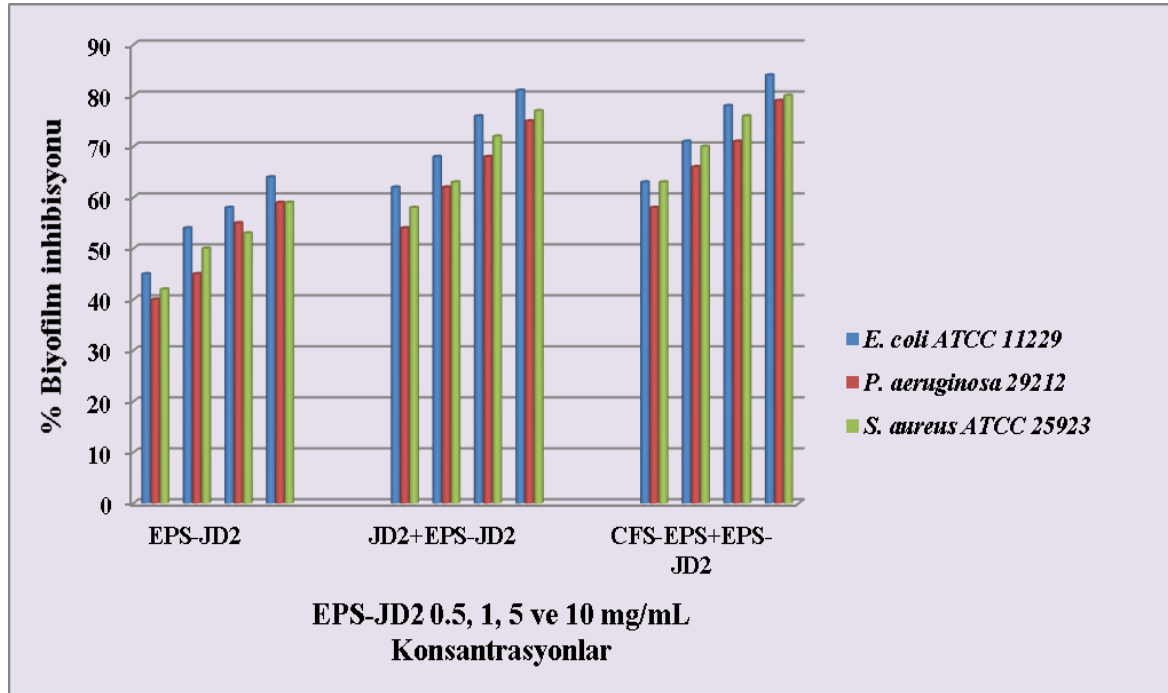
Çizelge 4.16. Farklı konsantrasyonlarda inülinin % biyofilm inhibisyonu

	% Biyofilm İnhibisyonu			
	İnülin Miktarı (mg/mL)			
Test Bakterisi	0,5	1	5	10
<i>E. coli</i> ATCC 11229	45±1	54±1	62±0	68±4
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 29212	40±1	41±0	54±1	62±0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	42±1	50±2	58±0	63±1

Şekil 4.13. Probiyotik ve postbiyotik (CFS_{JD2}) uygulamaların % biyofilm inhibisyonu

P. kudriavzeii JD2 maya süspansiyonu (probiyotik) *P. aeruginosa* 29212'nin oluşturduğu biyofilmi %70 inhibe ederken postbiyotik (CFS_{JD2}) uygulama %48 inhibe etmiştir (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.13). Farklı konsantrasyonlarda prebiyotik, sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamada ise EPS konsantrasyonunun artışına bağlı olarak *P. aeruginosa* 29212'nin oluşturduğu biyofilmin inhibisyonu da artmıştır. Aynı zamanda biyofilm inhibisyonu sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamada, prebiyotik uygulamaya göre artış olmuştur (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.14). Kontrol olarak kullanılan ticari prebiyotik olan inulinde, %40-62 arasında değişen oranlarda *P. aeruginosa* 29212'nin oluşturduğu biyofilmi inhibe ettiği belirlenmiştir (Çizelge 4.10). Farklı konsantrasyonlarda prebiyotik ve sinbiyotik uygulamalarda, *P. aeruginosa* 29212 tarafından oluşturulan biyofilmin artan inhibisyonu ile EPS konsantrasyonları arasında ilişkide istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p<0,05$). Prebiyotik, sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamalarında, artan EPS konsantrasyonu ile biyofilm

inhibisyonu arasındaki korelasyon regresyon analizi ile belirlenmiştir. Çoklu R değerleri 0,75'ten büyük olduğu için güçlü ve pozitif bir korelasyon tespit edilmiştir.



Şekil 4.14. Prebiyotik (EPSJD2), sinbiyotik (JD2+EPSJD2) ve postbiyotik (CFSJD2+EPSJD2) uygulamaların % biyofilm inhibisyonu *P. kudriavzeii* JD2, EPS_{JD2}'lerin, sinbiyotik ve (CFS_{JD2}+EPS_{JD2}) % biyofilm inhibisyonu

P. kudriavzeii JD2 maya süspansiyonu (probiyotik) *S. aureus* ATCC 25923'nin oluşturduğu biyofilmi %72 inhibe ederken postbiyotik (CFS_{JD2}) uygulamanın %40 inhibe ettiği görülmüştür (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.13). Farklı konsantrasyonlarda prebiyotik, sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamada ise EPS konsantrasyonunun artışına bağlı olarak *S. aureus* ATCC 25923'nin oluşturduğu biyofilmin inhibisyonu da artmıştır. Aynı zamanda biyofilm inhibisyonu sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamada, prebiyotik uygulamaya göre artış olmuştur (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.14). Kontrol olarak kullanılan ticari prebiyotik olan inulinde, %42-63 arasında değişen oranlarda *S. aureus* ATCC 25923'nin oluşturduğu biyofilmi inhibe ettiği belirlenmiştir (Çizelge 4.10). Farklı konsantrasyonlarda prebiyotik ve sinbiyotik uygulamalarda, *S. aureus* ATCC 25923 tarafından oluşturulan biyofilmin inhibisyonu ile EPS konsantrasyonları arasındaki ilişkide istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p < 0,05$). Prebiyotik, sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamalarında, artan EPS konsantrasyonu ile artan biyofilm inhibisyonu arasındaki korelasyon regresyon analizi ile belirlenmiş ve çoklu R değerleri 0,75'ten büyük olduğu için güçlü ve pozitif bir korelasyon tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Probiyotikler “yeterli miktarlarda uygulandığında konakçıya sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalar” (Hill ve diğerleri, 2014), prebiyotik ise “sağlık yararı sağlayan konakçı mikroorganizmalar tarafından seçici olarak kullanılan bir substrat” (Gibson ve diğerleri, 2017) olarak ifade edilmektedirler. Başlangıçta hem probiyotiklerin hem de prebiyotiklerin bir kombinasyonu olarak düşünülen sinbiyotik, şimdi “konakçıya sağlık yararı sağlayan konakçı mikroorganizmalar tarafından seçici olarak kullanılan canlı mikroorganizmalar ve substrat(lar)dan oluşan bir karışım” olarak tanımlanmaktadır (Swanson vd., 2020). Postbiyotik, “konakçıya sağlık yararı sağlayan cansız mikroorganizmaların ve/veya bileşenleri” olarak tanımlanmaktadır. Postbiyotikler, tanımlanmış mikroorganizmalar kullanılarak yapılan fermente ürünlerden elde edilebilir (Salminen ve diğerleri, 2021). Mevcut birçok postbiyotik, *Lactobacillaceae* familyasının bazı cinsleri (şu anda 31 cins içerir) veya *Bifidobacterium* cinsi içinde yerleşik probiyotik taksonlara ait cansız suşları içermektedir (Andresen ve diğerleri, 2020). Bununla birlikte, bir mikrobiyal suş veya konsorsiyumun, inaktive edilmiş versiyonun postbiyotik olarak kabul edilebilmesi için (yaşarken) probiyotik olarak nitelendirilmesi gerekmediği ifade edilmektedir. *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides xylanisolvens*, *Bacteroides uniformis*, *Eubacterium hallii*, *Clostridium cluster IV* ve *XIVa*, *Apilactobacillus kunkeei* ve *Saccharomyces boulardii* mantarının spesifik suşlarının tümü, postbiyotik tanımının potansiyel faydalı etkileri için araştırılmıştır ve bir sağlık yararı gösterilmiştir (Aguilar-Toala ve diğerleri, 2019).

Mayalar, fermente gıdaların üretiminde metabolizmanın bir sonucu olarak birçok önemli fonksiyonel aktivite göstermektedirler (Soccol ve diğerleri, 2010). *P. kudriavzevii* probiyotikleri, birçok patojenik mikroorganizmayı öldürebilen toksinler üretme yeteneğine sahiptir. Bu nedenle gıda muhafazasına, bağışıklık sistemi modülasyonuna, antioksidan, antitümör, anti-ülser veya kolesterol düşürmeye katkıda bulunmaktadır (Castro-Bravo ve diğerleri, 2018).

S. cerevisiae var *boulardii*, bugüne kadar insan kullanımı için ticarileştirilmiş tek maya (Suez ve diğerleri, 2018) olduğundan probiyotik olarak kullanım potansiyeli olabilecek mayaların araştırılması önemlidir. Bu amaçla bu tez çalışmasında, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji ve Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu’nda bulunan hurmadan izole edilen ve 18S rRNA dizi analizi ile moleküler tanımlamaları yapılan

Pichia kudriavzevii JD2 (probiyotik) maya suşunun bazı probiyotik özellikleri (antikolesterol aktivite, yapay mide ve bağırsak sıvılarında canlılıkları ve hidrofobosite) ve bu suştan elde edilen, postbiyotik (CFS_{JD2}), prebiyotik (EPS_{JD2}), sinbiyotik (JD2+EPS_{JD2}) ve postbiyotik+prebiyotik (CFS_{JD2}+EPS_{JD2}) uygulamanın bazı biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Kolesterol son derece önemli bir biyolojik amfipatik moleküldür, vücutta bir takım önemli fonksiyonlara sahiptir. Tüm hücre zarlarının bileşeninde bulunur ve hücre zarının akışkanlığını düzenler (Ohvo-Rekilä vd., 2002). Özel dokularda kolesterol, safra asitlerinin, steroid hormonlarının ve D vitamininin öncüsüdür (Harvey ve Ferrier, 2011). Koroner arterlerde kolesterolün anormal birikmesi ateroskleroza yol açar ve koroner arter hastalıklarına katkıda bulunan önde gelen faktördür. Uluslararası ateroskleroz topluluğu (IAS), düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterolü düşürmek için bir strateji olarak diyet kolesterolünün düşürülmesini önermektedir (Berger vd., 2015). Serum LDL yaygın kolesterolünün düşürülmesi tedavinin birincil hedefidir. Kalp hastalığını ve ateroskleroza önlemek için çeşitli tedavi biçimleri bildirilmiştir. Bilinen en yaygın tedavi hipolipidemik ilaçlardır. Bununla birlikte, bu tedavi şekli ile ilişkili yan etkiler insan sağlığı için daha büyük bir tehdit oluşturmaktadır (Liang ve diğerleri, 2012). Serum kolesterol düzeylerini düşürmek için yeni alternatif yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla, kolesterolü düşürmeye yönelik yeni bir yaklaşım, bağırsaktaki veya metabolik ürünlerdeki mikrobiyal ekosistemi modüle eden probiyotiklere ve prebiyotiklere dayalı fonksiyonel veya sağlıklı gıdaların kullanılmasıdır (Wu, 2015; Afreen vd., 2023). Yapılan araştırmalar, probiyotikler için mikrobiyal toplulukların mayaların bazı ilginç özelliklerini ortaya çıkardığını ve probiyotik mayalarla hazırlanan fonksiyonel gıdaların, yüksek kolesterolü diyetle beslenen sıçanların serumundaki lipid seviyelerini azalttığını bildirmiştir (Ogunremi vd., 2015). Gıda ve hayvan kaynaklı maya hücrelerinin, tek mideli hayvanların mide-bağırsak yollarını taklit eden simüle edilmiş koşullar altında, ortamdaki kolesterolü de uzaklaştırdığı bildirilmektedir (Chen vd., 2010).

Bu tez çalışmasında, *P. kudriavzevii* JD2 suşunun yüksek kolesterol presipitasyonuna ve kolesterol giderim oranına (sırasıyla, 38,2 µg/mL ve %62) sahip olduğu bulunmuştur. Bir çalışmada, ham sütte izole edilen 2 *P. kudriavzevii* BY10 ve BY15 suşu ile 1 *S. cerevisiae* var *boulardi* CICC1850 suşun kolesterol assimilasyonları YPD sıvı besi ortamında 37°C'de 72 saat inkübe edilerek araştırılmıştır. Suşların kolesterol giderimleri sırası ile: %43,2, %44,4 ve %41,5 olarak tespit edilmiştir (Chen ve diğerleri, 2010b). Psomas ve diğerleri

(2003) bebek dışkısı ve beyaz peynirden izole edilen sekiz maya türünün kolesterol asimilasyonunu inceledikleri bir araştırmalarında *S. cerevisiae* var *boulardii*'nin %93,2, *S. cerevisiae* KK1'in %95,7, *S. cerevisiae* 832'nin %91,7, *Isaatchenkia orientalis* KK5.Y.1'in %93,6, *C. albicans* KK2.1'in %5,4, *C. parapsilosis* KK6.P'nin %4,5, *K. marxianus* 630'un %2,7, *K. lactis* 570'in %4 ve *Pichia farinosa* 441'in %7,9 kolesterolü asimile ettiklerini bildirmişlerdir. Kurelis vd., (2010), beyaz peynir veya bebeklerin gastrointestinal sisteminden izole edilen maya suşlarının *in vitro* kolesterol asimilasyon özelliklerini değerlendirmişlerdir. İncelenen maya suşları arasında bir varyasyon ortaya çıkarılmış ve kolesterol uzaklaştırma yüzdesinin 4 (*S. cerevisiae* 832) ile 60 (*S. cerevisiae* 952) arasında değiştiğini rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda *P. kudriavzevii* JD2 suşu en yüksek kolesterol giderimini %62 ile safra içermeyen ortamda gerçekleştirirken bu ortamın pH değeri 6,46 olarak belirlenmiştir. En düşük kolesterol giderimi ise %51 ile %0,6 safra tuzu içeren ortamda tespit edilmiş ve bu ortamdaki pH değeri 6,58 olarak bulunmuştur. Çalışmamızın sonuçları ile Maiheubai, (2017)'nin farklı peynir türlerinden ekstrakte edilen sekiz *P. kudriavzeii* suşunun serbest hücre özündeki (SHE) ekstraktındaki kolesterol giderme oranının bulunduğu çalışmasının sonuçları benzerlik göstermektedir. *K. marxianus* M3 suşunun TC, TG ve LDL-C serum lipidlerinde kolesterol gideriminin üzerine yapılan başka bir çalışmada, suşun üç tip serum lipidlerinde kolesterol asimilasyonlarını sırası ile (%44,33, %37,21 ve %60,12) olarak tespit edilmiştir (Xie ve diğerleri, 2015). Ancak çalışmamızdaki sonuçlarımızla diğer araştırmaların sonuçları arasında farklılıklar görülmektedir. *P. kudriavzevii* Y33 mayasının, ox bile ve taurokolat içeren ortamda sırasıyla %88,58 ve %86,83'te yüksek kolesterol asimilasyonu gösterebildiği gözlemlenmiştir (Lata ve diğerleri, 2022). Bir araştırmada, EPS üreten probiyotik maya *Lipomyces starkeyi* VIT-MN03'ün kolesterol giderimi farklı zaman dilimlerinde (4, 8, 12, 24 saat) incelenmiş ve en yüksek giderimin 12. saatte (%90) olduğu bildirilmiştir (Ragavan ve Das, 2019). Başka bir *in vitro* çalışma, farklı kaynaklardan izole edilen 20 maya suşunun kolesterol giderme oranında %92'ye kadar arttığını göstermiştir (Ragavan, 2017). Birçok çalışma, canlı organizmaların kolesterolü uzaklaştırma yeteneğinin suşa, türe ve cinsiyete göre değiştiğini, ayrıca aynı suş içinde farklılık olduğunu ve bunun metabolik bileşenlerine ve kolesterolü emme yeteneğine bağlı olduğu bildirilmiştir (Tomaro-Duchesneau, vd., 2014; Castorena-Alba, vd., 2018; Kathade, vd., 2020 ve Fossi, vd., 2022).

Tez çalışmasında ayrıca, prebiyotik ilavesinin kolesterol giderimine etkisi belirlenmiş ve bu amaçla safra tuzlu ve kolesterolü ortama 10 mg/mL EPS_{JD2} ilave edilerek kolesterol presipitasyonu ve giderimi miktarları belirlenmiştir (%52-65). Çetin (2021) çalışmasında, geleneksel Türk beyaz peynirinden izole ettiği 4 *Enterococcus faecium* ve 6 *E. faecalis* suşunun kolesterol giderim yüzdeleri belirlenmiştir. Farklı safra konsantrasyonları içeren besin ortamlarında, en yüksek kolesterol giderim yüzdesi safrasız besin ortamlarında *E. faecium* RT94 suşunda %50 olarak belirlenmiş ve suşların EPS üretimlerinin çökelme aktiviteleri ile doğru orantılı olarak arttığını bildirmiştir. Afreen ve grubu (2023) tarafından yapılan bir araştırma, süpernatandaki kolesterol konsantrasyonunun *Lactiplantibacillus paraplantarum* NCCP 962'ye EPS eklenmesiyle %46,4'e kadar kolesterol miktarının azaldığını göstermiştir. Benzer şekilde, *Lactobacillus plantarum* BR2 (Sasikumar ve ark. 2017), LAB suşu NBHK006 (Tsai ve ark. 2014) ve *L. plantarum* RJF4'te sırasıyla %47,5, %45 ve %42,24'lük bir kolesterol düşürme yeteneği bildirilmiştir. Bu potansiyele sahip EPS'nin gıda ürünlerinin geliştirilmesine eklenmesi, kan kolesterol seviyelerinin bir dereceye kadar düşürülmesine yardımcı olabilir. Önceki araştırmalar ayrıca, doğası gereği asidik olan polisakkaritlerin, nötr polisakkaritlere kıyasla kolesterolü daha etkili bir şekilde azaltabildiğini göstermiştir. Ayrıca nötr bir polimer olarak dekstran bazlı EPS'de kolesterolü uzaklaştırmıştır. Bununla birlikte, kolesterolü düşürmenin kesin mekanizması hala tam değildir. Ancak araştırmalar, *Sreptococcus thermophilis* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* serbest safra asitleri ile birleşebildiği ve bu da sindirimden sonra artan kolesterol atılımına neden olduğu göstermiştir. Buna karşılık, karaciğerden kolesterol tarafından yeni safra asitleri sentezlenmektedir ve böylece dolaşımdaki kolesterol seviyesi azalmaktadır (Dilna ve ark. 2015). Bu nedenle, EPS'yi gıdalara dahil etmek, artan kan kolesterol seviyesini bir dereceye kadar azaltmaya yardımcı olabilir.

Mikrobiyota toplulukları, insan fizyolojisinin korunmasında rol oynamaktadır. İnsan gastrointestinal sisteminin (GUT) yaklaşık 500-1000 mikrobiyal türden oluşan çok çeşitli bir mikrobiyotadan oluştuğu tahmin edilmektedir (Collado vd., 2009). Probiyotikler, bağırsak mikrobiyotasının bileşimini modüle edebilir ve patojenik bakterilerin büyümesini önleyebilirler (de Almada vd., 2015). Herhangi bir mikroorganizma probiyotik olarak olası bir aday olabileceği için probiyotikler için olası kaynaklar, bağırsaklardır. Mikroorganizmaların hepsi ya tek başına ya da sinerji içinde ortama katkıda bulunmaktadır (Suárez-Zamorano, vd, 2015). Mikroorganizmanın konak organizmada yaşayabilmesi için yüksek vücut ısısı, gastrointestinal kanaldan geçerken pH'daki değişiklikler, mide suyuna maruz kalma, enzimler, oksijen basıncı, safra ve pankreas

tuzları gibi belirli kriterleri aşması gerekir. Ek olarak, mikroorganizmanın daha büyük bir adaptasyonunu gerektiren doğal mikrobiyota ile rekabet vardır (Gil-Rodríguez vd., 2015).

Hâlihazırda pazarlanan probiyotiklerin çoğu bakteri kökenli olmasına rağmen, mayaların probiyotik olarak kullanılması, antibakteriyellerin etkisine karşı bağışık olan organizmalar olmaları ve bağırsak mikrobiyotasının bir parçası olarak önemli bir rol oynayabilmeleri nedeniyle oldukça avantajlıdır (Lucena vd., 2020; Sadeghi vd, 2022). Düşük pH altında mayanın hayatta kalması için birincil mekanizma, maya hücre duvarının modifikasyonudur (Lucena vd, 2020). Düşük pH'a ayarlanan gastrula ve maya hücrelerinde hidroklorik asit gibi güçlü inorganik asitler, hücre duvarı bütünlük yolunu aktive eden bir mekanizma oluştururlar (De Lucena vd, 2015). Fletcher ve diğerleri (2017), asit direnci pH 2,8'e yükselen *S. cerevisiae* örneğinde olduğu gibi, asit toleransının sterol bileşimini değiştirerek ve demir emilimini azaltarak elde edilebileceğini göstermiştir.

Mayaların probiyotik olarak kullanılabilirliklerini ön plana çıkarmak amacıyla bu tez çalışmasında, *P. kudriavzevii* JD2'nin pH 2, 3 ve 4 de hazırlanan yapay mide sıvısında 60. ve 180. dakikalardaki canlılıkları belirlenmiştir. Çalışmamızda, inkübasyondan 60 ve 180 dakika sonra en yüksek canlı hücre sayısı, midenin pH'sına en yakın olan pH 3,0'te (sırasıyla 5,82 log kob/mL ve 5,48 log kob/mL) tespit edilmiştir. Ayrıca *P. kudriavzevii* JD2 suşunun canlılıkları pH 4 ve pH 6,2'de pH 2 ve pH 3'e göre daha yüksek bulunmuştur. Suşun, mide pH'ına en yakın olan pH 3'de yüksek direnç göstermesi potansiyel probiyotik aday olabileceğini göstermiştir. Çalışmamıza benzer şekilde Lata ve diğerleri (2022), *P. kudriavzevii* Y33 mayasının pH 2'de yüksek asit toleransına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Yıldırım ve diğerleri (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, meyve ve sebzelerden, tavuk pisliklerinden ve süt ürünlerinden ve 10 ticari mayadan 134 maya izole edilmiştir. *Saccharomyces cerevisiae* olarak ve normal izolatlar *Candida corpophila*, *Candida diddensiae*, *Clavispora lusitaniae*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kazachstania bovina*, *Kluyveromyces marxianowia*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia* sp., *Meyerozyma carribbica*, *Pichia kluyveri* ve *Wickerhamomyces anomalus* türlerine ait izolatların pH 2,5'ta 2 saat mide suyuna dirençli olduğu görülmüştür. Kathadi ve diğerleri (2020), tarafından yapılan bir çalışmada, tatlı su salyangozunun (*Pila globosa*) bağırsağından izole edilen *Pichia kudriavzevii* S-I adlı bir maya kültürünün probiyotik özellikleri araştırılmıştır. *P. kudriavzevii* S-I suşu mide ortamına 90 ve 180 dakika maruz kaldığında sırasıyla %73,57 ve %36,24 ve 240 dakika bağırsak ortamında inkübasyondan sonra %53 oranında hayatta kaldığı belirlenmiştir. Bir çalışmada, *S.*

boulardii suşunun mide sıvısına karşı güçlü direnç sergilediği ve sindirimin sonunda *S. boulardii*'nin %80 oranında canlı kaldığı bildirilmiştir (Hossain ve diğerleri, 2020). Farklı kaynaklardan 20 mayanın izole edildiği bir çalışmada, mide suları ile muamele edilen isolatların %60'ın üzerinde canlılık gösterdiği bildirilmiştir (Ragavan, 2017). Scevola ve diğerleri (2003), sağlıklı gönüllülerle *Saccharomyces cerevisiae* suşunun oral uygulanmasından sonra *in vitro* asit toleransını ve *in vivo* fekal iyileşmeyi değerlendirmişlerdir. En düşük pH değerinde (pH 1) tabletlerdeki maya yükü azalmış ve pH 12den pH 7'ye tampon çözeltilerinde *S. cerevisiae* sayısı artmıştır. Seçilen maya suşu, mide ortamını taklit eden düşük pH'a iyi tolerans göstermiştir. Günde 100 milyon hücre dozunda bir aylık tedaviden sonra, tedavi edilen 16 sağlıklı gönüllünün 6'sının (%37,5) dışkısında *S. cerevisiae* gelişme göstermiştir. Deneylerin sonuçlarına dayanarak, incelenen maya, insan mide-bağırsak sistemininkiyle karşılaştırılabilir olumsuz koşulları tolere eden ve ağızdan verildiğinde sağlıklı gönüllülerin bağırsaklarını kolonize edebilen ve hatta yerleşik *Candida* türlerinin yerini alabilen bir suş olarak kabul edilmiştir. Çalışmamız araştırmalar ile benzerlik göstermektedir.

Lactobacillus, *Bifidobacterium* ve *Saccharomyces* spp. gibi bilinen probiyotiklerin bağırsak sıvısına iyi tolerans gösterdikleri bildirilmiştir (Gupta ve Sharma, 2017). İnsan bağırsak ortamındaki optimal safra konsantrasyonu %0,3 ila %0,6 arasında değiştiği için (Helmi ve diğerleri, 2019) tez çalışmasında %0,06-0,30 oranlarında safra tuzu içeren yapay bağırsak sıvısında *P. kudriavzevii* JD2 maya suşunun farklı sürelerde (1 ve 240 dk) canlı hücre sayıları ve yüzde canlılıkları belirlenmiştir. Suş, en yüksek canlı hücre sayısına %0,06 safra içeren ortamda 1. dakikada 5,37 logkob/mL (%90,25 canlılık) ve 240. dakikada ise 4,81 (%80,84 canlılık) ile ulaşmıştır. %0,06 safra konsantrasyonu, *P. kudriavzeii* JD2 suşunun büyümesini uyarmıştır. Ancak, *P. kudriavzeii* JD2 suşunun canlılığı artan safra konsantrasyonları ve zamana bağlı olarak azalmıştır. Bunun nedeninin safra tuzlarının deterjan özelliklerine sahip olmasından dolayı GİS mikrobiyotası için toksik olmasından (Urdaneta ve Casadesús, 2017) kaynaklanmış olabilir. Ancak bazı *Lactobacillus* spp. ve *Saccharomyces* spp. safra tuzlarına ve hidrolitik enzimlere direnç gösterebileceği de bildirilmiştir (Merchán ve diğerleri, 2020). Lata ve diğerleri (2022), yüksek safra konsantrasyonuna (%2) dayanabildiğini ve %95 gibi yüksek canlılık gösterdiğini rapor etmişlerdir. Bir çalışmada, 5 *P. kudriavzeii* suşunun (M15, M16, M17, M56, M57) canlılığı, pH 1,5 (%67,1-95,7), pH 2 (%78-99,3) ve pH 3'te (%92,5-99,1) suni mide sıvısında 90 dakikalık inkübasyondan sonra belirlenmiştir. Maya suşlarının pH 8 ve farklı safra koşullarında (%0,3 ve %0,5) suni bağırsak sıvısında 240 dakikada (sırasıyla,

%88,9-74,5 ve %75,6-97,9) hayatta kalma oranı tespit edilmiştir (Maihebubai, 2017). Greppi ve diğerleri (2017) yaptıkları bir çalışmada, 8 *P. kudriavzeii* suşların yapay mide ve ince bağırsak stres koşullarında canlılıklarını araştırmışlardır. Yapay mide ve ince bağırsak koşullarında suşların canlılıklarının sırası ile: %8-40,1 ve %11,4-45,1 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Bir çalışmada, peynirden izole edilen 3 *K. marxianus* suşları ile 1 *S. cerevisiae* var *boulardi* suşun yapay mide ve ince bağırsak koşullarına karşı toleranslılıkları araştırılmıştır. Araştırmacılar, *K. marxianus* suşlarının yapay mide ve ince bağırsak koşullarında canlılıklarının yüksek olduğu ve bu koşulları iyi bir şekilde tolere edebildiğini bildirmişlerdir. *S. cerevisiae* var *boulardi* suşunun, *K. marxianus* suşlarına kıyasla toleransının daha az olduğunu açıklamışlardır (Fedda ve diğerleri, 2017). Bu tez çalışmasında, *P. kudriavzeii* JD2 maya türünün probiyotik destekleyici özelliklere sahip olduğu gözlemlenmiş ve bu nedenle fermente ve fonksiyonel gıdaların üretiminde kullanılması düşünülebilir.

Hücre yüzeyi hidrofobikliği (CSH), bir hücrenin hidrofobik ortama karşı hidrofilik ortama afinitesinin biyofiziksel bir ölçümüdür. Daha yüksek CSH olan hücreler hidrofobik bir ortamı tercih ederken, daha düşük CSH olan hücreler tercihen sulu bir ortamda kalacaktır (Krasowska ve Sigler, 2014). Bu özellik mantar virülansını ve biyofilm oluşumunu etkileyebilir (Dabiri ve diğerleri, 2018) ve çok sayıda mantar önleyici ilaç tarafından hedeflenmektedir (Suchodolski ve diğerleri, 2020). Probiyotik mayaların hidrofobiklik özelliklerine ilişkin bilgi ve araştırmalar sınırlıdır. Mikroorganizmaların çoğunda hidrofobikliğin, yüzey aktif madde bileşiklerinin hücre duvarında bulunan proteinlerden ve lipidlerden kaynaklandığı bildirilmiştir. Bu bileşikler ve mikroorganizmalar birbirlerine, epitele, dokulara ve bazı maddelere yapışır (Zárate vd., 2002). Bu tez çalışmasında *P. kudriavzeii* JD2 suşunun hidrofobikliği, nötral çözücü olan toluen, asidik çözücü olan hekzon ve bazik çözücü olan aseton hidrokarbonlarına karşı belirlenmiş ve sırasıyla %79, %85 ve %73 hidrofobisite gösterdiği tespit edilmiştir. Genel olarak hidrofobisite sonuçlarını değerlendirdiğimizde, suşun asidik çözücü olan hekson ilgisinin, nötral çözücü olan toluen ve bazik çözücü olan aseton göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. *P. kudriavzeii* JD2'nin test edilen hidrokarbonlara yüksek düzeyde ilgisinin olması ve bu suşun yüzey yapılarının kompleks olduğunu göstermektedir. Akef (2018), *P. kudriavzeii* JD2 maya suşunun p-ksilen (%74,25), kloroform (%83,32) ve etil asetat (%56,43) ile hidrofobikliğini bulmuştur. Başka bir çalışmada sekiz *P. kudriavzeii* suşunun hidrofobik değerleri p-ksilen (%54,9-%93,42), kloroform (%97,57-%99,08) ve etil asetat (%76,8-%96,77) ile bulunmuştur (Maihebubai, 2017). Maya suşu *Pichia* sp. DU2, p-ksilene

hidrofobikliğinin %43,3 olduğu gösterilmiştir (Salimi ve Imanparast, 2022). Chelliah vd., (2016), *P. kudriavzeii* URC579 suşunun ksilen ve toluen hidrokarbonlara adsorpsiyon oranlarını sırasıyla %59 ve %75 olarak bildirmişlerdir. Binetti ve diğerleri (2013), yaptıkları bir araştırmada 8 *K. marxianus* suşun hidrokarbonlara tutunma yeteneklerini %45,3-72,5 arasında bulmuşlardır. Fedda ve diğerleri (2017), yaptıkları bir araştırmada, 3 *K. marxianus* suşun n-heksadekan'a tutunma yeteneklerinin %54,7, %59,1 ve %75,9 oranlarında olduğunu göstermişlerdir. Ayama vd., (2014) üç maya izolatının (*S. cerevisiae* gbLKX237673, *Wickerhamomyces anomalus* HN1, *P. kudriavzeii* QLB) kloroforma hidrofobisitenin yüksek, ardından etil asetat ve son olarak da ksilene hidrofobisitenin olduğunu rapor etmişlerdir. Mikroorganizmalarda hidrofobiklik cins, tür ve suşlara ve kullanılan hidrokarbona göre farklılık göstermektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ile diğer araştırmacıların sonuçları kullanılan hidrokarbona ve mikroorganizmaya göre değişiklik göstermiştir. Bu farklılığın mikroorganizma ve hücre yüzeyi proteinlerinin fizyolojik durumundan (Nwanyanwu ve ark., 2012) kaynaklanmış olabileceğini düşünüyoruz.

Ekzopolisakkarit (EPS), mikrobiyal hücre duvarındaki polisakkaritlerdir. Probiyotik ve starter özellikli mayaların EPS üretimi önemlidir. Maya tarafından üretilen EPS'lerin, fermente ürünlerin viskozitesini ve kıvamını arttırırken, hücreleri fiziksel ve kimyasal faktörlere karşı koruduğu açıklanmıştır. Mayaların ürettiği EPS'lerin sağlık alanında antitümör, antikanser ve antikolesterol etkileri olduğu da gösterilmiştir (Ghada ve diğerleri, 2012). Çalışmamızda, *P. kudriavzeii* JD2 maya suşunun kültür ortamındaki EPS miktarı 192 mg/L ve liyofilizasyondan sonraki toplam karbohidrat miktarı 246 mg/L olarak belirlenmiştir. *Bullera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaromyces*, *Lipomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Pseudotorula*, *Sporobolomyces* cinslerine dahil olan maya türlerinin EPS ürettiğini bildirmiştir (Gientka ve diğerleri, 2015). Farklı maya cins ve türlerinin farklı miktarlarda EPS ürettiğini ve EPS üretiminin farklı faktörlerden etkilenebileceği bildirilmiştir (Ramirez vd., 2015). Mayaların gelişme ortamına sakaroz veya glikoz gibi karbonhidratlar eklendiğinde, bazı maya suşlarının sırasıyla 5 g/L veya 3 g/L EPS ürettiği rapor edilmiştir (Gientka ve diğerleri, 2015). Ekzopolisakkarit biyosentezi için Antarktika maya suşları araştırılmış ve *Sporobolomyces salmonicolor* AL1 suşu seçilerek farklı karbon ve nitrojen kaynaklarının ekzopolisakkarit biyosentezi üzerindeki etkisinin belirlendiği bir çalışmada; %5 sükröz ve %0,25 amonyum sülfat içeren kültür ortamında 22°C sıcaklıkta 120 saat süreyle polisakkarit veriminin 5,63 g/L'ye ulaştığı ifade edilmiştir (Pavlova ve diğerleri, 2004). Bir çalışmada, probiyotik maya *Lipomyces starkeyi* VIT-

MN03'ten ekzopolisakkaritlerin (EPS) üretimi için kültür koşulları, EPS verimini maksimize etmek için yanıt yüzey metodolojisi (RSM) kullanılarak optimize edilmiş, optimum koşullar altında *L. starkeyi* VIT-MN03 tarafından EPS üretiminde altı kat artış (4,87 g/L) gözlenmiştir (Ragavan and Das, 2019). Yildirim ve diğerleri (2019), ticari *S. cerevisiae* ve doğal izolatlardan (*Candida corpophila*, *Candida diddensiae*, *Clavispora lusitaniae*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kazachstania bovina*, *Kluyveromyces marxynowia*, *Pichia kluyveri* ve *Wickerhamomyces anomal*) ekzopolisakkarit (EPS) üretiminin 24,9-275,22 mg/L arasında değiştiğini ifade etmişlerdir. Başka bir çalışmada ise farklı peynir örneklerinden izole edilen sekiz *P. kudriavzevii* suşu ve 10 *K. marxianus* suşunda EPS üretimi araştırılmıştır. *P. kudriavzevii* suşlarının EPS üretimi 92,4 ile 254,02 mg/L arasında, *K. marxianus* suşlarının EPS üretimi ise 55,3 ile 190,6 mg/L arasında bulunmuştur (Abdurelimu, 2017). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ile diğer araştırmacıların sonuçları kullanılan karbon/azot kaynaklarına ve mikroorganizmaya göre değişiklik göstermiştir. Mayalarda ekzopolisakkarit üretim miktarlarındaki farklılığın maya izolasyon kaynağı, ortamın bileşimi (karbon ve nitrojen kaynakları) ve inkübasyon koşulları (sıcaklık, pH, süre, oksijen oranı vb.) gibi faktörlerin değişmesi ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

EPS'nin faydalı etkileri, monosakkaritin bileşimine, bağların tipine, dallanma derecesine ve moleküler ağırlığa bağlı olarak değişmektedir (Iliev ve diğerleri, 2006). EPS moleküllerinin yapısal özellikleri, EPS'nin biyolojik aktivitelerini ve teknolojik uygulamalarını belirlemede önemli faktörler olduğundan, yeni EPS'nin kimyasal bileşiminin ve yapısının aydınlatılması, potansiyel uygulamaların tahmin edilmesi açısından büyük önem taşımaktadır (Li ve ark., 2015). Bu nedenlerle, çalışmamızda *P. kudriavzevii* JD2 suşundan elde edilen EPS_{JD2}'nin yapısal özelliklerini ortaya çıkarmak için EPS_{JD2}'nin monomer bileşimleri (HPLC analizi ile) ve moleküler ağırlıkları (SEC analizi ile) belirlenmiştir. Ayrıca *P. kudriavzevii* JD2 suşundan elde edilen EPS_{JD2} bağ yapısı da NMR analizi ile ortaya koyulmuştur.

EPS'nin mayalar arasındaki yapısal çeşitliliği, molekülün detaylı yapısal incelenmesi için gerekli bir durumdur. Moleküler karakterizasyonda yapılması gereken ilk çalışma molekülün monomer kompozisyonunun belirlenmesidir. EPS molekülünün monomer kompozisyonundaki farklılıklar molekülün biyolojik aktiviteleri açısından çok önemlidir. EPS'lerin monomer yapısını belirlemede, bir karışımdaki her bir bileşeni ayırmak, tanımlamak ve ölçmek için kullanılan analitik kimyada bir teknik olan (Seveiri vd, 2020)

yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılmıştır. Çalışmamızda HPLC analizi ile monomer yapısı değerlendirildiğinde EPS_{JD2}'nin, yapısında glukoz monomeri olduğu ve miktarının ise 1,7 mg/mL olduğu bulunmuştur. Seveiri ve arkadaşları (2020), *Rhodospiridium babjevae* EPS'sinin ana monosakkaritinin %84 oranında mannoz olduğu bulunmuştur. Grigorova ve diğerleri (1999), *Rhodotorula acheniorum* MC tarafından üretilen EPS'nin monosakkarit bileşiminin sırasıyla %92,8 ve %7,2 oranlarında mannoz ve glukoz olduğunu bulmuşlardır. Cho ve arkadaşlarına (2001) göre, *Rhodotorula glutinis* KCTC 7989 tarafından üretilen EPS, 6,7:0,2:0,1:0,1 oranlarında (mannoz, fukoz, glikoz ve galaktoz) dört monosakkaritten oluşmaktadır. Bir çalışmada *Lipomyces starkeyi* VIT-MN03'ün EPS'si arabinoz, riboz, galaktoz, glikoz, ksiloz, rhamnoz ve mannoz içeren heteropolisakkarit yapıda olarak karakterize edilmiştir (Ragavan ve Das, 2019). *Rhodotorula glutinis* tarafından üretilen EPS'nin L-fukoz ve D-galaktozdan oluştuğu gösterilmiştir (Singh ve ark. 2012). Bir çalışmada, California Körfezi'nden izole edilen *Micromonospora* sp.'den ekstrakte edilen EPS'de ksiloz, arabinoz, mannoz ve melipioz gibi şekerlerin ve naystoz gibi oligosakkaritlerin varlığı ortaya çıkarılmıştır (Ledezma ve diğerleri, 2016). *S. cerevisiae*'nin hidrolize edilmiş EPS'nin monosakkarit bileşiminin arabinoz, riboz, galaktoz, glikoz, ksiloz, rhamanoz, mannoz, glukuronik asit, galakturonik asit olduğu rapor edilmiştir (Mubarak and Amer, 2013). Oleńska ve diğerleri (2021) tarafından yapılan başka bir çalışmada, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak kök nodüllerinden ekstrakte edilen *R. leguminosarum* bv *trifolii*'nin bir EPS örneğinde yirmi üç monosakkarit tanımlanmıştır. Pavlova ve diğerleri (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, *Cryptococcus flavus* AL51 tarafından üretilen EPS'nin, mannoz, glukoz, ksiloz ve galaktozdan oluşan ve 55,1:26,1:9,6:1,9 oranlarında nötr bir polisakkarit olduğunu gösterilmiştir. Breierová ve diğerleri, (2005), *Cryptococcus laurentii* CCY 17-3-16 tarafından üretilen EPS'lerin mannoz açısından zengin olduğunu ve farklı moleküler ağırlık dağılımına sahip üç fraksiyona sahip olduğunu göstermişlerdir. Sonuçlarımız, *P. kudriavzevii* JD2 suşu tarafından üretilen EPS'nin glikoz açısından zengin homopolisakkarit yapıda olduğunu göstermiştir. Tez kapsamında yapılan *in vitro* çalışmalarda, biyolojik aktivite sonuçlarının yüksek çıkmasının nedeninin EPS_{JD2}'nin homopolisakkarit yapıda olmasından kaynaklı olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Ancak, nadir şekerler (ramnoz ve fukoz gibi) içeren EPS'lerin, yaygın polisakkaritler içeren EPS'lere kıyasla daha gelişmiş biyolojik özelliklere sahip olabileceği de bildirilmektedir (Rani ve diğerleri, 2018). Bu durumu netleştirebilmek için bu konuda daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç vardır.

Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopisi, indirgeyici şekerlerin birbirine dönüşen biçimlerinin karmaşık dengesinin çözülmesini sağlar. EPS'nin moleküler ağırlıkları da olağanüstü derecede heterojendir. Bir zincire eklenen alt birimlerin sayısı üzerinde tam olmayan sıkı kontrol ile bir moleküler ağırlık türü baskın olmasına rağmen, uzun ve kısa polimerler sentezlenir (Ismail ve Nampoothiri, 2014). Karakterizasyon çalışmalarında, EPS_{JD2}'nin bağ yapısını belirlemek için tek ve iki boyutlu NMR yöntemleri (¹H-NMR, COSY, NOESY ve ¹³C-APT) kullanılarak analizler hizmet alımı ile yaptırılmıştır. Polisakarit yapısındaki glukoz miktarının, ¹H-NMR spektrumlarında önemli zirveler verdiği bulunmuştur. Bu sonuçlar, HPLC analizinde tanımlanan şekeri (glukozu) desteklemektedir. İncelenen EPS'nin HPLC analizi ve ¹H-NMR spektrumlarının tepe noktaları (4,4 ppm) tutarlı bulunmuştur. 4,4 bölgesindeki zirve, glukozla atfedilmektedir (Cerna ve diğerleri, 2003). Bu bölgelerdeki tepe noktalarının varlığının, hidroksil, C-H ve karbonil grubunun (C = O) gerilme titreşimlerinden ve ayrıca glikozit bağlarının yakınında bulunan şeker zincirinin esnekliğinden kaynaklandığı (Chi ve diğerleri, 2007) düşünülmüştür. Bir çalışmada, *L. starkeyi* VIT-MN03 tarafından anomerik bölgede (δ H 4,5 ila 5,5) üretilen EPS'nin ¹H NMR spektrumları δ 4,52, δ 4,86 ppm'deki kimyasal kayma β -anomerik protonlara karşılık gelirken δ 5,28 ppm (1 $\rightarrow$ 3) glikozidik bağlantılı anomerik protonlara karşılık geldiği rapor edilmiştir (Wang vd., 2019). *L. fermentum* MC3 tarafından üretilen EPS'nin ¹H NMR spektrumu, δ 4,87'de anormal proton bölgesinde iki rezonans içerdiği bildirilmiştir. Çalışmamızda, ¹³C-NMR spektrumunda, anomerik bölgede (δ C 110 ppm) C-2 için sinyal olmadığı belirlenmiş, bu da bize piranoz halka konfigürasyonlu bir monomer şeker (Shukla ve diğerleri, 2011) olduğunu düşündürmüştür. ¹³C- ve ¹H-NMR spektrumlarında dallanma sinyali olmadığından dalsız doğrusal polimer EPS yapısını doğrulamıştır. δ C 102 ppm'nin üzerinde bir kimyasal kaymanın olmaması, glukoz birimi için bir α -konfigürasyonu göstermektedir (Usui ve diğerleri, 1973). Bir çalışmada, *L. starkeyi* VIT-MN03 tarafından üretilen EPS'nin ¹³C NMR spektrumunda δ 16,23, δ 72,85'ten δ 103,06 ve δ 100,55'e kimyasal kaymaların sırasıyla rhamnoz, mannoz ve glukozun varlığını gösterdiği rapor edilmiştir (Ragavan ve Das, 2019). Başka bir çalışmada, ekstrakte edilmiş *S. cerevisiae* için NMR analizi, ¹³C'nin NMR spektrumları altında EPS polimerinden kimyasal kaymalarının δ 20 ppm, δ 55 ppm, δ 60 ppm, δ 170 ppm ve δ 175 ppm'de bir sinyal gösterdiği ifade edilmiştir (Mubarak and Amer, 2013).

Çalışmamızda NOESY spektrumunda aynı alanı paylaşan (birbirlerinin elektron yoğunluğunu etkileyen) protonların (H) çapraz pikleri gözlenmektedir. NOESY spektrumundaki çapraz pikler yardımıyla monomerlerin bağlanma sırası ve bu

bağlanmaların stereokimyası belirlenmiştir. NOESY spektrumunda aynı uzayı paylaşan (birbirinin elektron yoğunluğunu etkileyen) protonlara (H) ait kross pikler gözlenmektedir. NOESY spektrumunda yer alan kross pikler yardımıyla monomerlerin hangi sırayla bağlandığı ve bu bağlanmaların stereokimyası belirlenmektedir. Literatür taraması sonucunda *P. kudriavzeii* türünden elde edilen EPS'nin moleküler bağ yapılarının belirlenmesine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır.

EPS moleküler ağırlığının belirlenmesi için Boyut Dışlama Kromatografisi (SEC) kullanılmıştır. EPS_{JD2}'nin moleküler ağırlığı 43,309 kDa belirlenmiştir. Yapılan taramalarda *P. kudriavzeii* maya türünden izole edilen EPS'lerin moleküler ağırlıklarının belirlendiği çalışmalara rastlanılmadığından farklı bakteri ve mantar türlerinden elde edilen EPS'lerin moleküler ağırlık sonuçları ile karşılaştırma yapılmıştır. *L. rhamnosus* RW-9595M' den elde edilen EPS'nin dektran standart olarak kullanıldığında molekül ağırlığı 5×10^7 ve $2,1 \times 10^7$ Da olarak tespit edilmiştir (Van Calsteren vd., 2002). *L. fermentum* S1'den elde edilen EPS'nin iki fraksiyonun moleküler ağırlığı sırasıyla $4,45 \times 10^6$ ve $2,82 \times 10^6$ Da olarak bildirilmiştir (Wang vd., 2019). Tükenmez vd. (2019) *L. brevis* LB63 suşundan elde etikleri L-EPS'lerin üç fraksiyonlu olduğunu ve bu fraksiyonların moleküler ağırlıklarının ise sırasıyla $2,5 \times 10^3$, $9,3 \times 10^3$ ve $2,4 \times 10^2$ Da olduğunu tespit etmişlerdir. *Rhodospiridium babjevae*'den elde edilen üç EPS fraksiyonunun moleküler ağırlığı $1,02 \times 10^6$, 5×10^5 ve 2×10^5 Da olarak bildirilmiştir (Seveiri, 2020). Cho ve diğerlerine göre (2001), *Rhodotorula glutinis* KCTC 7989 tarafından üretilen EPS'nin ortalama moleküler ağırlığı 100-380 kDa olarak rapor edilmiştir. *Papiliotrema terrestris* PT22AV'nin elde edilen EPS'nin ve 202 kDa'lık bir ortalama moleküler ağırlık (Mw) gösterdiği ifade edilmiştir (Hamidi ve diğerleri, 2022). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuç diğer araştırmacıların sonuçlarından daha düşük bulunmuştur. Düşük moleküler ağırlığa sahip olmasının nedeninin glukoz monomerlerinden oluşan homopolisakkarit yapıda olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. EPS'lerin moleküler ağırlıklarındaki farklılık suş ve büyüme koşullarından kaynaklanmaktadır (Salazar ve diğerleri, 2009; Wang ve diğerleri, 2015a). EPS_{JD2}'nin moleküler ağırlığının düşük olması hücre zarından geçişini kolaylaştırdığı için EPS_{JD2}'nin biyolojik aktivitelerinden iyi sonuçlar elde edildiği düşünülmüştür. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre EPS_{JD2}'nin biyoaktiviteleri üzerinde monomer bileşimlerinin, bağ yapılarının ve molekül ağırlıklarının etkili olabileceği düşünülmüştür ancak nasıl etkili olabileceğine dair mekanizmalar literatürde tam olarak ortaya koyulmamış olsa da çalışmalar biyolojik aktiviteyi etkilediğini desteklemektedir.

In vitro fermentasyon koşulları sırasında prebiyotiklerin fonksiyonel aktivitesini belirlemek için farklı kantitatif yaklaşım geliştirilmiştir. Genel olarak, bu yöntemler, belirli bir prebiyotığın mikrobiyal popülasyonların, büyüme oranlarının, substrat asimilasyonunun ve/veya kısa zincirli yağ asidi üretiminin ölçülmesine dayanmaktadır. Bununla birlikte, prebiyotiklerin fermentasyonu suşa bağlı olduğundan, özellikle kullanım amacı probiyotik olan organizmalar için, belirli suşlar tarafından prebiyotik metabolizmasının ne ölçüde gerçekleştiğini anlamak önemlidir. Gıda bileşeninin prebiyotik olma potansiyeli, prebiyotik aktivite skoru ile belirlenmektedir. Prebiyotik aktivite skoru, prebiyotiklerin diğer mikroorganizmalara göre bakteri suşlarının büyümesini desteklemede ve karbon kaynakları olarak prebiyotik olmayan substratlar (glikoz gibi) üzerindeki büyümeyi göreceli olarak ölçmede kullanılan nicel bir yöntemdir (Huebner ve diğerleri, 2007). İnsanlar, bu oligosakkaritlerde bulunan bağı hidrolize etmek için gerekli olan α -galaktosidaz adlı enzime sahip olmadıklarından, tüketildiklerinde bunları sindiremezler (Navarro ve ark., 2019). Oligosakkaritler, prebiyotikler gibi hareket etme potansiyeline sahiptir, bozulmamış oligosakkaritler, tercihen yararlı bifidojenik mikroorganizmalar tarafından fermente edildikleri kolona ulaşırlar. Bu mikroorganizmalar, laktik asit ve kısa zincirli yağ asitleri gibi konakçının sağlığı üzerinde çeşitli olumlu etkilere katkıda bulunan son ürünler üretirler (Mandalari ve diğerleri, 2008). Bu nedenle, bir prebiyotığın etkinliği, belirli hedef organizmaların büyümesini, substrat asimilasyonunu ve/veya kısa zincirli yağ asidi üretimini (SCFA) desteklemek için seçici olarak fermente edilebilme yeteneğine bağlıdır (Rycroft ve diğerleri, 2001). Prebiyotikler kalın bağırsağa ulaşana kadar sindirim süreçlerine dirençli olmalıdır (Gibson ve ark. 2004). Sindirim süreçlerine karşı direnç, prebiyotiklerin memeli enzimleri tarafından hidrolize edilen gastrik asitliğe ve ayrıca gastrointestinal absorpsiyona karşı direnç göstermesi gerektiği anlamına gelmektedir. Daha sonra, gıda içeriğinin prebiyotik olarak hareket etmesine izin vermek için, gıda içeriğinin kolondaki potansiyel olarak bakteriler tarafından seçici olarak fermente edilmesi gerekir. Ayrıca, gıdanın prebiyotik olması için kolon mikroflorasını değiştirebilmeli, daha sağlıklı bir bileşim haline gelebilmeli ve diğer organizmalarla karşılaştırılabilir olması gerekmektedir (Ashaolu ve diğerleri, 2021). Bu nedenle bu çalışmada potansiyel probiyotik olarak seçilen *Lactobacillus* ve *Saccharomyces* suşları ve bağırsak patojeni *E. coli* tarafından prebiyotikleri (EPS_{JD2} ve inülin) frmente ederek prebiyotik aktivite skorları belirlenmiştir.

Yazarlar (Barrangou ve diğerleri, 2003; Gopal ve diğerleri, 2001), prebiyotiklerin ilgili bakteriler tarafından kullanılmasının, belirli prebiyotikler için özel hidroliz ve taşıma

sistemleri gerektirdiğini bildirmektedir. Marotti ve ark. (2012), Bifidobakterilerin prebiyotik karbonhidratlardan faydalanmak için 48 saatlik inkübasyona ihtiyaç duyduğunu belirtmiştir. Das ve ark. (2014), *L. plantarum* DM5'ten izole ettikleri Glucan-DM5 in prebiyotik skorunu *B. infantis*'te 0,55, *L. acidophilus*'ta 0,45 olarak bulmuşlardır. Dextran-RBA12 prebiyotiğinin (*Weissella cibaria* RBA12'den izole edilen) prebiyotik aktivite skorunun belirlendiği bir çalışmada laktobasillus suşlarında 0,3 ila 0,26, bifidobakter suşlarında ise 0,42 ila 0,26 arasında prebiyotik skor gösterdiği bildirilmiştir (Baruah vd. 2018). Kocaoğlu (2022), *Lactobacillus rhamnosus* ACS5'ten elde ettikleri liyofilize ekzopolisakkaritin (L-EPS) *P. acidilactici* 5008 suşuna karşı 24. ve 48. saatte sırasıyla 2,30 ve 2,92 yüksek prebiyotik skor aktivitesinin *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 patojeni ile olduğunu, *S. cerevisiae* BD21 suşunda ise en yüksek prebiyotik skor aktivitesinin 2,1 olarak aynı test bakterisinde olduğunu rapor etmiştir. Çalışmamızda EPS_{JD2}, *L. plantarum* subsp. *plantarum* DSM20246'a karşı 24 ve 48 saatte prebiyotik skor aktivitesi denenen bağırsak patojeni *E. coli* ATCC 11229 ile sırasıyla 1,33 ve 2,44 olarak belirlenirken *S. cerevisiae* BU19'a karşı 24 ve 48 saatte prebiyotik skor aktivitesi denenen bağırsak patojeni ile sırasıyla 0,27 ve 1,17 olarak tespit edilmiştir. EPS_{JD2} prebiyotiğimizin *L. plantarum* subsp. *plantarum* DSM20246'a karşı prebiyotik aktivite skorunun literatürde yer alan çalışmalarla karşılaştırıldığında genel olarak benzer olduğu ancak *S. cerevisiae* BU19'a karşı düşük olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda aynı zamanda inülinin prebiyotik skor aktivitesi, *L. plantarum* subsp. *plantarum* DSM20246'a karşı, EPS_{JD2}'ninkinden daha yüksek iken, *S. cerevisiae* BU19'a karşı daha zayıf bulunmuştur. Bu sonuç, inülinin daha yüksek derecede prebiyotik skor gösterdiğini gösteren önceki çalışmalarla tutarlı bulunmuştur (Huebner ve diğerleri, 2007; Gopal ve diğerleri, 2001). Huebner ve diğerleri (2007), farklı mikroorganizma suşlarının, prebiyotik aktivite skorlarındaki farklılıklara farklı metabolik kapasiteye sahip olmalarından kaynaklandığını rapor etmişlerdir.

Bir çalışmada, dirençli nişastanın (RS) *Laktik asit* bakterilerinin saf kültürleri LAB (*Lactobacillus plantarum* ATCC 13649 ve *L. brevis* ATCC 8287) ile in vitro fermente edilebilirliği incelenmiştir. Prebiyotik aktivite skorları (PAS), diğer dört farklı karbonhidrat kaynağı (glukoz, inülin, fibersol-2 ve ekmek meyvesi nişastası) ve *Escherichia coli* ATCC 11775'e karşı bir kontrol numunesi ile birlikte 72 saatlik fermentasyondan sonra değerlendirildi. En yüksek prebiyotik aktivite skoru, inülin ve fibersol-2 ile karşılaştırıldığında dirençli nişasta (+1,69 log₁₀ CFU/ml) üzerinde yetiştirilen *L. plantarum* ATCC 13649 tarafından elde edilmiştir (Napisah ve diğerleri, 2022). Düşük prebiyotik skoru, enterik suşların büyümesinin, probiyotik suşlara kıyasla ortamdaki

karbon kaynaklarının mevcudiyeti ile daha az kısıtlanmış olmasından etkilenmiştir (Rubel ve ark., 2014). başka bir çalışmada, probiyotik bakterilerin prebiyotikleri in vitro fermente etme kabiliyetini ele alarak spesifik substratlara ve suşlara dayalı prebiyotik aktivite skorunu tahmin ediyor. Beş probiyotik *Lactobacillus* bakterisi ticari ürünlerden izole edildi ve üç ticari prebiyotiğin fermentasyon yetenekleri değerlendirildi. Çoğunlukla bakteri, Frutafit ve Oligomate 55'te laktulozdan daha hızlı büyüdü. Her prebiyotiğin performansını her prebiyotikle değerlendirmek için prebiyotik aktivite skoru kavramı tanıtıldı; buna göre en yüksek değerler Oligomate 55'te *L. rhamnosus* için olurken, en kötüsü Frutafit'te *L. casei* Shirota oldu (Figueroa-gonzalez ve ark., 2019). Prebiyotik aktivite skoru, prebiyotikler tarafından desteklenen probiyotiklerin seçici büyümesini iyi tanımlar; Bu nedenle, gelişmekte olan coli gıdalarında uygun kombinasyonları belirlemek için yararlı araçlar olabilirler. Tsuda ve diğerleri (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, EPS takviyeli ortamlardaki bakteriyel prebiyotik aktivite skorunun derecesi, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* ve *Escherichia* suşları dahil olmak üzere farklı bakteriler kullanılarak araştırılmıştır. EPS, *Lb*'nin büyümesini teşvik etti. farciminis HM2001. Tsuda ve arkadaşlarına göre *E. coli*, prebiyotikler dışında fermentasyonun ilk saatlerinde monosakkaritler ve laktoz kullanmıştır. Ancak *E. coli*'nin büyümesi, 24 saatlik fermentasyon süresinden sonra bile yüksek kalır. Bunun nedeni *E. coli*'nin prebiyotik karbonhidratları fermente etme yeteneğinin bir miktar olması olabilir (Hartemink ve diğerleri, 1997). Prebiyotik aktivite skoru, prebiyotikler tarafından desteklenen probiyotiklerin seçici büyümesini iyi tanımlar; Bu nedenle, gelişmekte olan coli gıdalarında uygun kombinasyonları belirlemek için faydalı araçlar olabilirler.

EPS'lerin prebiyotik olarak değerlendirilmesindeki önemli kriterlerden biri de mide asidinde hidroliz yeteneğidir (Peredo-Lovillo vd., 2020) Canlı organizmalardan elde edilen prebiyotiklerin kullanılabilir olması için, substratın, gastrik enzim hidrolizine, gastrik sindirime direnç ve GI absorpsiyonuna ve ayrıca bağırsak bakterilerinden faydalı mikropların büyümesinin seçici olarak uyarılmasına toleranslı olmalıdır (Shah ve diğerleri, 2020). Flora kompozisyonunun etkilerinin konak sağlığını etkileyecek şekilde olması için prebiyotiklerin kalın bağırsağa ulaşana kadar sindirim süreçlerine karşı dirençli olması gerekir (Yadav ve ark., 2016). Sindirim süreçlerine direnç, prebiyotiklerin memeli enzimleri tarafından hidrolize edilen mide asiditesine ve ayrıca gastrointestinal absorpsiyona direnç göstermesi gerektiği anlamına gelir (DiGioia ve Biavati, 2018). Bu amaçla bu tezde, farklı zamanlarda (0, 1, 2, 3 saat) ve pH'larda (5 ve 3), *P. kudriavzevii* JD2 maya suşundan ekstrakte edilen EPS_{JD2}'nin mide asidinde hidroliz yetenekleri (%)

tespit edilmiştir. Davy et al. (2021), EPS'nin mide suyu ile hidrolizinin, 6 saatlik inkübasyondan sonra pH 1, 2 3 ve 4'te sırasıyla %1,63, %0,88, %0,75 olarak bulmuşlardır. Bu araştırmacılar test ettikleri EPS'nin hidrolizini, kontrol olarak FOS ve galaktan prebiyotiklerinin hidrolizi ile karşılaştırdıklarında (pH 1, 2, 3 ve 4' te 6 saat sonra %5,02, %3,94, %1,56, %0,66) FOS ve galaktan prebiyotiklerin hidrolizinin test edilen EPS'den daha yüksek olduğunu bildirilmiştir. *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1426'dan üretilen dekstranın, ticari prebiyotik inülin ile karşılaştırıldığında simüle edilmiş insan mide suyu ile önemli ölçüde daha düşük sindirilebilirlik sergilediği bildirilmiştir. Dekstran ve inülinin hidroliz yüzdesi, inkübasyon süresinin artmasıyla ve simüle edilmiş insan mide suyunun pH'nın düşmesiyle arttığı ve 6. saatten sonra dekstranın maksimum hidrolizi pH 1, 2, 3 ve 4'te sırasıyla %0,92, %0,60, %0,44 ve %0,23 iken, inülinin aynı pH'larda %2,7, %2,6, %3,7 ve %1,5 oranlarında hidroliz gösterdiğini bildirilmiştir (Kothari vd., 2015). Kocaoğlu (2022), *L. rhamnosus* ACS5'ten elde ettikleri liyofilize ekzopolisakkaritin (L-EPS) farklı zaman (0,5, 1, 2, 3, 4 ve 5. saat) aralıkları ve pH'larda (1, 2, 3, 4 ve 5) mide asidinde % hidrolizini belirledikleri bir çalışmada pH arttıkça L-EPS'nin yüzde hidrolizinin azaldığını ve L-EPS'nin en düşük hidrolizi pH'ı 4 olan mide sıvısında (%0,21-7,18) gözlemlediklerini en yüksek hidrolizi ise 5 saatlik inkübasyondan sonra pH'sı 3 olan mide sıvısında (%11,02) gözlemlediklerini bildirmişlerdir. Çalışmamızda, *P. kudriavzevii* JD2 suşundan elde edilen EPS_{JD2}'nin inkübasyon süresinin artmasıyla hidroliz oranında kademeli olarak önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir. Çalışılan iki farklı pH'daki mide sıvılarında inülin ve EPS_{JD2} için 3. saatte en yüksek hidroliz değerleri elde edilmiştir. Ticari bir prebiyotik olan inülin ile kıyaslandığında EPS_{JD2}'nin pH 3 mide asidinde hidrolizinin daha yüksek pH 5 mide asidinde ise daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Literatürde yer alan çalışmalarla karşılaştırıldığında genel olarak çalışmalar arasında farklılıklar olduğu görülmektedir. EPS_{JD2}'nin farklı pH değerlerindeki mide sıvısında hidrolizinin düşük olmasından dolayı ticari olarak kullanılan prebiyotiklere alternatif olma potansiyeli bulunmaktadır.

Postbiyotik, pro-fonksiyonel etkilere sahip biyoaktif mikrobiyal bileşikler olduklarından yeni bir trend olarak görülmektedirler. Probiyotiklerin teknolojik uygulamalarının sınırlamaları nedeniyle, farmakokinetik ve güvenlik yönleri ile dikkatçeken postbiyotikler umut verici adaylar olarak görülmektedirler (Salminen ve ark., 2021). Probiyotik mayalar, tıp, biyoteknoloji ve gıda endüstrilerinde geniş ve ilginç aktivitelere sahip folat, mikosin, hayati oligosakkaritler, ekzopolisakkaritler, enzimler, antioksidanlar ve uçucu bileşikler gibi çok işlevli birçok metabolit üretmektedirler (Sadeghi ve diğerleri, 2022). Rai ve

diğerleri (2019), *S. boulardii*'nin B vitaminleri ve folik asitin biyoyararlanımını desteklediğini, yeni folik asit sentezinin ve folat üretiminin maya büyümesi sırasında olduğunu ve bazı mayalarda folik asit sentezi için gerekli olan hedef genlerin tanımlandığını bildirmişlerdir. *S. boulardii* (Bonatsou ve diğerleri, 2018) ve *P. kudriavzevii* (TY1322) (Qvirist ve diğerleri, 2017) gibi bazı maya türleri, temel minerallerin ve mikro besinlerin biyoyararlanımını fitaz yoluyla diyet fitatlarının parçalanmasını katalize ettiği rapor edilmiştir.

Fuochi ve diğerleri (2019), *Lactobacillus* suşlarının metabolit hücre dışı süpernatantlarında (CFS) esas olarak amino asit gruplarına, organik asitlere, monosakkaritlere, ketonlara ve alkollere ait elliden fazla molekölü tanımlamışlardır. Başka bir çalışmada, *Saccharomyces cerevisiae*'nin hücre dışı süpernatantlarının (CFS) metabolitleri tarafından üretilen amino asitler, vitaminler, piruvatlar, glutaminler ve treonin grupları tanımlanmıştır (Gu vd., 2022). Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), sıvı kromatografi üçlü kütle spektroskopisi/likit kromatografi tandem kütle spektroskopisi (LS-MS MS) ve gaz kromatografisi (GC) ile *P. kudriavzevii* JD2'nin hücre dışı süpernatantındaki (postbiyotik-CFS_{JD2}) içerikleri belirlenmiştir ve amino metabolitler, yağ asitleri, şekerler, vitaminler ve fenolik bileşikler açısından zengin olduğu saptanmıştır.

Günümüzde, sağlık açısından faydaları düşünüldüğünde probiyotikler kadar prebiyotiklerin oral yolla alımı da önemli hale gelmiştir. Yapılan çalışmalar, prebiyotik alımının enfeksiyöz ilişkili diyare oluşumunu ve süresini azalttığını, iltihaplı bağırsak hastalığına bağlı şişkinlikleri azalttığını, kolon kanseri ve kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkiler sağladığını, minerallerin biyoyararlanımını ve emilimini arttırdığını ve tokluk ve kilo kaybını iyileştirdiğini göstermektedir (Ashaolu 2020b). Prebiyotikler, konakçı sağlığına faydalı olan mikroorganizma aktivitelerini uyararak ve konak sağlığını olumsuz yönde etkileyen bakteri aktivitelerini baskılayarak bağırsak mikrobiyotasını olumlu yönde değiştirmektedirler (Roberfroid ve ark., 2010). EPS'lerin prebiyotik olarak değerlendirilebilmesi için, EPS'nin kolonda potansiyel olarak bulunan bakteriler tarafından seçici olarak fermente edilmesi gerekmektedir (Angmo ve ark., 2016). Ayrıca EPS'lerin kolonik mikroflorayı değiştirebilmesi, daha sağlıklı bir kompozisyon haline getirebilmesi ve diğer organizmalar ve glikoz gibi prebiyotik olmayan substratlarla karşılaştırılabilir olması ve yararlı bakterilerin büyümesini desteklemesi beklenmektedir (Gibson ve diğerleri, 2004, 2010). EPS'leri fermente eden mikroorganizmalar arasında *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* ve *Pediococcus* (Mokoena, 2017) gibi laktik

asit bakterileri ve *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Geotrichium*, *Mucor*, *Penicillium* ve *Rhizopus* gibi maya ve küf cinsleri gelmektedir (Vagelas vd., 2011).

Fermantasyon için kullanılan mikroorganizmalar, zararlı bakteri ve mantar kirleticilerine karşı allelopatik aktivite ile depolama için bir koruma biçimi olarak gıda güvenliğinin artmasına katkıda bulunmaktadır (Tamang ve diğerleri, 2020). Probiyotikler, gıdalarda bulunan prebiyotiklerin GİS'te uzun süre kaldıkları süre boyunca asimilasyonu ile bağırsak için potansiyel koruyucu bariyer görevi gören metabolitler üretebilirler. Kanıtlar, fermente gıdalarda bulunan inülin tipi fruktanların insan bağırsağı mikrobiyotasında spesifik değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (Vandeputte ve diğerleri, 2017). Fermentasyon sırasında mikroorganizmalar, sindirim süreci için hayati önem taşıyan bazı enzimleri de sentezlediğinden fermente gıdaların tüketiminin bağırsak mikrobiyotasına faydalı olmaktadır (Derrien ve diğerleri, 2015).

Probiyotik bakterilerin hayatta kalmasını ve kolonizasyonunu arttırmak için. EPS'lerin, konak sağlığına faydalı olduğu düşünülen *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi bakteriler tarafından bağırsakta fermente edilerek onlara enerji kaynağı oluşturduğu ve böylece yararlı bakterilerin seçici olarak çoğalmasına olanak sağladığı bildirilmiştir. EPS, bağırsak mikrobiyotası için faydalı bakteriler tarafından fermente edilerek prebiyotik etki göstermektedir (Badel ve diğerleri, 2011). Birkaç çalışma, laktobasillerin prebiyotik karbonhidratları fermente etme yeteneğinin substrata özel olduğunu göstermiştir (Kaplan ve Hutkins, 2003). Tavuk bağırsağında dominant olan *L. salivarius* BİS820 ve *L. reuteri* BİS612 suşlarının L-EPS_{BİS312} ve L-EPS_{BİS722}'yi fermente edebilme kapasitesinin araştırıldığı bir çalışmada, her iki bakterinin L-EPS'leri glukoz gibi fermente ederek geliştirdikleri bildirilmiştir (Dinçer, 2019). Kocaoğlu (2022), *L. rhamnosus* ACS5 suşundan elde ettiği L-EPS'de 0-48 saatlik inkübasyon süresince *L. rhamnosus* EDS4 suşunun canlılığını 9,40-9,96 log kob/mL arasında değiştiğini ve *L. rhamnosus* EDS4 suşunun geliştirilmesinde glukoz yerine L-EPS'nin kullanılabileceği rapor etmiştir. Bu tezde, *P. kudriavzeii* JD2'den suşundan elde edilen EPS_{JD2}'nin *L. plantarum* subsp. *plantarum* DSM20246 ve *S. cerevisiae* BU19 potansiyel probiyotik suşları tarafından fermente edilebilirliğinin belirlenerek ticari prebiyotik olan inulin ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Potansiyel probiyotik suşlar için uygun besiyerindeki karbon kaynağı çıkarılarak aynı oranda EPS_{JD2} ve inulin ilave edilerek mikroorganizmaların canlılıkları belirlenmiştir. *L. plantarum* subsp. *plantarum* DSM20246 6,4 log kob/mL'lik canlılık sayısına sahipken, *S. cerevisiae* BU19 ise 7,6 log kob/mL'lik canlılık sayısına sahip olduğu

bulunmuştur. Probiyotik bakterilerin EPS fermantasyonunun araştırıldığı çalışma sonuçları ile sonuçlarımız benzer göstermiştir. Ayrıca mikroorganizmalar EPS_{JD2}'yi inulinden daha iyi fermete etmişlerdir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda EPS_{JD2}'nin prebiyotik olarak kullanılabileceği düşünülmüştür.

Oligosakkaritler, insanlarda prebiyotik gıda katkı maddesi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır, çünkü modern beslenmede en önemli konulardan biri mikroorganizmaların dengesini korumak, insan bağırsak sağlığını kontrol ederek hastalıkları önlemek ve patojenik mikroorganizmaların çoğalmasını sağlamaktır. İnülin, birincil diyet katkı maddesi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Willems ve Low 2012). İnülin gıda katkı maddesi olarak yaygın bir şekilde kullanılmasına rağmen, bazı *in vitro* çalışmaları laktik asit bakterileri prebiyotiklerinin aksine inülinin daha az etkili olduğu bildirilmiştir (Huebner ve diğerleri, 2007; Tsuda ve Miyamoto, 2010).

EPS'nin mikroorganizmalar tarafından enerji kaynağı olarak kullanıldığı ve EPS'nin bağırsak florasında faydalı mikroorganizmaların büyümesini arttırdığı bildirilmiştir (Tsuda ve ark., 2018). Yapılan çalışmalarda, EPS'de olduğu gibi laktik asit bakterilerinin kültür filtrelerinde de (postbiyotik) bağırsak mikrobiyotası için faydalı olan laktobasillerin ve bifidobakterilerin canlılığını düzenlediği bildirilmiştir (Sarıkaya ve ark., 2017; Dinçer, 2019; Kocaoğlu, 2022). Dinçer (2019), *L. salivarius* BİS312 ve BİS722 suşlarından elde edilen L-EPS ve postbiyotiklerin tavuk bağırsağında yaygın olarak bulunan *L. salivarius* ve *L. reuteri* suşları üzerinde gelişimi düzenleyici etkisinin araştırdığı çalışmasında hem L-EPS'lerin hem de postbiyotiklerin besi ortamına eklenmesi ile konsantrasyon artışına bağlı olarak test bakterilerinin gelişimini önemli ölçüde arttırdığını rapor etmiştir. *L. rhamnosus* ACS5 suşundan elde edilen L-EPS'nin *L. rhamnosus* EDS4, *P. acidilactici* 5008 ve *S. cerevisiae* BD21 suşlarında gelişim düzenleyici aktiviteleri belirlenmiş ve L-EPS'nin *L. rhamnosus* EDS4, *P. acidilactici* 5008 ve *S. cerevisiae* BD21 suşlarının gelişimini pozitif yönde etkilediği ifade edilmiştir. Ayrıca, L-EPS'nin en yüksek gelişimi düzenleyici etkisinin 10,26 log kob/mL ile *S. cerevisiae* BD21 suşunda olduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada postbiyotiklerin aynı test mikroorganizmalara karşı gelişimi düzenleyici aktivitelerin sırasıyla, 9,43, 9,86 ve 9,83 log kob/mL olduğu rapor edilmiştir. Bu tez çalışmasında, EPS_{JD2} ve CFS_{JD2}'nin (postbiyotik-kültür filtratı) laktobasil ve maya gelişimini düzenleyici etkileri belirlenmiştir. Ortama hem EPS_{JD2} hem de CFS_{JD2}'nin eklenmesinin, artan konsantrasyonlara (0,5, 1, 5 ve 10 mg/mL) göre test mikroorganizması olarak kullanılan *L. plantarum* subsp. *plantarum* DSM20246 ve *S. cerevisiae* BU19'in

gelişiminde önemli bir artışa neden olmuştur. EPS_{JD2} ve CFS_{JD2}'nin (kültür filtratı) laktobasil ve maya büyümesi üzerindeki düzenleyici etkisi üzerine elde edilen sonuçlar, ticari olarak kullanılan inülin prebiyotiği ile karşılaştırıldığında, test edilen her iki suşta da daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar diğer araştırmacıların sonuçları ile benzerlik göstermektedir. EPS'nin laktobasil büyümesinin düzenleyici etkisindeki suşlar arasındaki farklılığın sebebinin suşların fizyolojik ve biyokimyasal farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir. *Lactobacillus* cinsi bakteriler üzerinde yapılan bir çalışmada, EPS büyüme düzenlemesinin laktobasiller üzerindeki etkisinde suşlar arasında farklılıklar gözlenmiştir. Suşlar arasında EPS'nin *Lactobacillus farciminis* suşu üzerinde en yüksek büyüme düzenleyici etkiyi gösterdiği belirlenmiş ve bunun nedeninin bu suşun EPS'yi parçalayan enzimler içermesi olduğu ifade edilmiştir. İnaktive edilmiş karbonhidrat zincirlerinin hücre dışı bir sinyal molekülü olarak hareket edebileceği ve büyümeyi teşvik edebileceği de bildirilmiştir (Tsuda ve diğerleri, 2018). *P. kudriavzeii* JD2'den elde edilen EPS_{JD2} ve CFS_{JD2}'nin (postbiyotik-kültür filtratı) gıda katkı maddesi olarak kullanılmasının, prebiyotik ve probiyotik bitkisel takviyelere ihtiyaç duymadan ince bağırsakta faydalı bakterilerin gelişimini uyararak ve bağırsak mikrobiyotasının dengesini koruyarak insan sağlığına olumlu etkileri olabilecektir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, probiyotik kullanımını azaltacak yeni ve daha etkili diyet katkı maddelerinin kullanımı konusunda ilgili alana yeni bir bakış açısı getirebilecektir.

Antioksidanlar, oksidatif hücrel substratların oksidasyonunu geciktiren veya önleyen maddelerdir. Gıda endüstrisinde katkı maddesi olarak kullanılırlar. Sentetik antioksidanlar yaygın olarak gıda katkı maddeleri olarak kullanılmaktadır. Sağlık endişeleri ışığında, daha güvenli ve doğal antioksidanlar bulmaya artan bir ilgi vardır (Aponte ve diğerleri, 2020). Çalışmamızda probiyotik (JD2), postbiyotik (CFS_{JD2}) ve farklı konsantrasyonlarda prebiyotik (EPS_{JD2}), sinbiyotik (JD2+EPS_{JD2}) ve (CFS_{JD2}+EPS_{JD2}) uygulamanın antioksidan aktivitesi üç farklı metot ile belirlenmiş ve antioksidan değerleri %44,2-86,6 arasında değiştiği bulunmuştur.

Reaktif oksijen türlerini (ROS) ve reaktif nitrojen türlerini (RNS) içeren oksidanlar, DNA, proteinler ve lipitler gibi biyomoleküllerin oksidatif bozunmasına neden olabilirler (Salmon, 2004). Probiyotikler, konakçıya sağlık yararları sağlayan antioksidanlar, enzimler, kısa zincirli yağ asitleri, peptitler, temel vitaminler ve mineraller dahil olmak üzere fonksiyonel moleküller salgılar (Pereira ve diğerleri, 2017). *In vitro* çalışmalar, ekzopolisakkaritlerin çeşitli sağlık yararları ve bir antioksidan etkiye sahip olduğunu

bildirmiştir (Das, et al., 2014). Probiyotik bakteri ve mayanın yanı sıra bunların hücre dışı ekstraktlarının (süpernatant-postbiyoti), hücre içi ekstraktlarının, metabolitlerinin ve hücre duvarı bileşenlerinin antioksidan özellikleri hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir (Nowak vd., 2018). Bir çalışmada fermente soya fasulyesinden izole edilen *Pichia pinus* suşlarının antioksidan aktiviteleri %72 olarak bildirilmiştir (Rashad vd., 2011). Ural ve Yüksekdağ (2020), *Lactobacillus* cinsine ait 20 bakterinin beş farklı metot ile (2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikalini giderme, Fe^{+2} iyonu şelatlama, plazma lipid peroksidasyonu, hidroksil radikalini süpürücü aktivitesi ve süperoksit anyon radikali süpürücü aktivitesi) antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. *Lactobacillus brevis* KIR12 suşunda %81,9 oranında en yüksek DPPH serbest radikali giderme yeteneği, *L. fermentum* BP5 suşu %40,5 ile en yüksek metal şelatlama aktivitesi, *L. rhamnosus* SMC6 suşunda %39,2 lipid peroksidasyon inhibisyonu, *L. fermentum* FKK3 (%45,8) en yüksek hidroksil radikalini süpürücü etkisi ve *L. brevis* YG7 (%75,0) ise süperoksit radikali süpürücü aktivitesi olduğunu bildirmişlerdir. Çalışma sonucunda, kullanılan yöntemlere göre bakterilerin antioksidan aktivitelerinde 0,05 düzeyinde anlamlı farklılık olduğunu belirtmişlerdir.

Tez çalışmamızda probiyotik (JD2), postbiyotik (CFS_{JD2}) ve farklı konsantrasyonlarda prebiyotik (EPS_{JD2}), sinbiyotik (JD2+EPS_{JD2}) ve (CFS_{JD2}+EPS_{JD2}) uygulamanın üç farklı metot ile belirlenen antioksidan aktivitelerinin ticari prebiyotik olan inulin ve kontrol grubu olarak askorbik asit ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. CFS_{JD2}'nin DPPH radikali giderme %75,4, süperoksit anyon radikali süpürücü aktivitesi %63,4 ve hidroksil radikali süpürücü aktivitesi %56,6 olarak tespit edilmiştir. Probiyotik (JD2) ve postbiyotik (CFS_{JD2}) uygulamalar birbirleri ile karşılaştırıldığında metotlarda DPPH radikali giderme CFS_{JD2}'de yüksek iken diğer iki metotta probiyotik (JD2) uygulama daha yüksek çıkmıştır. *P. kudriavzevii* (0P2, 1P2, 2P10) süpernatantının (postbiyotik) antioksidan aktivitesi 18. ve 48. saatte DPPH serbest radikali ile sırasıyla %59,67-68,51 olarak bildirilmiştir (Merchán vd., 2020). Bu sonuç bizim sonuçlarımızla uyumludur. Prebiyotik uygulama diğer uygulamalarla karşılaştırıldığında hem sinbiyotik hem de prebiyotik+postbiyotik uygulamaların prebiyotik uygulamaya göre daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Bazı oksidanlar ya normal metabolik süreçlerin bir parçası olarak endojen olarak üretilir ya da dış çevre tarafından organizmalara dayatılır (Rogers ve Clarke, 2007). Probiyotik (JD2) (%67,2) ve postbiyotik (CFS_{JD2}) (%75,4) uygulamaları karşılaştırıldığında, postbiyotiğin

DPPH radikallerini gidermede daha yüksek bir etkiye sahip olmasının nedeninin CFS'nin içeriğinde çok farklı metabolitlerin olmasından kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır. Sornsenee ve ark. (2021)'nin çalışmasında, *Lactobacillus* izolatlarından elde edilen postbiyotiğin antioksidan özelliklerinin belirlenmesinde DPPH ve ABT⁺ radikallerinin süpürücü aktiviteleri kullanılmış ve tüm izolatların antioksidan özelliklere sahip olduğunu gösterilmiştir. *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *Lactococcus lactis* ve *Saccharomyces boulardii*'nin postbiyotiklerinin oksidatif hasarı ve serbest radikal temizleme oranını azalttığı ifade edilmiştir (De Marco ve diğerleri, 2018). Liu ve Pan (2010), 12 *Lactobacillus* suşunun postbiyotiklerinin DPPH radikal süpürmede değişen yetenekler gösterdiğini belgelemiştir. Bu sonuçlar fenoliklerin ve flavonoidlerin antioksidan aktiviteden sorumlu ana bileşikler olduğunu göstermişlerdir. *Weissella confusa* KR780676'nın hücrelerinin ve hücre süpernatantlarının (postbiyotik) güçlü antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Sharma vd., 2018). Gıda endüstrisi için antioksidan özelliği olan fonksiyonel maya elde etmek için yapılan bir çalışmada, bozulmamış hücre ve hücresiz *Pichia fermentans* BY5 ve *Issatchenkia orientalis* BY10 ekstraktının antioksidan aktivitesi araştırılmıştır. Hem sağlam hücre hem de ekstraktları %49 ile %68 arasında değişen antioksidan aktivite göstermiş ve 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil serbest radikallerini temizleme yeteneği %12-41 olarak rapor edilmiştir. Ayrıca, her iki izolatta indirgeme aktivitesinin ekstraktlarda mükemmel antioksidan yeteneğe sahip olarak yorumlanmıştır (Chen vd., 2010). de Oliveira Coelho ve ark. (2019), *Liquorilactobacillus satsumensis*, *Leuconostoc mesenteroides* ve *Sacharomyces cerevisiae*'nin hem hücre içi hem de hücre dışı içeriğinin, 2,2-difenil-1 pikrilhidrazil (DPPH) inhibisyonunun %20 ila 28'inde antioksidan sergilediğini bildirmişlerdir. Kakao kaynaklı *Pichia kudriavzevii* 2P10 izolatına ait metabolitlerin, DPPH serbest radikallerine karşı en yüksek inhibisyon yüzdesi %68,51 olarak bildirilmiş ve *P. kudriavzevii* 2P10'un fonksiyonel gıdalar ve sağlık amaçları için umut verici aday olduğu sonucuna varılmıştır (Wulan ve ark., 2021). Postbiyotiklerin oksidatif stres ile ilişkili hastalıklara bağlı inflamasyonu önlemek için takviye ve yem katkı maddesi olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Thu vd., 2011). Çalışmalar, postbiyotiklerin antioksidanlarındaki varyasyonun, metal iyonlarının şelatlama yeteneği, antioksidan enzim sistemi ve bunlarda bulunan antioksidan metabolitler gibi mekanizmalara bağlı olduğunu göstermektedir (Yang ve ark., 2017).

Tez çalışmamızda, 0,5, 1, 5 ve 10 mg/mL'lik prebiyotik (EPS_{JD2}), sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamalar, konsantrasyon arttıkça DPPH radikalini giderme aktivitesinin de arttırdığı gözlenmiştir. Ayrıca ticari prebiyotik olarak kullanılan inülinin

10 mg/mL konsantrasyonunda 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini giderme etkisinin ise %71,4 olduğu gözlenmiş ve 10 mg/mL'lik prebiyotik (EPS_{JD2}, %79,3), sinbiyotik (JD2+EPS_{JD2}, %83,3) ve CFS_{JD2}+EPS_{JD2} uygulamasından (%86,6) daha düşük bir giderim tespit edilmiştir. *Weissella confusa* KR780676'dan elde edilen galaktan ekzopolisakaritin µg/mL değerleriyle güçlü DPPH süpürme aktivitesi sergilediği gösterilmiştir (Kavitate ve diğerleri, 2022). Bir çalışmada, *Bifidobacterium bifidum* WBIN03'den elde edilen 0,30 mg/mL B-EPS'nin DPPH süpürme aktivitesinin %60,08 ve aynı konsantrasyonda *Lactobacillus plantarum* R315'dan elde edilen L-EPS'nin ise %56,48 olduğu rapor edilmiştir (Li ve diğerleri, 2014). *R. babjevae* kaynaklı EPS'lerin DPPH, $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ süpürme oranları, konsantrasyonlar kademeli olarak artırılmış ve sonuçlar EPS'lerin DPPH, $\cdot\text{OH}$ ve $\text{O}_2^{\cdot-}$ temizleme oranlarının 10 mg/mL konsantrasyonunda sırasıyla %25,2, %27,5 ve %14,1'e ulaştığını göstermiştir (Seveiri vd., 2020). Ma ve diğerleri (2018), Çin Endüstriyel Kültür Koleksiyonu Merkezi'nden elde edilen bir maya türü olan *Rhodotorula mucilaginosa* CICC 33013'ten ekstrakte ettikleri EPS'leri DPPH temizleme aktivitelerinin 8 mg/mL konsantrasyonunda yaklaşık %60'a ulaştığını kanıtlamışlardır. Sonuçlar çalışmamızla benzerlik göstermektedir. Ayrıca yapılan literatür taramalarında postbiyotik+prebiyotik uygulama ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Süperoksit anyon radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$), elektron transfer zincirinden kaçan elektronlar tarafından oksijenin indirgenmesi yoluyla mitokondriyal solunumun bir yan ürünü olarak üretilmektedir (Raha ve Robinson, 2000). Süperoksit anyonu daha sonra nitrojen oksit ile reaksiyona girerek nörodejeneratif hastalıkların oluşumunda rol oynayan yüksek oranda reaktif oksidan peroksinitrit (ONOO^-) oluşturabilir (Szabó, 2007). Son derece reaktif hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$), geçiş metal iyonlarının varlığında Fenton reaksiyonu yoluyla H_2O_2 'den türetilir. *L. plantarum* suşunun postbiyotikleri, EPS, lipoteikoik asit ve hücre yüzeyi proteinleri dahil olmak üzere metabolitlerin varlığına bağlı olarak hidrojen peroksit'e karşı yüksek bir direnç ve süperoksit, hidroksil ve DDPH serbest radikallerine karşı yüksek oranlarda süpürücü aktivite sergilediği rapor edilmiştir (Zhang ve diğerleri, 2013). Çalışmaların çoğu *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Bifidobacterium* suşlarının yanı sıra *Saccharomyces* türlerinin hayvan modellerini kullanarak *in vivo* etkilerini bildirmiştir. Bu tür çalışmalar, postbiyotiklerin oksidatif strese karşı etkisine odaklanmıştır. *Lacticaseibacillus casei* CRL 431'den hücre içi bir postbiyotik kullanmış ve farelere uygulandığında antioksidan savunma sistemini modüle ederek aflatoksin B1'in neden olduğu oksidatif stresi azaltabildiğini gösterilmiştir (Aguilar-Toalá ve diğerleri, 2020).

Antioksidan potansiyeli, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyonun aktivitesine dayalı olarak değerlendirilmiştir. Yazarlar, ısı stresi altındaki etlik piliçlerin diyetine %0,6 oranında *Lactiplantibacillus plantarum* RI11 suşunun postbiyotiğinin eklenmesinin, antioksidan enzim aktivitelerinin plazma konsantrasyonunu arttırdığını göstermiş ve piliçler için bir antioksidan takviyesi olarak tatmin edici etkileri ve potansiyeli özetlenmiştir (Humam vd., 2021). Antioksidan aktivite üç farklı yöntemle belirlenmiş ve en yüksek 1,1-difenil-2-pikrilhidrazaz (DPPH) radikal giderici etkisi 1 mg/mL 1-EPS (%84,9) *L. reuteri* KC21L suşunda elde edilmiştir, Fe^{+2} iyon şelatlama aktivitesi *L. reuteri* KC21L suşunun bakteriyel süspansiyonu+1 mg/mL 1-EPS'de (%76,3) ve *L. salivarius* KC27L'nin bakteriyel süspansiyonunda süperoksit anyon radikali yakalama aktivitesi belirlendi %73,2 (Çelik, 2018). *R. babjevae* kaynaklı EPS'lerin DPPH[•], [•]OH, $O_2^{•-}$ süpürme oranlarının 10 mg/mL konsantrasyonunda sırasıyla %25,2, %27,5 ve %14,1'e ulaştığı gösterilmiştir (Seveiri vd., 2020). Tez çalışmamızda, denenen parametreler için, süperoksit anyon radikali süpürücü aktivitenin %44,2-78,4 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi en yüksek 10 mg/mL'lik JD2+EPS_{JD2} (sinbiyotik) uygulamasında (%78,4) ve en düşük 0,5 mg/mL'lik EPS_{JD2} (prebiyotik) (%44,2) uygulamasında bulunmuştur. 0,5, 1, 5 ve 10 mg/mL'lik prebiyotik, sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamalar kıyaslandığında, konsantrasyon artışının süperoksit anyon radikali giderme aktivitesini arttırdığı gözlenmiştir. Çalışmamızda 10 mg/mL sinbiyotikler ve postbiyotik+prebiyotik uygulamaların süperoksit radikallerini temizleme aktiviteleri kontrol grubu olan askorbik asitten daha yüksek bulunmuş aynı zamanda askorbik asidin tüm konsantrasyonlarda süpürme aktiviteleri, ticari prebiyotik inülininkinden daha yüksek belirlenmiştir. Bu sonuç Li ve diğerleri, (2014) tarafından yapılan çalışma ile tutarlıdır. Ticari prebiyotik olarak kullanılan inülinin, süperoksit anyon radikalini süpürücü etkisinin çalışmamızda kullandığımız uygulamalardan çok daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Hidroksil radikalleri, hidroperoksitlerin (ROOH) ayrışmasından üretilir. Hidroksil radikalleri bazen bağıışıklık etkisinin bir yan ürünü olarak üretilebilir. Hidroksil radikali hemen hemen karbondhidratlar, nükleik asitler, lipidler ve amino asitler gibi tüm makromolekül türlerine zarar verebilir (Paul ve diğerleri, 2013). Hidroksil radikali, yaklaşık 10^{-9} saniyelik çok kısa bir *in vivo* yarı ömre ve yüksek bir reaktiviteye sahiptir, bu onu organizma için çok tehlikeli bir bileşik yapmaktadır (Nishikawa ve diğerleri, 2016). Bu tez çalışmasında, hidroksil radikali süpürücü aktivitesi en yüksek 10 mg/mL sinbiyotik (JD2+EPS_{JD2})'de (%74,4) ve en düşük 0,5 mg/mL'lik prebiyotik (EPS_{JD2}) (%52,3)

uygulanmasında bulunmuştur. 0,5, 1, 5 ve 10 mg/mL prebiyotik uygulamalar (EPS_{JD2}) kıyaslandığında, konsantrasyon artışının hidroksil radikali süpürücü aktivitesini arttırdığını göstermiştir. Aynı durum sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamalarda da tespit edilmiştir. *Saccharomyces cerevisiae* hücre duvarının (β -D-glukanlar) polisakkaritlerinin, antioksidanlar ve antijenotoksik ajanlar olarak koruyucu işlevleriyle sonuçlanabilecek antioksidan aktivite sergilediği gösterilmiştir (Kogan ve diğerleri, 2008). Çalışmamızda hem inülin hem de askorbik asit, hidroksil radikallerine karşı konsantrasyona bağlı süpürücü aktiviteler sergilemiş ve süpürücü aktivite, 0,5 ila 10 mg/mL aralığındaki konsantrasyonla artmıştır. Bununla birlikte, inülinin antioksidan aktivitesi, tüm konsantrasyonlarda askorbik asit ile karşılaştırıldığında daha zayıf bulunmuştur. Bu, birkaç çalışma ile tutarlı bulunmuştur (Hu ve diğerleri, 2014; Shang ve ark., 2018). Bir hidroksil grubuna sahip polisakkaritlerin antioksidan aktiviteleri, serbest radikallere bağlanma ve onları yok etme ile ilişkilendirilmiştir (Wang ve ark., 2016). Bununla birlikte, inülin üzerindeki indirgeyici hidroksil grup terminallerinin miktarı sınırlıdır. Bu nedenle inülinin *in vitro* antioksidan aktiviteleri zayıftır (Wang ve diğerleri, 2016). Osińska-Jaroszuk ve diğerleri, 2014 beyaz çürüklük mantarı *Ganoderma applanatum*'dan elde ettikleri EPS'nin %20'den fazla olmayan DPPH süpürme aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Sun ve diğerleri (2015), arktik deniz bakterisi *Polaribacter* sp.'den EPS'nin antioksidan aktivitelerini incelemişler ve EPS'nin 10 mg/mL konsantrasyonundaki DPPH, $\bullet$ OH, $O^{2-\bullet}$ temizleme aktivitelerinin sırasıyla %55,4, %52,1 ve %28,2 olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda 10 mg/mL'lik sinbiyotik için süpürme yeteneği (%74,4) askorbik asitinkine (%73,9) benzer bulunurken prebiyotik ve postbiyotik+prebiyotikten (sırasıyla, %65,5 ve %69,0) daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar, sinbiyotiğin (JD2+EPS_{JD2}) daha iyi süpürme aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir. Bu sonuç, *Lactobacillus plantarum* R315'in EPS temizleme yeteneğinin askorbik aside benzer olduğunu ve *Bifidobacterium bifidum* WBIN03'ün EPS'sinden daha yüksek olduğunu buldukları Li ve diğerleri, 2014'ün sonuçlarıyla tutarlıdır. Ticari prebiyotik olarak kullanılan inülinin hidroksil radikali yakalama aktivitesi ise 10 mg/mL konsantrasyonda %67,4 olarak belirlenmiştir. Sun ve diğerleri (2015), EPS'nin serbest radikalleri temizleme yeteneğinin yapısındaki -O-, C=O ve -OH gibi fonksiyonel grupların varlığından kaynaklanabileceğini öne sürmüştür. Zhu ve diğerleri (2018), EPS'nin mannoz içeriğinin antioksidan aktivitesinde rol oynayabileceğini öne sürmüştür. Ayrıca Chen ve diğerlerine (2017) göre EPS'lerin antioksidan aktiviteleri tek bir faktöre bağlı olmadığını ve birçok faktörün (monosakkarit oranları, moleküler ağırlık ve glikozidik dallanma gibi) çakışmasının bir sonucu olduğunu rapor etmişlerdir.

Genel olarak antioksidan çalışmalarının sonuçları değerlendirildiğinde bizim elde ettiğimiz sonuçların literatürlerde verilen sonuçlara benzer ve/veya yüksek olması, *P. kudriavzei* JD2 mayasından elde edilen biyotik uygulamaların kuvvetli birer antioksidan aday olabileceğini göstermektedir.

Biyofilm, bir biyotik (gıda) veya abiyotik yüzeylerde (gıda ile temas eden yüzey) büyüyen bir mikrobiyal topluluktur. Antimikrobiyallerin etkisini sınırlayabilen, kendi kendine üretilen bir ekzopolimer matriksi içine yerleştirilmiştir. Gıda kaynaklı patojenler, gıda endüstrisinde gıda işleme sırasında kullanılan paslanmaz çelik, lastik eldiven, plastik, silikon kauçuk ve cam gibi biyotik ve abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşturarak gıda kalitesi ve güvenliği için ciddi bir tehdit oluşturan gıda kontaminasyonuna neden olabilir. Gıda bozulmaları ve ekipman erozyonu nedeniyle gıda endüstrisi işletmelerinin ekonomik faaliyetlerini olumsuz yönde etkilemektedir (Nahar, vd., 2018; Toughik, vd., 2020). EPS'lerinin, patojenik bakteriler tarafından biyofilm oluşumunu engelleme veya kontrol etme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle, çalışmalarının çoğu, biyofilm oluşumunu veya patojenik bakterilerin tamamen yok edilmesini sınırlayan alternatif yolu belirlemeye odaklanmıştır (Kanmani ve diğerleri, 2011). Bu yaklaşımlardan yola çıkarak tez çalışmasında probiyotik (JD2), postbiyotik (CFS_{JD2}), farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 5, 10 mg/mL) prebiyotik (EPS_{JD2}), sinbiyotik (JD2+EPS_{JD2}) ve postbiyotik+prebiyotik uygulama (CFS_{JD2}+ EPS_{JD2}) uygulamaların antibiyofilm aktivitesi üç farklı patojene karşı belirlenmiş ve antibiyofilm değerleri %40-84 arasında değiştiği bulunmuştur. Tez çalışmasından elde edilen sonuçlara göre, probiyotik uygulama patojenlerin biyofilm oluşumunu %70-77 oranında, prebiyotik uygulama ise biyofilm oluşumunu %40-58 oranında engellemiştir. Antibiyofilm etkinin 0,5, 1, 5 ve 10 mg/mL'lık EPS_{JD2}'lerde %40-64 oranında olduğu tespit edilmiştir. JD2+EPS_{JD2} ve CFS_{JD2}+EPS_{JD2} uygulamalarında ise 0,5, 1, 5 ve 10 mg/mL konsantrasyonlarında ise sırasıyla, %54-81 ve %58-84 arasında antibiyofilm aktivite belirlenmiştir. Kontrol amacıyla kullanılan inülinin 0,5 1, 5 ve 10 mg/mL konsantrasyonunda %40-68 oranında biyofilm oluşumu engellemiştir. Sonuçlar, antibiyofilm aktivitesinin konsantrasyona bağlı olduğunu ve 10 mg/mL konsantrasyonunda CFS_{JD2}+EPS_{JD2}'de %84 maksimum inhibitör etkinin olduğunu göstermiştir. Test edilen tüm patojenler arasında EPS_{JD2} *P. aeruginosa* 29212'ye karşı (%40) en düşük inhibitör etki göstermiştir.

Literatür taramaları sonucunda EPS'nin antibiyofilm etkisinin ortaya konulduğu bir çalışmada, *L. acidophilus* A4 suşundan elde edilen EPS'nin, 0,1, 1 ve 10 mg/mL

konsantrasyonları hazırlanarak, Enterohemorajik *E. coli* O157:H7 bakterisi üzerinde biyofilm inhibisyon etkisi araştırılmıştır. En iyi biyofilm inhibisyon etkisinin 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan EPS'de meydana geldiği ve bu konsantrasyondaki EPS'nin biyofilm oluşumunu %87 oranında düşürdüğü belirlenmiş ve biyofilm oluşumundaki bu düşüşün, bakteriyel yüzey özelliklerinin kısmen etkilenmesi sonucunda (hücre yüzeyi modifikasyonlarının veya hücre-hücre yüzey etkileşimlerinin azaltılmasıyla) hücrelerin ilk bağlanma ve otoagregasyonunun inhibe edilmesiyle ortaya çıkabileceği öne sürülmüştür (Kim ve diğerleri, 2009). Koohestani ve diğerleri (2018) tarafından, *L. acidophilus* LA-5 ve *L. casei* 431 suşlarından elde edilen kültür süpernatantlarının mikropalak yöntemine göre, *S. aureus* ATCC 25923 suşu üzerinde biyofilm inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Kültür süpernatantlarının artan konsantrasyona bağlı olarak biyofilm inhibisyon oranını artırdığı ve *L. acidophilus* LA-5 ve *L. casei* 431 suşlarının %100 konsantrasyondaki süpernatantlarının, sırasıyla %70,6 ve %65,3 oranlarında biyofilm oluşumunu engellediği tespit edilmiştir. Kültür filtratlarının antibiyofilm etkilerinin ortaya konulduğu literatür çalışmalarının sonucunda yapılan bir çalışmada *Bacillus licheniformis* SP1 ve SP3 suşlarından elde edilen kültür filtratlarının (postbiyotik), *E. coli* PHL-628 üzerinde biyofilm oluşumunu %50-65 oranlarında engellediği belirlenmiştir (Sayem ve diğerleri, 2011). Antibiyofilm oluşumunun, test edilen tüm EPS örnekleri için 1 mg/mL'nin üzerinde sabit kaldığını, en yüksek aktivitenin ise *Leuconostoc citreum*-BMS suşuna ait, 2 mg/mL'lik EPS ile *E. coli* (%61,5), *E. faecalis* (%53,4) ve *S. aureus* (%76,95)'a karşı olduğu bildirilmiştir. *Leuconostoc pseudomesenteroides*-CM EPS'si, 1 mg/mL'de *E. coli* (%90) ve *E. faecalis*'e (%88) karşı maksimum adhezyon inhibisyonu göstermiştir. *Leuconostoc citreum*-BMS EPS'si ise, 1 mg/mL'de *S. aureus*'a karşı en yüksek antibiyofilm aktivitesi göstermiştir (%86,9) (Abid ve diğerleri, 2018). *Lactobacillus* izolatlarının tüm LCFS'lerinin sadece patojen biyofilm oluşumunu inhibe etmekle kalmayıp, aynı zamanda *E. coli* DMST4212 ve *A. baumannii* DMST 2271'in olgun biyofilmlerini yok edebildiği de ortaya koyulmuştur (Sornsenee ve diğerleri, 2021).

Probiyotikler, patojenlerin aktivitesini ve yüzeylere yapışmasını engelleyebilirler. Probiyotikler, çekirdek biyofilm oluşumunu engeller, biyofilm bütünlüğüne müdahale eder ve antagonistik maddeler salgılayarak biyofilmleri yok ederler (Plaza-Diaz ve diğerleri, 2019). Kim ve diğerleri (2019)'a göre *L. brevis* DF01 bakteriyosinin *E. coli* ve *S. typhimurium* tarafından biyofilm oluşumunu engelleyebileceğini gösterilmiştir. Bazı mikroorganizmalar, bakteri hücre yüzeyinde ATP akışına yol açan gözenek oluşumunu

indükleyerek biyofilmleri yok ederken, diğerleri proteolitik enzimler aracılığıyla biyolojik aktivitelerini gösterirler (Okuda ve ark., 2013).

Probiyotik mayaların önemli rollerinden birinin diğer mikroorganizmalara karşı antagonistik özelliği olduğu bildirilmiştir (Hatoum ve ark., 2012). Srinivas ve ark. (2017), *S. cerevisiae* OBS2'nin *S. aureus* da dahil olmak üzere çeşitli bakteriyel patojenlere karşı antagonistik aktivitesini incelemiş, sonuçlar bu suşun *S. aureus* ve diğer patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitesini göstermiştir. Saidi ve diğerleri (2019), *S. cerevisiae* S3'ün 3 süpernatant ekstraktının metisiline dirençli ve hassas *S. aureus* suşlarının biyofilm oluşumu üzerindeki etkisini incelemiş 512, 1024 ve 2048 µg/mL'lik konsantrasyonlardaki süpernatant ekstraktı artan konsantrasyonla her iki *S. aureus* türünün biyofilm oluşumunu önemli ölçüde azaltmıştır. *S. cerevisiae* IFST062013 mayasının süpernatant ve lizatının antagonistik aktivitesi farklı patojenlere karşı araştırıldığı bir çalışmada, sonuçlar hem süpernatant hem de lizatın *S. aureus*'a karşı antibiyofilm özelliklere sahip olduğunu göstermiştir (Fakruddin ve ark. 2017). Salatalık jangajji'den izole edilen *Saccharomyces cerevisiae*'nin hücresiz süpernatantının (CFS, postbiyotik) *S. aureus* biyofilmlerini inhibe ettiği (Kim ve diğerleri, 2020), *L. monocytogenes*'e karşı anti-biyofilm etkileri gösterdiği bildirilmiştir (Kim ve diğerleri, 2021). Bu azalmanın nedeninin, mayaların yüzey özelliklerini kısmen etkileyerek (hücre yüzey modifikasyonlarını zayıflatarak veya hücre-hücre yüzey etkileşimlerini azaltarak) hücrelerin ilk bağlanmasının ve otoagregasyonunun inhibisyonundan kaynaklanabileceği öne sürülmüştür (Kim ve diğerleri, 2020; 2021). *S. cerevisiae*'nin stafilokokların biyofilm oluşumu üzerindeki etkisine ilişkin yapılan bir çalışmada, *S. cerevisiae*'nin hücre duvarından ekstrakte edilen mannoproteinler, biyofilm büyümesini azalttığı ve olgun biyofilmden hücrelerin dağılmasını kolaylaştırdığı bildirilmiştir (Walencka ve ark. 2007). *S. cerevisiae*'nin çeşitli enzimler, peptitler ve antibiyotikler tarafından anti-biyofilm etkileri olduğu rapor edilmiştir (Saidi ve diğerleri, 2019). Bu sonuçlar bizim çalışmalarımızla paralellik göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Doğal gıdaya olan ihtiyacın artmasıyla birlikte biyotiklerin (probiyotik, prebiyotik, postbiyotik, sinbiyotik ve parabiyoitik gibi) insan beslenmesinde besin takviyesi olarak kullanımına yönelik çalışmalar artmaktadır. *Pichia* cinsine ait mayaların probiyotik olarak kullanımı mevcuttur ancak *Pichia kudriavzevii*'den prebiyotik, postbiyotik ve sinbiyotik ile ilgili çalışma yeterli değildir.

Bu tez kapsamındaki çalışmaların sonuçlarından elde edilen veriler ışığında yapılan çıkarımlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Sonuçlarımıza dayanarak, probiyotik maya suşu *P. kudriavzevii* JD2 ve prebiyotik EPS_{JD2}, kolesterol giderme/presipitasyonunu yeteneği göstermiştir. Çalışmalar, kolesterolün hücre büyümesi, ayrılmış safra tuzları ile kolesterolün presipitasyonunu, kolesterolün hücre zarına bağlanması ve kolesterolün hücre zarına dahil edilmesi yoluyla asimile edilebileceğini göstermektedir. Çalışmamızda, prebiyotik EPS_{JD2} tarafından kolesterol giderme/presipitasyonunu, probiyotiklerin yapmış olduğu giderim/presipitasyondan daha yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte, *P. kudriavzevii* JD2, kolesterol düşürme kabiliyetinde önemli bir potansiyel göstermiştir. Sonuçlar, *P. kudriavzevii* JD2 ve EPS_{JD2}'nin kolesterol seviyesini düşürmek için umut verici fonksiyonel bileşen ajanları olarak kullanılabilir olduğunu göstermektedir.
2. Mide ve bağırsak sıvılarının nötralizasyonu, verileri doğru bir şekilde sunmak için büyük önem taşımaktadır. Probiyotik maya suşu *P. kudriavzevii* JD2'nin, farklı pH'lara sahip mide sıvısını ve farklı safra konsantrasyonlarına sahip bağırsak sıvısını tolere etme kabiliyetine sahip olduğu ile bulunmuştur. *P. kudriavzevii* JD2 ile ileride yapılacak hayvan denemeleri ile *in vivo* olarak kullanılabilirliği belirlendikten sonra potansiyel probiyotik aday olarak önerilebilecektir.
3. Hidrofobik hücreler, biyofilmlerin oluşumunda veya kirleticilerin topraktan ve sudan uzaklaştırılmasında önemli rol oynamaktadırlar. Hücre yüzeyi hidrofobikliğini etkileyen çevresel ve metabolik faktörler üzerine yapılan birçok çalışmaya rağmen, bu konudaki bilgiler hala yetersizdir ve çoğu durumda hidrofobikliğin adezyon, agregasyon veya flokülasyon üzerindeki etkisini gözlemlemekle sınırlıdır. Mevcut çalışmamızda, probiyotik maya suşu *P. kudriavzevii* JD2, farklı hidrokarbonlara karşı yüksek hidrofobik yeteneğe sahip olduğu tespit edilmiştir. *P. kudriavzevii* JD2'nin farklı hidrokarbonlara karşı yüksek

hidrofobik yetenek göstermesi bize potansiyel probiyotik aday olabileceğini düşündürmüştür.

4. EPS'nin kimyasal özellikleri biyolojik özelliklerini etkilediğinden, sahip oldukları monosakkarit birimlerini, molekül ağırlıklarını, molekül bağ yapısını belirlemek amacıyla en yüksek EPS üretim yeteneğine sahip *P. kudriavzevii* JD2 suşundan izole edilen EPS_{JD2}'lerin HPLC, NMR ve SEC analizi yapılmıştır. EPS_{JD2}'nin polisakkarit yapısının sadece glukoz monomerinden oluştuğu için homopolisakkarit yapıda olduğu görülmüştür. EPS_{JD2}'nin polimerik yapısının doğrusal ve dallanmamış olduğunu doğrulanmıştır. Literatür taramaları, EPS yapısındaki yüksek glukoz içeriğinin gıda ve ilaç endüstrisinde uygulanabilirliğini arttırdığını göstermektedir. EPS_{JD2}'nin moleküler ağırlığı düşük olarak belirlenmiştir. Düşük moleküler ağırlığına sahip EPS_{JD2}'nin hücre zarından kolay bir şekilde geçebildiğinden biyolojik aktiviteleri yüksek bulunmuştur. EPS_{JD2}'nin karakterizasyonu ileriki çalışmalarda daha ayrıntılı çalışılarak, EPS_{JD2}'nin sahip olduğu yapısal özellikler çıkartılarak biyolojik aktiviteleri ile olan ilişkileri ortaya çıkartılabilecektir. EPS molekülünün yapısal özellikleri, biyolojik aktivitelerini etkilediği gibi teknolojik uygulama alanlarını da belirlemektedir. Bu nedenle, yeni bir EPS'nin kimyasal bileşiminin ve yapısının aydınlatılması, potansiyel uygulamalarının belirlenmesi açısından oldukça önemlidir.

5. *P. kudriavzevii* JD2 maya suşundan izole edilip liyofilize hale getirilen EPS_{JD2}'nin ticari prebiyotiklere alternatif olarak kullanılabilirliğinin araştırılması amacıyla yapılan araştırmalar sonucunda EPS_{JD2}'nin;

- Prebiyotik aktivite skorunun, ticari prebiyotik inülin ile benzer bir olduğu,
- Mide asidinde inülinde daha az hidroliz olduğu,
- Potansiyel probiyotik mikroorganizmalar tarafından fermente edilebildiği,
- Bağırsak mikrobiyota dengesinde önemli yeri olan laktobasil ve maya gelişimini arttırdığı ve ticari olarak kullanılan inulin prebiyotiğine göre daha başarılı olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, *P. kudriavzevii* JD2'den elde edilen EPS_{JD2}'nin prebiyotik olarak ticari prebiyotiklere alternatif olarak kullanılabileceği öngörülmüştür. Ancak, *P. kudriavzevii* JD2 maya suşundan elde edilen EPS_{JD2}'nin prebiyotik ve diğer uygulamada katkı olarak önerilebilmesi için kesin bir yargıya varabilmek için daha fazla çalışma yapılması ve hayvan denemeleri ile desteklenmesi gerekmektedir.

6. *P. kudriavzevii* JD2'den postbiyotik (CFS_{JD2}) elde edilerek içeriği belirlenmiş ve CFS_{JD2}'nin laktobasil ve maya gelişimini düzenleyici etkisi belirlenmiştir.

7. Probiyotik (JD2), prebiyotik (EPS_{JD2}), postbiyotik (CFS_{JD2}), sinbiyotik (JD2+EPS_{JD2}) ve postbiyotik+prebiyotik (CFS_{JD2}+EPS_{JD2}) uygulamanın antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Serbest radikalleri süpürme aktivitesi bakımından EPS_{JD2} güçlü antioksidan aktivite göstermesine rağmen hem sinbiyotik hem de postbiyotik+prebiyotik uygulama daha iyi sonuç vermiştir. Ortamda postbiyotiğin bulunması antioksidan aktivitenin artmasına neden olmuştur. Bu da postbiyotik içeriğinin primer ve sekonder metabolitler bakımından zengin olmasından kaynaklanmış olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Bu değerlendirmenin doğruluğunu ispatlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

8. Biyofilm enfeksiyonları oldukça tehlikeli sonuçlara neden olabildiğinden bir tedavi bulmak ve antibiyofilm ajan geliştirmek son yıllarda popüler araştırma konuları arasındadır. Çalışmamızda, probiyotik (JD2), prebiyotik (EPS_{JD2}), postbiyotik (CFS_{JD2}), sinbiyotik (JD2+EPS_{JD2}) ve postbiyotik+prebiyotik (CFS_{JD2}+EPS_{JD2}) uygulamanın bakteriyel biyofilm oluşumları üzerindeki yüksek antibiyofilm etkileri nedeniyle, bu uygulamaların sağlık ve gıda alanlarında anti-biyofilm ajan olarak kullanılabilme potansiyellerinin mevcut olduğu bulunmuştur. Bu konu ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunduğu bundan sonraki çalışmalara kaynak olacağı düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

- Aakef, J. (2018). *Investigation of Some Probiotic Properties of Yeast Isolated from Date*. Master's Thesis, Department of Biology, Gazi University, Institute of Science, Ankara, 101.
- Abbas, C. (2006). *Production of antioxidants, aromas, colours, flavours, and vitamins by yeasts*. In G. Querol, H. Fleet (Eds.), *Yeasts in food and beverages*. Berlin: Springer Verlag, 285-334.
- Abdel-Banat, B. M., Hoshida, H., Ano, A., Nonklang, S., and Akada, R. (2010). High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4), 861-867.
- Abdulhussein, A., Mtasher, A and Mutlag, S. (2018). Probiotics and prebiotics. *International Journal of Current Research*, 10(11), 75341-75352.
- Abid, Y., Casillo, A., Gharsallah, H., Joulak, I., Lanzetta, R., Corsaro, M. M., Attia, H., and Azabou, S. (2018). Production and structural characterization of exopolysaccharides from newly isolated probiotic *lactic acid* bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 719-728.
- Abudureyimu, M. (2017). *Peynirlerden İzole Edilen Mayaların Probiyotik Özelliklerin Araştırılması*. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 122.
- Afreen, A., Ahmed, Z., Khalid, N., Ferheen, I. and Ahmed, I. (2023). Optimization and cholesterol-lowering activity of exopolysaccharide from *Lactiplantibacillus paraplantarum* NCCP 962. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69, 515–530.
- Aguilar-Toalá, J. E., Astiazarán-García, H., Estrada-Montoya, M. C., Garcia, H. S., Vallejo-Cordoba, B., González-Córdova, A. F., and Hernández-Mendoza, A. (2019). Modulatory effect of the intracellular content of *Lactobacillus casei* CRL 431 against the aflatoxin B 1-induced oxidative stress in rats. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11, 470-477.
- Aguilar-Toalá, J. E., Hall, F. G., Urbizo-Reyes, U. C., Garcia, H. S., Vallejo-Cordoba, B., González-Córdova, A. F., Hernández-Mendoza, G., and Liceaga, A. M. (2020). In silico prediction and in vitro assessment of multifunctional properties of postbiotics obtained from two probiotic bacteria. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12, 608-622.
- Alakeji, T. P., and Oloke, J. K. (2020). Association of probiotic potential of strains of *Pichia kudriavzevii* isolated from ogi with the number of open reading frame (ORF) in the nucleotide sequences. *African Journal of Biotechnology*, 19(3), 148-155.
- Aloğlu, H. (2005). *Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Kullanımı ile Kolesterolün Azaltılması*. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 110.

- Andresen, V., Gschossmann, J., and Layer, P. (2020). Heat-inactivated *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 (SYN-HI-001) in the treatment of irritable bowel syndrome: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*, 5(7), 658-666.
- Angelin, J., and Kavitha, M. (2020). Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 853-865.
- Angiolella, L., Rojas, F., Mussin, J., Greco, R., Sosa, M. D. L. A., Zalazar, L., and Giusiano, G. (2020). Biofilm formation, adherence, and hydrophobicity of *M. sympodialis*, *M. globosa*, and *M. slooffiae* from clinical isolates and normal skin. Virulence factors of *M. sympodialis*, *M. globosa* and *M. slooffiae*. *Medical Mycology*, 58(8), 1162-1168.
- Angmo, K., Kumari, A., and Bhalla, T. C. (2016). Probiotic characterization of *lactic acid* bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT-food Science and Technology*, 66, 428-435.
- Anoop, V., Rotaru, S., Shwed, P. S., Tayabali, A. F., and Arvanitakis, G. (2015). Review of current methods for characterizing virulence and pathogenicity potential of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains towards humans. *Federation of European Microbiological Societies Yeast Research*, 15(6), 1-12.
- Aoun, A., Darwish, F. and Hamod, N. (2020). The influence of the gut microbiome on obesity in adults and the role of probiotics, prebiotics, and synbiotics for weight loss. *Preventive Nutrition and Food Science*, 25(2), 113–123.
- Aponte, M., Murru, N., and Shoukat, M. (2020). Therapeutic, prophylactic, and functional use of probiotics: a current perspective. *Frontiers in Microbiology*, 11(562048), 1-16.
- Arena, M. P., Caggianiello, G., Fiocco, D., Russo, P., Torelli, M., Spano, G., and Capozzi, V. (2014). Barley β -glucans-containing food enhances probiotic performances of beneficial bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(2), 3025-3039.
- Arrieta, M. C., Stiemsma, L. T., Amenyogbe, N., Brown, E. M., and Finlay, B. (2014). The intestinal microbiome in early life: health and disease. *Frontiers in Immunology*, 5, 427.
- Ashaolu, T. J. (2020b). Immune boosting functional foods and their mechanisms: A critical evaluation of probiotics and prebiotics. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 130, 110625.
- Ashaolu, T. J., Ashaolu, J. O., and Adeyeye, S. A. O. (2021). Fermentation of prebiotics by human colonic microbiota in vitro and short-chain fatty acids production: a critical review. *Journal of Applied Microbiology*, 130(3), 677-687.
- Asto, E., Mendez, I., Rodriguez-Prado, M., Cune, J., Espadaler, J., and Farran-Codina, A. (2019). Effect of the degree of polymerization of fructans on ex vivo fermented human gut microbiome. *Nutrients*, 11(6), 1293.

- Ayama, H., Sumpavapol, P., and Chanthachum, S. (2014). Effect of encapsulation of selected probiotic cell on survival in simulated gastrointestinal tract condition. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, 36(3), 291-299.
- Badel, S., Bernardi, T., and Michaud, P. (2011). New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 29(1), 54-66.
- Bajaj, B. K., Raina, S., and Singh, S. (2013). Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. *Journal of Basic Microbiology*, 53(8), 645-656.
- Bakshi, P. S., Selvakumar, D., Kadirvelu, K., and Kumar, N. S. (2020). Chitosan as an environment friendly biomaterial—a review on recent modifications and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 150, 1072-1083.
- Banik, A., Halder, S. K., Ghosh, C., and Mondal, K. C. (2019). Fungal probiotics: opportunity, challenge, and prospects. *Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi*, 11235, 101-117.
- Barcelo, A., Claustre, J., Moro, F., Chayvialle, J. A., Cuber, J. C., and Plaisancié, P. (2000). Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon. *Gut*, 46(2), 218-224.
- Barrangou, R., Altermann, E., Hutkins, R., Cano, R., and Klaenhammer, T. R. (2003). Functional and comparative genomic analyses of an operon involved in fructooligosaccharide utilization by *Lactobacillus acidophilus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(15), 8957-8962.
- Baruah, R., Deka, B., Kashyap, N., and Goyal, A. (2018). Dextran utilization during its synthesis by *Weissella cibaria* RBA12 can be overcome by fed-batch fermentation in a bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 184(2), 1-11.
- Bekatorou, A., Psarianos, C., and Koutinas, A. A. (2006). Production of food grade yeast. *Biotechnology*, 44(39), 407-415.
- Belenguer, A., Duncan, S. H., Calder, A. G., Holtrop, G., Louis, P., Lobley, G. E., and Flint, H. J. (2006). Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. *Applied and environmental microbiology*, 72(5), 3593-3599.
- Berger, S., Raman, G., Vishwanathan, R., Jacques, P. F., and Johnson, E. J. (2015). Dietary cholesterol and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 102(2), 276-294.
- Bianconi, V., Banach, M., Pirro, M., and Panel, I. L. E. (2021). Why patients with familial hypercholesterolemia are at high cardiovascular risk? Beyond LDL-C levels. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 31(4), 205-215.
- Binetti, A., Carrasco, M., Reinheimer, J., and Suárez, V. (2013). Yeasts from autochthonal cheese starters: technological and functional properties. *Journal of Applied Microbiology*, 115(2), 434-444.

- Bikric, S., Aslim, B., Dincer, I., Yuksekdağ, Z., Ulusoy, S., and Yavuz, S. (2022). Characterization of exopolysaccharides (EPSs) obtained from *Ligilactobacillus salivarius* strains and investigation at the prebiotic potential as an alternative to plant prebiotics at poultry. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 14, 49–59.
- Bisht, C. M. S., Iqbal, S. S., Khan, A. A., Mohammed, T., Dawoud, A., Gamal, M., Singh, S., and Asghar, B. H. (2019). Natural Products in Drug Discovery: Antibacterial and Antifungal Activity of Essential Oil of Compound Isolated from *Senecio royleanus*. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 13(3), 1611-1617.
- Bonatsou, S., Karamouza, M., Zoumpopoulou, G., Mavrogonatou, E., Kletsas, D., Papadimitriou, K., Tsakalidou, E., Nychas, G. J. E., and Panagou, E. Z. (2018). Evaluating the probiotic potential and technological characteristics of yeasts implicated in cv. Kalamata natural black olive fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 271, 48-59.
- Bouhnik, Y., Attar, A., Joly, F. A., Riottot, M., Dyard, F., and Flourie, B. (2004). Lactulose ingestion increases faecal *bifidobacterial* counts: a randomised double-blind study in healthy humans. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58(3), 462-466.
- Bouhnik, Y., Achour, L., Paineau, D., Riottot, M., Attar, A., and Bornet, F. (2007). Four-week short chain fructo-oligosaccharides ingestion leads to increasing fecal *bifidobacteria* and cholesterol excretion in healthy elderly volunteers. *Nutrition Journal*, 6(42), 1-7.
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., Powell, I. B., Prajapatti, J. B., Seto, Y., Schure, E. T., Boven, A. V., Vankerckhoven, V., Zgoda, A., Tuijelaars, S., and Hansen, E. B. (2012). Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology*, 154(3), 87-97.
- Bovee-Oudenhoven, I. M. J., Ten Bruggencate, S. J. M., Lettink-Wissink, M. L. G., and Van der Meer, R. (2003). Dietary fructo-oligosaccharides and lactulose inhibit intestinal colonisation but stimulate translocation of *salmonella* in rats. *Gut*, 52(11), 1572-1578.
- Breierová, E., Hromádková, Z., Stratilová, E., Sasinková, V., and Ebringerová, A. (2005). Effect of salt stress on the production and properties of extracellular polysaccharides produced by *Cryptococcus laurentii*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 60(5-6), 444-450.
- Briand, F., Sulpice, T., Giammarinaro, P., and Roux, X. (2019). *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 changes lipidemic profile and gut microbiota in a hamster hypercholesterolemic model. *Beneficial Microbes*, 10(5), 555-567.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., and Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104(4), 467-483.
- Canfora, E. E., Meex, R. C., Venema, K., and Blaak, E. E. (2019). Gut microbial metabolites in obesity, NAFLD and T2DM. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(5), 261-273.

- Castorena-Alba, M. M., Vázquez-Rodríguez, J. A., López-Cabanillas Lomelí, M., and González-Martínez, B. E. (2018). Cholesterol assimilation, acid and bile survival of probiotic bacteria isolated from food and reference strains. *Journal of Food*, 16(1), 36-41.
- Castro-Bravo, N., Wells, J. M., Margolles, A., and Ruas-Madiedo, P. (2018). Interactions of surface exopolysaccharides from *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* within the intestinal environment. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2426.
- Çelik, K. (2018). *Tavuk Dışkısından İzole Edilen Laktik Asit Bakterileri Ekzopolisakkaritlerinin Antioksidan ve Antibiyofilm Aktiviteleri*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 86.
- Çetin, O. (2021). *Potansiyel Probiyotik Enterococcus Cinsi Bakterilerin Kolesterol Giderim Mekanizmaları ve BSH Gen Analizleri*. Yüksek Lisans Tezi, Aksaray Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü, Aksaray, 66.
- Ceugniet, A., Coucheney, F., Jacques, P., Daube, G., Delcenserie, V., and Drider, D. (2017). Anti-*Salmonella* activity and probiotic trends of *Kluyveromyces marxianus* S-2-05 and *Kluyveromyces lactis* S-3-05 isolated from a French cheese, Tomme d'Orchies. *Research in Microbiology*, 168(6), 575-582.
- Chaieb, K., Kouidhi, B., Jrah, H., Mahdouani, K., and Bakhrouf, A. (2011). Antibacterial activity of Thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial biofilm formation. *Complementary and Alternative Medicine*, 11, 1-6.
- Chan, M. Z. A., and Liu, S. Q. (2022). Fortifying foods with synbiotic and postbiotic preparations of the probiotic yeast, *Saccharomyces boulardii*. *Current Opinion in Food Science*, 43, 216-224.
- Chang, H. M., Foo, H. L., Loh, T. C., Lim, E. T. C., and Abdul Mutalib, N. E. (2020). Comparative studies of inhibitory and antioxidant activities, and organic acids compositions of postbiotics produced by probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* strains isolated from Malaysian foods. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 602280.
- Chelliah, R., Ramakrishnan, S. R., Prabhu, P. R., and Antony, U. (2016). Evaluation of antimicrobial activity and probiotic properties of wild-strain *Pichia kudriavzevii* isolated from frozen idli batter. *Yeast*, 33(8), 385-401.
- Chen, L. S., Ma, Y., Chen, L. J., Zhao, C. H., Maubois, J. L., Jiang, T. M., Li, H. M., and He, S. H. (2010). Antioxidant activity of two yeasts and their attenuation effect on 4-nitroquinoline 1-oxide induced in vitro lipid peroxidation. *International journal of food science & technology*, 45(3), 555-561.
- Chen, L. S., Ma, Y., Maubois, J. L., He, S. H., Chen, L. J., and Li, H. M. (2010b). Screening for the potential probiotic yeast strains from raw milk to assimilate cholesterol. *Dairy Science and Technology*, 90(5), 537-548.
- Chen, T., Xu, P., Zong, S., Wang, Y., Su, N., and Ye, M. (2017). Purification, structural features, antioxidant and moisture-preserving activities of an exopolysaccharide from *Lachnum* YM262. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 27(5), 1225-1232.

- Chen, Z., Shi, J., Yang, X., Liu, Y., Nan, B., and Wang, Z. (2016). Isolation of exopolysaccharide-producing bacteria and yeasts from Tibetan kefir and characterisation of the exopolysaccharides. *International Journal of Dairy Technology*, 69(3), 410-417.
- Chi, Z., Su, C. D., and Lu, W. D. (2007). A new exopolysaccharide produced by marine *Cyanothece* sp. 113. *Bioresource Technology*, 98(6), 1329-1332.
- Cho, D. H., Chae, H. J., and Kim, E. Y. (2001). Synthesis and characterization of a novel extracellular polysaccharide by *Rhodotorula glutinis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 95(3), 183-193.
- Chua, M. C., Ben-Amor, K., Lay, C., Goh, A. E., Chiang, W. C., Rao, R., Chew, C., Chaithongwongwatthana, S., Khemapech, N., Knol, J., and Chongsrisawat, V. (2017). Effect of synbiotic on the gut microbiota of cesarean delivered infants: a randomized, double-blind, multicenter study. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 65(1), 102-106.
- CK Rajendran, S. R., Okolie, C. L., Udenigwe, C. C., and Mason, B. (2017). Structural features underlying prebiotic activity of conventional and potential prebiotic oligosaccharides in food and health. *Journal of Food Biochemistry*, 41(5), 12389.
- Collado, M. C., Isolauri, E., Salminen, S., and Sanz, Y. (2009). The impact of probiotic on gut health. *Current Drug Metabolism*, 10(1), 68-78.
- Costabile, A., Fava, F., Röytiö, H., Forssten, S. D., Olli, K., Klievink, J., Rowland, I., Ouwehand, A. C., Rastall, R. A. and Gibson, G. R. Walton, G. E. (2012). Impact of polydextrose on the faecal microbiota: a double-blind, crossover, placebo-controlled feeding study in healthy human subjects. *British Journal of Nutrition*, 108(3), 471-481.
- Cuello-Garcia, C., Fiocchi, A., Pawankar, R., Yepes-Nuñez, J. J., Morgano, G. P., Zhang, Y., Agarwal, A., Gandhi, S., Terracciano, L., Schünemann, H. J., and Brozek, J. L. (2017). Prebiotics for the prevention of allergies: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clinical & Experimental Allergy*, 47(11), 1468-1477.
- Cummings, J. and Macfarlane, G. (2002). Gastrointestinal effects of prebiotics. *British Journal of Nutrition*, 87(2), 514-551.
- Dabiri, S., Shams-Ghahfarokhi, M., and Razzaghi-Abyaneh, M. (2018). Comparative analysis of proteinase, phospholipase, hydrophobicity and biofilm forming ability in *Candida* species isolated from clinical specimens. *Journal de Mycologie Médicale*, 28(3), 437-442.
- Dahiya, D., and Nigam, P. S. (2022). Probiotics, prebiotics, synbiotics, and fermented foods as potential biotics in nutrition improving health via microbiome-gut-brain axis. *Fermentation*, 8(7), 303.
- Daliri, E. B. M., and Lee, B. H. (2015). New perspectives on probiotics in health and disease. *Food Science and Human Wellness*, 4(2), 56-65.

- Danchik, C., and Casadevall, A. (2021). Role of cell surface hydrophobicity in the pathogenesis of medically-significant fungi. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 342-352.
- Das, D., Baruah, R., and Goyal, A. (2014). A food additive with prebiotic properties of an α -d-glucan from *Lactobacillus plantarum* DM5. *International Journal of Biological Macromolecules*, 69, 20-26.
- Das, T. K., Pradhan, S., Chakrabarti, S., Mondal, K. C., and Ghosh, K. (2022). Current status of probiotic and related health benefits. *Applied Food Research*, 2, 100185.
- Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S. J., Berenjian, A., and Ghasemi, Y. (2019). Prebiotics: definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. *Foods*, 8(3), 92.
- Devi, P. B., Kavita, D., Jayamanohar, J., and Shetty, P. H. (2021). Preferential growth stimulation of probiotic bacteria by galactan exopolysaccharide from *Weissella confusa* KR780676. *Food Research International*, 143, 110333.
- de Almada, C. N., Nunes de Almada, C., Martinez, R. C. R., and Sant'Ana, A. D. S. (2015). Characterization of the intestinal microbiota and its interaction with probiotics and health impacts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 4175-4199.
- de Lucena, R. M., Elsztein, C., de Barros Pita, W., de Souza, R. B., de Sá Leitão Paiva Júnior, S., and de Moraes Junior, M. A. (2015). Transcriptomic response of *Saccharomyces cerevisiae* for its adaptation to sulphuric acid-induced stress. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 108, 1147-1160.
- de Melo Pereira, G. V., Beux, M., Pagnoncelli, M. G. B., Soccol, V. T., Rodrigues, C., and Soccol, C. R. (2016). Isolation, selection and evaluation of antagonistic yeasts and lactic acid bacteria against ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae* on coffee beans. *Letters in Applied Microbiology*, 62(1), 96-101.
- de Oliveira Coelho, B., Fiorda-Mello, F., de Melo Pereira, G. V., Thomaz-Soccol, V., Rakshit, S. K., de Carvalho, J. C., and Soccol, C. R. (2019). In vitro probiotic properties and DNA protection activity of yeast and lactic acid bacteria isolated from a honey-based kefir beverage. *Foods*, 8(10), 485.
- De Marco, S., Sichert, M., Muradyan, D., Piccioni, M., Traina, G., Pagiotti, R., & Pietrella, D. (2018). Probiotic cell-free supernatants exhibited anti-inflammatory and antioxidant activity on human gut epithelial cells and macrophages stimulated with LPS. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 1756308.
- De Vuyst, L., Harth, H., Van Kerrebroeck, S., and Leroy, F. (2016). Yeast diversity of sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities. *International Journal of Food Microbiology*, 239, 26-34.
- Delzenne, N. M., Neyrinck, A. M., Bäckhed, F., and Cani, P. D. (2011). Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(11), 639-646.

- Den Besten, G., Van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D. J., and Bakker, B. M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*, 54(9), 2325-2340.
- Depeint, F., Tzortzis, G., Vulevic, J., I'anson, K., and Gibson, G. R. (2008). Prebiotic evaluation of a novel galactooligosaccharide mixture produced by the enzymatic activity of *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171, in healthy humans: a randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled intervention study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(3), 785-791.
- Derrien, M., and van Hylckama Vlieg, J. E. (2015). Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends in Microbiology*, 23(6), 354-366.
- Dertli, E., Colquhoun, I. J., Côté, G. L., Le Gall, G., and Narbad, A. (2018). Structural analysis of the α -D-glucan produced by the sourdough isolate *Lactobacillus brevis* E25. *Food Chemistry*, 242, 45-52.
- Di Gioia, D., and Biavati, B. (2018). Probiotics and prebiotics in animal health and food safety: conclusive remarks and future perspectives. In D. Di Gioia, and B. Biavati, (Eds.), *Probiotics and prebiotics in animal health and food safety*. Cham: Springer, 269-273.
- Dilna, S. V., Surya, H., Aswathy, R. G., Varsha, K. K., Sakthikumar, D. N., Pandey, A., and Nampoothiri, K. M. (2015). Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1179-1186.
- Dinçer, İ. (2019). *Tavuk Bağırsağı Kaynaklı Yüksek Ekzopolisakkarit Üreticisi Lactobacillus Salivarius'un Metabolik Filtrat ve Ekzopolisakkaritlerinin Prebiyotik Etkisinin Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 99.
- Donovan, S. M. (2006). Role of human milk components in gastrointestinal development: current knowledge and future needs. *The Journal of Pediatrics*, 149(5), 49-61.
- Dos Passos, F. R., Maestre, K. L., da Silva, B. F., Rodrigues, A. C., Triques, C. C., Garcia, H. A., Fagundes-Klen, M. R., da Silva, E. A., and Fiorese, M. L. (2021). Production of a synbiotic composed of galacto-oligosaccharides and *Saccharomyces boulardii* using enzymatic-fermentative method. *Food Chemistry*, 353, 129486.
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.
- Dunand, E., Burns, P., Binetti, A., Bergamini, C., Peralta, G. H., Forzani, L., Reinheimer, J., and Vinderola, G. (2019). Postbiotics produced at laboratory and industrial level as potential functional food ingredients with the capacity to protect mice against *Salmonella* infection. *Journal of Applied Microbiology*, 127(1), 219-229.
- Enam, F., and Mansell, T. J. (2019). Prebiotics: tools to manipulate the gut microbiome and metabolome. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 46(9-10), 1445-1459.

- Escamilla, J., Lane, M. A., and Maitin, V. (2012). Cell-free supernatants from probiotic *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease colon cancer cell invasion in vitro. *Nutrition and Cancer*, 64(6), 871-878.
- Fakruddin, M. D., Hossain, M. N., and Ahmed, M. M. (2017). Antimicrobial and antioxidant activities of *Saccharomyces cerevisiae* IFST062013, a potential probiotic. *Complementary and Alternative Medicine*, 17, 1-11.
- Falony, G., Vlachou, A., Verbrugghe, K., and Vuyst, L. D. (2006). Cross-feeding between *Bifidobacterium longum* BB536 and acetate-converting, butyrate-producing colon bacteria during growth on oligofructose. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7835-7841.
- Fadda, M. E., Mossa, V., Deplano, M., Pisano, M. B., and Cosentino, S. (2017). In vitro screening of *Kluyveromyces* strains isolated from Fiore Sardo cheese for potential use as probiotics. *Journal of Food Science and Technology*, 75, 100-106.
- Feng, Y., Wang, Y., Wang, P., Huang, Y., & Wang, F. (2018). Short-chain fatty acids manifest stimulative and protective effects on intestinal barrier function through the inhibition of NLRP3 inflammasome and autophagy. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 49(1), 190-205.
- Fernández-Pacheco, P., Cueva, C., Arévalo-Villena, M., Moreno-Arribas, M. V., and Pérez, A. B. (2019). *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora osmophila* strains as yeast active cultures for potential probiotic applications. *Food & Function*, 10(8), 4924-4931.
- Figuerola-Gonzalez, I., Rodriguez-Serrano, G., Gomez-Ruiz, L., Garcia-Garibay, M., and Cruz-Guerrero, A. (2019). Prebiotic effect of commercial saccharides on probiotic bacteria isolated from commercial products. *Food Science and Technology*, 39(3), 747-753.
- Fiore, C., Arrizon, J., Gschaedler, A., Flores, J., and Romano, P. (2005). Comparison between yeasts from grape and agave musts for traits of technological interest. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 1141-1147.
- Fletcher, E., Feizi, A., Bisschops, M. M., Hallström, B. M., Khoomrung, S., Siewers, V., and Nielsen, J. (2017). Evolutionary engineering reveals divergent paths when yeast is adapted to different acidic environments. *Metabolic Engineering*, 39, 19-28.
- Flint, H. J., Bayer, E. A., Rincon, M. T., Lamed, R., and White, B. A. (2008). Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nature Reviews Microbiology*, 6(2), 121-131.
- Fossi, B. T., Ekabe, D. E., Toukam, L. L., Pambou, H. O. T., Gagneux-Brunon, A., Nguéfeu, C. N., and Bongue, B. (2022). Probiotic lactic acid bacteria isolated from traditional cameroonian palm wine and corn beer exhibiting cholesterol lowering activity. *Heliyon*, 8(11), 11708.
- Freire, A. L., Ramos, C. L., da Costa Souza, P. N., Cardoso, M. G. B., and Schwan, R. F. (2017). Nondairy beverage produced by controlled fermentation with potential probiotic starter cultures of *lactic acid* bacteria and yeast. *International Journal of Food Microbiology*, 248, 39-46.

- Fuentes-Zaragoza, E., Sánchez-Zapata, E., Sendra, E., Sayas, E., Navarro, C., Fernández-López, J., and Pérez-Alvarez, J. A. (2011). Resistant starch as prebiotic: A review. *Starch-Stärke*, 63(7), 406-415.
- Fuochi, V., Coniglio, M. A., Laghi, L., Rescifina, A., Caruso, M., Stivala, A., and Furneri, P. M. (2019). Metabolic characterization of supernatants produced by *Lactobacillus* spp. with in vitro anti-*Legionella* activity. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1403.
- Gao, J., Li, Y., Wan, Y., Hu, T., Liu, L., Yang, S., Gong, z., Zeng, Q., Wei, Y., Yang, W., Zeng, Z., He, X., Huang, S. H., and Cao, H. (2019). A novel postbiotic from *Lactobacillus rhamnosus* GG with a beneficial effect on intestinal barrier function. *Frontiers in Microbiology*, 10, 477.
- Geier, M. S., Butler, R. N., and Howarth, G. S. (2006). Probiotics, prebiotics and synbiotics: a role in chemoprevention for colorectal cancer? *Cancer Biology & Therapy*, 5(10), 1265-1269.
- Ghada, S. I., Manal, G. M., Mohsen, M. S. A., and Eman, A. G. (2012). Production and biological evaluation of exopolysaccharide from isolated *Rhodotorula glutinins*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(3), 401-408.
- Gibson, G. R., and Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*, 125(6), 1401-1412.
- Gibson, G. R., and Fuller, R. (2000). Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *The Journal of Nutrition*, 130(2), 391-395.
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Van Loo, J., Rastall, R. A., and Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17(2), 259-275.
- Gibson, G. R., Scott, K. P., Rastall, R. A., Tuohy, K. M., Hotchkiss, A., Dubert-Ferrandon, A., Gareau, M., Murphy, E. F., Saulnier, D., Loh, G., Macfarlane, S., Delzenne, N., Ringel, Y., Kozianowski, G., Dickmann, R., Wijnkoop, I. L., Walker, C., and Buddington, R. (2010). Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Sci. Technol. Bull. Funct. Foods*, 7(1), 1-19.
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., and Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14(8), 491-502.
- Gientka, I., Błażej, S., Stasiak-Róžańska, L., and Chlebowska-Śmigiel, A. (2015). Exopolysaccharides from yeast: insight into optimal conditions for biosynthesis, chemical composition and functional properties? review. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 14(4), 283-292.
- Gientka, I., Kieliszek, M., Jermacz, K., and Błażej, S. (2017). Identification and characterization of oleaginous yeast isolated from kefir and its ability to accumulate intracellular fats in deproteinated potato wastewater with different carbon sources. *BioMed Research International*, 2017, 6061042–6061019.

- Gil-Rodríguez, A. M., Carrascosa, A. V., and Requena, T. (2015). Yeasts in foods and beverages: In vitro characterisation of probiotic traits. *Food Science and Technology*, 64(2), 1156-1162.
- Goers, L., Freemont, P., and Polizzi, K. M. (2014). Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *Journal of the Royal Society Interface*, 11(96), 20140065.
- Gomaa, M., and Yousef, N. (2020). Optimization of production and intrinsic viscosity of an exopolysaccharide from a high yielding *Virgibacillus salarius* BM02: study of its potential antioxidant, emulsifying properties and application in the mixotrophic cultivation of *Spirulina platensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 149, 552-561.
- Gomez, M., Perez-Gallardo, R. V., Sanchez, L. A., Diaz-Perez, A. L., Cortes-Rojo, C., Meza Carmen, V., Saavedra-Molina, A., Lara-Romero, J., Jimenez-Sandoval, S., Rodriguez, F., Rodriguez-Zavala, J. S., and Campos-Garcia, J. (2014). Malfunctioning of the iron-sulfur cluster assembly machinery in *Saccharomyces cerevisiae* produces oxidative stress via an iron-dependent mechanism, causing dysfunction in respiratory complexes. *PLoS One*, 9(10), 111585.
- Gopal, P. K., Sullivan, P. A., and Smart, J. B. (2001). Utilisation of galacto-oligosaccharides as selective substrates for growth by *lactic acid* bacteria including *Bifidobacterium lactis* DR10 and *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *International Dairy Journal*, 11(1-2), 19-25.
- Gorbach, S. (2002). Probiotics in the third millennium. *Digestive and Liver Disease*, 34, S2-S7.
- Gouse, B. S., Muazzam, S. M., Gokul, S. S., and Ranjith, M. S. (2017). Isolation and characterization of actinomycetes from soil of ad-dawadmi, Saudi Arabia and screening their antibacterial activities. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutica Sciences*, 9(10), 267-279.
- Greppi, A., Krych, Ł., Costantini, A., Rantsiou, K., Hounhouigan, D. J., Arneborg, N., Cocolin, L., and Jespersen, L. (2015). Phytase-producing capacity of yeasts isolated from traditional African fermented food products and PHYPk gene expression of *Pichia kudriavzevii* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 205, 81-89.
- Greppi, A., Saubade, F., Botta, C., Humblot, C., Guyot, J. P., and Cocolin, L. (2017). Potential probiotic *Pichia kudriavzevii* strains and their ability to enhance folate content of traditional cereal-based African fermented food. *Food Microbiology*, 62, 169-177.
- Grigorova, D., Pavlova, K., and Panchev, I. (1999). Preparation and preliminary characterization of exopolysaccharides by yeast *Rhodotorula acheniorum* MC. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 81, 181-191.
- Gu, Y., Tian, J., Zhang, Y., Wu, J., and He, Y. (2022). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* cell-free supernatant on the physiology, quorum sensing, and protein synthesis of *lactic acid* bacteria. *LWT - Food Science and Technology*, 165, 113732.

- Guarner, F. (2005). Inulin and oligofructose: impact on intestinal diseases and disorders. *British Journal of Nutrition*, 93(1), 61-65.
- Gullón, B., Gómez, B., Martínez-Sabajanes, M., Yáñez, R., Parajó, J. C., and Alonso, J. L. (2013). Pectic oligosaccharides: Manufacture and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 30(2), 153-161.
- Gupta, A., and Sharma, N. (2017). Characterization of potential probiotic *lactic acid* bacteria-*Pediococcus acidilactici* Ch-2 isolated from Chuli-A traditional apricot product of Himalayan region for the production of novel bioactive compounds with special therapeutic properties. *Journal of Food: Microbiology, Safety and Hygiene*, 2(1), 1-11.
- Gupta, M., Bangotra, R., Sharma, S., Vaid, S., Kapoor, N., Dutt, H. C., and Bajaj, B. K. (2022). Bioprocess development for production of xylooligosaccharides prebiotics from sugarcane bagasse with high bioactivity potential. *Industrial Crops and Products*, 178, 114591.
- Gürgün, V. ve Halkman, A. K. (1990). *Mikrobiyolojide sayım yöntemleri* (2. Baskı). Gıda Teknolojisi Derneği, 7-20.
- Gurung, M., Li, Z., You, H., Rodrigues, R., Jump, D. B., Morgun, A., and Shulzhenko, N. (2020). Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology. *EBio Medicine*, 51, 102590.
- Gyawali, R., Nwamaioha, N., Fiagbor, R., Zimmerman, T., Newman, R. H., and Ibrahim, S. A. (2019). The role of prebiotics in disease prevention and health promotion. In *Dietary Interventions in Gastrointestinal Diseases*, 17, 251-261.
- Hamidi, M., Okoro, O. V., Ianiri, G., Jafari, H., Rashidi, K., Ghasemi, S., Castoria, R., Halmieri, D., Delattre, C., Pierre, G., Mirzaei, M., Nie, L., Samadian, H., and Shavandi, A. (in press). Exopolysaccharide from the yeast *Papiliotrema terrestris* PT22AV for skin wound healing. *Journal of Advanced Research*. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2022.06.012>
- Hartemink, R., Van Laere, K. M. J., and Rombouts, F. M. (1997). Growth of *enterobacteria* on fructo-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 83(3), 367-374.
- Harvey, R. A., and Ferrier, D. R. (2012). *Biochemistry (Lippincott's illustrated reviews series)* (5th Edition). Lippincott Williams & Wilkins, 526.
- Hatoum, R., Labrie, S., and Fliss, I. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Frontiers in Microbiology*, 3, 421.
- Hayduck, F. (1909). Über einen Hefengiftstoff in Hefe. *Wochenschr. Brau*, 26, 677-679.
- Hedin, C., Whelan, K., and Lindsay, J. O. (2007). Evidence for the use of probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: a review of clinical trials. *Proceedings of the Nutrition Society*, 66(3), 307-315.
- Helmy, E. A., Soliman, S. A., Abdel-Ghany, T. M., and Ganash, M. (2019). Evaluation of potentially probiotic attributes of certain dairy yeast isolated from buffalo sweetened Karish cheese. *Heliyon*, 5(5), 1649.

- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, R., Lumbsch, H. T., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D., J., Powell, M. J., Redhead, S., Schooch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., Vilgalys, R., and Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(5), 509-547.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., and Sanders, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506-514.
- Holmes, E., Li, J. V., Marchesi, J. R., and Nicholson, J. K. (2012). Gut microbiota composition and activity in relation to host metabolic phenotype and disease risk. *Cell Metabolism*, 16(5), 559-564.
- Hossain, M. N., Afrin, S., Humayun, S., Ahmed, M. M., and Saha, B. K. (2020). Identification and growth characterization of a novel strain of *Saccharomyces boulardii* isolated from soya paste. *Frontiers in Nutrition*, 7, 27.
- Hsu, C. Y., and Bansal, N. (2011). Measured GFR as “gold standard”—all that glitters is not gold? *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 6(8), 1813-1814.
- Hu, Y., Zhang, J., Yu, C., Li, Q., Dong, F., Wang, G., and Guo, Z. (2014). Synthesis, characterization, and antioxidant properties of novel inulin derivatives with amino-pyridine group. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 44-49.
- Huang, D., Ou, B., and Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Huang, Y., Kotula, L., and Adams, M. C. (2003). The in vivo assessment of safety and gastrointestinal survival of an orally administered novel probiotic, *Propionibacterium jensenii* 702, in a male Wistar rat model. *Food and Chemical Toxicology*, 41(12), 1781-1787.
- Huebner, J., Wehling, R. L., and Hutkins, R. W. (2007). Functional activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*, 17(7), 770-775.
- Humam, A. M., Loh, T. C., Foo, H. L., Izuddin, W. I., Zulkifli, I., Samsudin, A. A., and Mustapha, N. M. (2021). Supplementation of postbiotic RI11 improves antioxidant enzyme activity, upregulated gut barrier genes, and reduced cytokine, acute phase protein, and heat shock protein 70 gene expression levels in heat-stressed broilers. *Poultry Science*, 100(3), 100908.
- Hurst, C. J. (2016). *The Rasputin effect: when commensals and symbionts become parasitic* (Vol. 3). Switzerland: Springer, 27–64.
- Hussain, A., Zia, K. M., Tabasum, S., Noreen, A., Ali, M., Iqbal, R., and Zuber, M. (2017). Blends and composites of exopolysaccharides; properties and applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 10-27.

- Hutkins, R. W., Krumbeck, J. A., Bindels, L. B., Cani, P. D., Fahey Jr, G., Goh, Y. J., Hamaker, B., Martens, E. C., Mills, D. A., Rastal, R. A., Vaughan, E., and Sanders, M. E. (2016). Prebiotics: why definitions matter. *Current Opinion in Biotechnology*, 37, 1-7.
- Ichikawa, T., Hirata, C., Takei, M., Tagami, N., Murasawa, H., and Ikeda, R. (2017). Cell surface hydrophobicity and colony morphology of *Trichosporon asahii* clinical isolates. *Yeast*, 34(3), 129-137.
- Iliev, I., Ivanova, I., and Ignatova, C. (2006). Glucansucrases from lactic acid bacteria (LAB). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 20(3), 15-20.
- Internet: Food and Agriculture Organization (FAO), World Health Organization (WHO) (2001). Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live *lactic acid* bacteria. 1-4 October 2001, Córdoba, Argentina. Web: <https://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf>, Son Erişim Tarihi: 22.10.2022.
- Internet: Hello, My Name is *pichia kudriavzevii*. (2014). Eureka Brewing. Web: <https://eurekabrewing.wordpress.com/2014/02/16/hello-my-name-is-pichia-kudriavzevii/>, Son Erişim Tarihi: 12.0.2022.
- Ismail, B., & Nampoothiri, K. M. (2014). Molecular characterization of an exopolysaccharide from a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510 and its efficacy to improve the texture of starchy food. *Journal of Food Science and Technology*, 51, 4012-4018.
- Iwasaki, M., Akiba, Y., and Kaunitz, J. D. (2019). Duodenal chemosensing of short-chain fatty acids: Implications for GI diseases. *Current Gastroenterology Reports*, 21(35), 1-8.
- Jach, M., Los, R., Maj, M., and Malm, A. (2013). Probiotyki-aspekty funkcjonalne i technologiczne. *Postępy Mikrobiologii*, 52(2), 161–170.
- Jiang, X., Bai, J., Yuan, J., Zhang, H., Lu, G., Wang, Y., Jiang, L., Liu, B., Wang, L., Huang, D., and Feng, L. (2021). High efficiency biosynthesis of O-polysaccharide-based vaccines against extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Carbohydrate Polymers*, 255, 117475.
- Kadlec, R., and Jakubec, M. (2014). The effect of prebiotics on adherence of probiotics. *Journal of Dairy Science*, 97(4), 1983-1990.
- Kadyan, S., Rashmi, H. M., Pradhan, D., Kumari, A., Chaudhari, A., and Deshwal, G. K. (2021). Effect of *lactic acid* bacteria and yeast fermentation on antimicrobial, antioxidative and metabolomic profile of naturally carbonated probiotic whey drink. *Food Science and Technology*, 142, 111059.
- Kagimura, F. Y., da Cunha, M. A. A., Barbosa, A. M., Dekker, R. F., and Malfatti, C. R. M. (2015). Biological activities of derivatized d-glucans: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 588-598.

- Kalliomäki, M., Salminen, S., and Isolauri, E. (2008). Positive Interactions with the Microbiota: Probiotics. In G. B. Huffnagle and M. C. Noverr, (Eds.), *GI microbiota and regulation of the immune system. Advances in Experimental Medicine and Biology*, New York, NY: Springer, 57-66.
- Kalui, C. M., Mathara, J. M., Kutima, P. M., Kiiyukia, C., and Wongo, L. E. (2008). Partial characterisation and identification of *lactic acid* bacteria involved in production of ikii: a traditional fermented maize porridge by the Kamba in Kenya. *Journal of Tropical Microbiology and Biotechnology*, 4(1), 3-15.
- Kandasamy, S., Kavitate, D., and Shetty, P.H. (2018). *Lactic acid* bacteria and yeasts as starter cultures for fermented foods and their role in commercialization of fermented foods. In, S. Panda and P. Shetty, (Eds.), *Innovations in technologies for fermented food and beverage industries. Food microbiology and food safety*. Cham: Springer, 25-52.
- Kanmani, P., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukumar, V., and Arul, V. (2011). Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity *in vitro*. *Bioresource Technology*, 102(7), 4827-4833.
- Kaplan, H., and Hutkins, R. W. (2000). Fermentation of fructooligosaccharides by *lactic acid* bacteria and *Bifidobacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2682-2684.
- Kathade, S., Aswani, M., and Nirichan, B. (2020). Probiotic characterization and cholesterol assimilation ability of *Pichia kudriavzevii* isolated from the gut of the edible freshwater snail “*Pila globosa*”. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 24(7), 23-39.
- Kaur, I. P., Chopra, K., and Saini, A. (2002). Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(1), 1-9.
- Kaur, S., Thukral, S. K., Kaur, P., and Samota, M. K. (2021). Perturbations associated with hungry gut microbiome and postbiotic perspectives to strengthen the microbiome health. *Future Foods*, 4, 100043.
- Kavitate, D., Veerabhadrapa, B., Sudharshan, S. J., Kandasamy, S., Devi, P. B., Dyavaiah, M., and Shetty, P. H. (2022). Oxidative stress alleviating potential of galactan exopolysaccharide from *Weissella confusa* KR780676 in yeast model system. *Scientific Reports*, 12(1), 1089.
- Kelesidis, T., and Pothoulakis, C. (2012). Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 5(2), 111-125.
- Kharat, P. P., Yadav, S. R., Ragavan, M. L., and Das, N. (2018). Isolation and characterization of exopolysaccharides from yeast isolates. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 11(2), 537-542.
- Khodaii, Z., Ghaderian, S. M. H., and Natanzi, M. M. (2017). Probiotic bacteria and their supernatants protect enterocyte cell lines from enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) invasion. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 6(3), 183.

- Kim, N. N., Kim, W. J., and Kang, S. S. (2019). Anti-biofilm effect of crude bacteriocin derived from *Lactobacillus brevis* DF01 on *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Food Control*, 98, 274-280.
- Kim, Y., and Kim, S. H. (2009). Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379(2), 324-329.
- Kim, Y., Yu, H., Park, Y., Lee, N. and Paik, H. (2020). Anti-Biofilm activity of cell-free supernatant of *Saccharomyces cerevisiae* against *Staphylococcus aureus*. *Journal Microbiology Biotechnology*, 30(12), 1854–1861.
- Kim, Y. J., Yu, H. H., Song, Y. J., Park, Y. J., Lee, N. K., and Paik, H. D. (2021). Anti-biofilm effect of the cell-free supernatant of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* against *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 121, 107667.
- Kırmusaoğlu, S. (2019): "The methods for detection of biofilm and screening antibiofilm activity of agents". Book. Dol: 10.5772/intechopen.84411.
- Kırmusaoğlu, S. (2019). The methods for detection of biofilm and screening antibiofilm activity of agents. *Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods*, 7, 99-113.
- Kleessen, B., Hartmann, L., and Blaut, M. (2001). Oligofructose and long-chain inulin: influence on the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora. *British Journal of Nutrition*, 86(2), 291-300.
- Kocaoğlu, A. (2022). *Lactobacillus Rhamnosus ACS5 Bakterisinden Elde Edilen Ekzopolisakkaritlerin Prebiyotik ve Antibiyofilim Aktiviteleri*. Yüksek Lisans Tezi, Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 133.
- Kogani, G., Pajtinka, M., Babincova, M., Miadokova, E., Rauko, P., Slamenova, D., and Korolenko, T. A. (2008). Yeast cell wall polysaccharides as antioxidants and antimutagens: Can they fight cancer? Minireview. *Neoplasma*, 55(5), 387-393.
- Koirala, S., and Anal, A. K. (2021). Probiotics-based foods and beverages as future foods and their overall safety and regulatory claims. *Future Foods*, 3, 100013.
- Koohestani, M., Moradi, M., Tajik, H. and Badali, A. (2018). Effects of cell-free supernatant of *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Lactobacillus casei* 431 against planktonic form and biofilm of *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Research Forum*, 9(4), 301-306.
- Korakli, M., Gänzle, M. G., and Vogel, R. F. (2002). Metabolism by *bifidobacteria* and *lactic acid* bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 92(5), 958-965.
- Kosin, B., and Rakshit, S. K. (2006). Microbial and processing criteria for production of probiotics: a review. *Food Technology and Biotechnology*, 44(3), 371-379.

- Kothari, D., Tingirikari, J. M. R., and Goyal, A. (2015). In vitro analysis of dextran from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1426 for functional food application. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 6(2), 55-61.
- Kourelis, A., Kotzamanidis, C., Litopoulou-Tzanetaki, E., Scouras, Z. G., Tzanetakis, N., and Yiangou, M. (2010). Preliminary probiotic selection of dairy and human yeast strains. *Journal of Biological Research*, 13, 93-104.
- Krasowska, A., Kubik, A., Prescha, A., and Lukaszewicz, M. (2007). Assimilation of omega 3 and omega 6 fatty acids and removing of cholesterol from environment by *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii* strains. *Journal of Biotechnology*, 131(1), 211-241.
- Krasowska A. and Sigler K. (2014): "How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs"? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4, 112.
- Kum, C., and Sekkin, S. (2012). Alternative approaches to antibiotics. *Turkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences*, 3(3), 84-116.
- Kumar, A. S., and Mody, K. (2009). Microbial exopolysaccharides: variety and potential applications. *Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors: Applications and Perspectives*, 1, 229-253.
- Kumar, M., Nagpal, R., Kumar, R., Hemalatha, R., Verma, V., Kumar, A., Chakraborty, C., Singh, B., Marotta, F., Jain, S., and Yadav, H. (2012). Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Experimental Diabetes Research*, 2012, 1-14.
- Kumar, R., Grover, S., and Batish, V. K. (2012). Bile salt hydrolase (BSH) activity screening of *Lactobacilli*: in vitro selection of indigenous *Lactobacillus* strains with potential bile salt hydrolysing and cholesterol-lowering ability. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4, 162-172.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., and Boekhout, T. (2011a). "Definition, classification and nomenclature of the yeasts. (5th Edition). In C. P. Kurtzman, J. W. Fell, and T. Boekhout (Eds.). *The yeasts a taxonomic study*. Amsterdam: Elsevier Science, 3–9.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., and Boekhout, T. (2011b). *The yeasts: a taxonomic study*. Books. 5th Edition, 2354
- Lamsal, B. P. (2012). Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(10), 2020-2028.
- Lata, P., Kumari, R., Sharma, K., Rangra, S., and Savitri, A. (2022). In vitro evaluation of probiotic potential and enzymatic profiling of *Pichia kudriavzevii* Y33 isolated from traditional home-made mango pickle. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20, 132.
- Lavová, B. and Urminská, D. (2013). Total antioxidant activity of yeast *saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Microbiology Biotechnology Food Sciences*, 2(1), 1927-1933.

- Ledezma, O. E. V., Méndez, H. I. P., Manjarrez, L. A. M., Cano, E. T. Q., Alvarez, N. M., and López-Luna, A. (2016). Characterization of extracellular polymeric substances (EPS) produced by marine *Micromonospora* sp. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(7), 442-451.
- Lee, J. Y., Kim, Y., Kim, J. I., Lee, H. Y., Moon, G. S., and Kang, C. H. (2022). Improvements in human keratinocytes and antimicrobial effect mediated by cell-free supernatants derived from probiotics. *Fermentation*, 8(7), 332.
- Lemaire, M., Le Huërou-Luron, I., and Blat, S. (2018). Effects of infant formula composition on long-term metabolic health. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 9(6), 573-589.
- Letellier, A., Messier, S., Lessard, L., and Quessy, S. (2000). Assessment of various treatments to reduce carriage of *Salmonella* in swine. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 64(1), 27.
- Li, H., Huang, L., Zhang, Y., and Yan, Y. (2020). Production, characterization and immunomodulatory activity of an extracellular polysaccharide from *Rhodotorula mucilaginosa* YL-1 isolated from sea salt field. *Marine Drugs*, 18(12), 595.
- Li, S., Huang, R., Shah, N. P., Tao, X., Xiong, Y., and Wei, H. (2014). Antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides from *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 and *Lactobacillus plantarum* R315. *Journal of Dairy Science*, 97(12), 7334-7343.
- Li, W., Ji, J., Chen, X., Jiang, M., Rui, X., and Dong, M. (2014). Structural elucidation and antioxidant activities of exopolysaccharides from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. *Carbohydrate Polymers*, 102, 351-359.
- Li, W., Xia, X., Tang, W., Ji, J., Rui, X., Chen, X., Jiang, M., Zhou, J., Zhang, Q., and Dong, M. (2015). Structural characterization and anticancer activity of cell-bound exopolysaccharide from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(13), 3454-3463.
- Li, Y., Liu, Y., Cao, C., Zhu, X., Wang, C., Wu, R., and Wu, J. (2020). Extraction and biological activity of exopolysaccharide produced by *Leuconostoc mesenteroides* SN-8. *International Journal of Biological Macromolecules*, 157, 36-44.
- Liang, Y., Chen, J., Zuo, Y., Ma, K. Y., Jiang, Y., Huang, Y., and Chen, Z. Y. (2013). Blueberry anthocyanins at doses of 0.5 and 1% lowered plasma cholesterol by increasing fecal excretion of acidic and neutral sterols in hamsters fed a cholesterol-enriched diet. *European Journal of Nutrition*, 52, 869-875.
- Libudzisz, Z. (2002). Probiotics and prebiotics in fermented milks. *Pediatrics Współczesna*, 4(1), 19-25.
- Linares-Pasten, J. A., Aronsson, A., and Nordberg Karlsson, E. (2018). Structural considerations on the use of endo-xylanases for the production of prebiotic xylooligosaccharides from biomass. *Current Protein and Peptide Science*, 19(1), 48-67.

- Lindemann, B. (2018): "Biofilm treatment protocol: natural biofilm disruptors that work". The functional gut health clinical. Web: <https://bellalindemann.com/blog/biofilm-treatment-protocol-natural-biofilm-disruptors>,
- Liong, M. T., and Shah, N. P. (2005). Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *Journal of Dairy Science*, 88(1), 55-66.
- Liu, B. N., Liu, X. T., Liang, Z. H., and Wang, J. H. (2021). Gut microbiota in obesity. *World Journal of Gastroenterology*, 27(25), 3837–3850.
- Liu, C. F., and Pan, T. M. (2010). In vitro effects of *lactic acid* bacteria on cancer cell viability and antioxidant activity. *Journal of Food and Drug Analysis*, 18(2), 77–86.
- Llopis-Torregrosa, V., Vaz, C., Monteoliva, L., Ryman, K., Engstrom, Y., Gacser, A., Gil, C., Ljungdahl, P. O., and Sychrová, H. (2019). Trk1-mediated potassium uptake contributes to cell-surface properties and virulence of *Candida glabrata*. *Scientific Reports*, 9(7529), 1-11.
- Lohner, S., Küllenberg, D., Antes, G., Decsi, T., and Meerpohl, J. J. (2014). Prebiotics in healthy infants and children for prevention of acute infectious diseases: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition Reviews*, 72(8), 523-531.
- Lomax, A. R., and Calder, P. C. (2008). Prebiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence. *British Journal of nutrition*, 101(5), 633-658.
- Louis, P.; Flint, H. and Michel, C. (2016): "Microbiota of the human body: how to manipulate the microbiota". Prebiotics. pp. 119–142.
- Louis, P., Flint, H. J., and Michel, C. (2016). How to manipulate the microbiota: Prebiotics. In A. Schwartz, (Ed.), *Microbiota of the human body, Advances in experimental medicine and biology*, (vol 902). Cham: Springer, 119-142.
- Lucena, R. M., Dolz-Edo, L., Brul, S., de Morais Jr, M. A., and Smits, G. (2020). Extreme low cytosolic pH is a signal for cell survival in acid stressed yeast. *Genes*, 11(6), 656.
- Lynch, K. M., Zannini, E., Coffey, A., and Arendt, E. K. (2018). *Lactic acid* bacteria exopolysaccharides in foods and beverages: Isolation, properties, characterization, and health benefits. *Annual Review of Food Science and Technology*, 9, 155-176.
- Ma, C., Zhang, S., Lu, J., Zhang, C., Pang, X., and Lv, J. (2019). Screening for cholesterol-lowering probiotics from *lactic acid* bacteria isolated from corn silage based on three hypothesized pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2073.
- Ma, W., Chen, X., Wang, B., Lou, W., Chen, X., Hua, J., Sun, Y. J., Zhao, Y., and Peng, T. (2018). Characterization, antioxidativity, and anti-carcinoma activity of exopolysaccharide extract from *Rhodotorula mucilaginosa* CICC 33013. *Carbohydrate Polymers*, 181, 768-777.
- Macfarlane, S.; Macfarlane, G. and Cummings, J. (2006). Review Article: Prebiotics in the gastrointestinal tract. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 24(5), 701-714.

- Madhuri, K. V., and Prabhakar, K. V. (2014). Microbial exopolysaccharides: Biosynthesis and potential applications. *Oriental Journal of Chemistry*, 30(3), 1401.
- Madigan, M. T., Brender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., and Stahl, D. A. (2019). *Brock Biology of Microorganisms* (15th edition, Global edition). Şehir: Pearson, 86.
- Maihehubai, A. (2017). *Peynirlerden İzole Edilen Mayaların Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması*. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 124.
- Mainville, I., Arcand, Y., and Farnworth, E. R. (2005). A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 99(3), 287-296.
- Majee, S. B., Avlani, D., and Biswas, G. R. (2017). Rheological behavior and pharmaceutical applications of bacterial exopolysaccharides. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(9), 224-232.
- Malinen, E., Mättö, J., Salmitie, M., Alander, M., Saarela, M., and Palva, A. (2002). PCR-ELISA: II: analysis of *Bifidobacterium* populations in human faecal samples from a consumption trial with *Bifidobacterium lactis* Bb-12 and a galacto-oligosaccharide preparation. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(2), 249-258.
- Mandakovic, D., Cintolesi, Á., Maldonado, J., Mendoza, S. N., Aite, M., Gaete, A., Saitua, F., Allende, M., Cambiazo, V., Siegel, A., Maass, A., Gonzalez, M., and Latorre, M. (2020). Genome-scale metabolic models of *Microbacterium* species isolated from a high altitude desert environment. *Scientific Reports*, 10(5560), 1-13.
- Mandalari, G., Nueno-Palop, C., Bisignano, G., Wickham, M. S. J., and Narbad, A. (2008). Potential prebiotic properties of almond (*Amygdalus communis* L.) seeds. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(14), 4264-4270.
- Mani-López, E., Arriola-Bretón, D., and López-Malo, A. (2022). The impacts of antimicrobial and antifungal activity of cell-free supernatants from *lactic acid* bacteria in vitro and foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(1), 604-641.
- Marquina, D., Santos, A., and Peinado, J. (2002). Biology of killer yeasts. *International Microbiology*, 5, 65-71.
- Marotti, I., Bregola, V., Aloisio, I., Di Gioia, D., Bosi, S., Di Silvestro, R., Quinn, R., and Dinelli, G. (2012). Prebiotic effect of soluble fibres from modern and old durum-type wheat varieties on *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(10), 2133-2140.
- Marteau, P., and Seksik, P. (2004). Tolerance of probiotics and prebiotics. *Journal of clinical gastroenterology*, 38, 67-69.
- Masco, L., Huys, G., De Brandt, E., Temmerman, R., and Swings, J. (2005). Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain *Bifidobacteria*. *International Journal of Food Microbiology*, 102(2), 221-230.

- McFarland, L. V. (2015). From yaks to yogurt: the history, development, and current use of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 60(2), S85-S90.
- Merchán, A. V., Benito, M. J., Galván, A. I., and de Herrera, S. R. M. S. (2020). Identification and selection of yeast with functional properties for future application in soft paste cheese. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 124, 109-173.
- Mitchell, K. F., Zarnowski, R., Sanchez, H., Edward, J. A., Reinicke, E. L., Nett, J. E., Mitchell, A. P., Andes, D. R. (2015). Community participation in biofilm matrix assembly and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(13), 4092-4097.
- Mladenović, K. G., Grujović, M. Ž., Nikodijević, D., and Čomić, L. R. (2020). The hydrophobicity of enterobacteria and their co-aggregation with *Enterococcus faecalis* isolated from Serbian cheese. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 39(4), 227-233.
- Mohammedsaeed, W., McBain, A. J., Cruickshank, S. M., and O'Neill, C. A. (2014). *Lactobacillus rhamnosus* GG inhibits the toxic effects of *Staphylococcus aureus* on epidermal keratinocytes. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(18), 5773-5781.
- Mohr, A. E., Jäger, R., Carpenter, K. C., Kerksick, C. M., Purpura, M., Townsend, J. R., West, N. P., Black, K., Gleeson, M., Pyne, D. B., Wells, S. D., Arent, S. M., Kreider, Richard B., Campbell, B. I., Bannock, L., Scheiman, J., Wissent, C. J., Pane, M., Kalman, D. S., Pugh, J. N., Ortega-Santos, C. P., ter Haar, J. A., Arciero, P. J., and Antonio, J. (2020). The athletic gut microbiota. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 17(1), 17-24.
- Mojab, F., Kamalnezhad, M., Ghaderi, N., and Vahidi, P. H. (2003). Phytochemical screening of some species of Iranian plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2(2), 77-82.
- Mokoena, M. P. (2017). *Lactic acid* bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. *Molecules*, 22(8), 1255.
- Moradali, M. F., and Rehm, B. H. (2020). Bacterial biopolymers: from pathogenesis to advanced materials. *Nature Reviews Microbiology*, 18(4), 195-210.
- Moradi, M., Mardani, K., and Tajik, H. (2019). Characterization and application of postbiotics of *Lactobacillus spp.* on *Listeria monocytogenes in vitro* and in food models. *Food Science and Technology*, 111, 457-464.
- Moradi, M., Molaei, R., and Guimarães, J. T. (2021). A review on preparation and chemical analysis of postbiotics from *lactic acid* bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 143, 109722.
- Morales-Ferré, C., Azagra-Boronat, I., Massot-Cladera, M., Tims, S., Knipping, K., Garssen, J., Knol, J., Franch, A., Castell, M., and Rodríguez-Lagunas, M. J., and Perez-Cano, F. J. (2022). Effects of a postbiotic and prebiotic mixture on suckling rats' microbiota and immunity. *Nutrients*, 13(9), 2975.

- Moshfegh, A. J., Friday, J. E., Goldman, J. P., and Ahuja, J. K. C. (1999). Presence of inulin and oligofructose in the diets of Americans. *The Journal of Nutrition*, 129(7), 1407S-1411S.
- Moslehi-Jenabian, S., Pedersen, L. L., and Jespersen, L. (2010). Beneficial effects of probiotic and food borne yeasts on human health. *Nutrients*, 2(4), 449-473.
- Mubarak, H. M., and Amer, S. M. (2013). Purification and characterization of exopolysaccharides (EPS) extracted from *Saccharomyces cerevisiae*. *Egyptian Journal of Experimental Biology*, 9, 249-258.
- Nahar, S., Mizan, M. F. R., Ha, A. J. W., and Ha, S. D. (2018). Advances and future prospects of enzyme-based biofilm prevention approaches in the food industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(6), 1484-1502.
- Napisah, H., Siti Nuriah, M. S., Zarinah, Z., and Raja Arief Deli, R. N. (2022). Fermentation properties and potential prebiotic activity of HCl-breadfruit resistant starch type III by *Lactobacillus plantarum* ATCC 13649 and *L. brevis* ATCC 8287. *International Food Research Journal*, 29(1), 210-222.
- Navarro, D. M., Abelilla, J. J., and Stein, H. H. (2019). Structures and characteristics of carbohydrates in diets fed to pigs: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 10(39), 1-17.
- Nett, J. E., Sanchez, H., Cain, M. T., and Andes, D. R. (2010). Genetic basis of *Candida* biofilm resistance due to drug-sequestering matrix glucan. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(1), 171-175.
- Nishikawa, K., Fujimura, T., Ota, Y., Abe, T., ElRamlawy, K. G., Nakano, M., Takado, T., Uenishi, A., Kawazoe, H., Sekoguchi, Y., Tanaka, A., Ono, K., and Kawamoto, S. (2016). Exposure to positively-and negatively-charged plasma cluster ions impairs IgE-binding capacity of indoor cat and fungal allergens. *World Allergy Organization Journal*, 9(1), 1-7.
- Nobre, C., Gonçalves, D. A., Teixeira, J. A., and Rodrigues, L. R. (2018). One-step co-culture fermentation strategy to produce high-content fructo-oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 201, 31-38.
- Nowak, A., Paliwoda, A., and Błasiak, J. (2018). Anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-oxidative activity of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains: A review of mechanisms and therapeutic perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(21), 3456-3467.
- Nwanyanwu, C. E., Alisi, C. S., Nweke, C. O., and Orji, J. C. (2012). Cell surface properties of phenol-utilizing bacteria isolated from petroleum refinery wastewater. *Journal of Biological Research*, 2, 383-391.
- Nwodo, U. U., Green, E., and Okoh, A. I. (2012). Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 14002-14015.

- Oberoi, H. S., Babbar, N., Sandhu, S. K., Dhaliwal, S. S., Kaur, U., Chadha, B. S., and Bhargav, V. K. (2012). Ethanol production from alkali-treated rice straw via simultaneous saccharification and fermentation using newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(4), 557-566.
- O'Grady, J., O'Connor, E. M., and Shanahan, F. (2019). Dietary fibre in the era of microbiome science. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 49(5), 506-515.
- Ogunremi, O. R., Agrawal, R., and Sanni, A. I. (2015). Development of cereal-based functional food using cereal-mix substrate fermented with probiotic strain-*Pichia kudriavzevii* OG 32. *Food Science and Nutrition*, 3(6), 486-494.
- Ogunremi, O. R., Sanni, A. I., and Agrawal, R. (2015). Hypolipidaemic and antioxidant effects of functional cereal-mix produced with probiotic yeast in rats fed high cholesterol diet. *Journal of Functional Foods*, 17, 742-748.
- Ohtaki, S., Maeda, H., Takahashi, T., Yamagata, Y., Hasegawa, F., Gomi, K., Nakajima, T., and Abe, K. (2006). Novel hydrophobic surface binding protein, HsbA, produced by *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2407-2413.
- Ohvo-Rekilä, H., Ramstedt, B., Leppimäki, P., and Slotte, J. P. (2002). Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Progress in Lipid Research*, 41(1), 66-97.
- Okuda, K. I., Zendo, T., Sugimoto, S., Iwase, T., Tajima, A., Yamada, S., Sonomoto, K., and Mizunoe, Y. (2013). Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(11), 5572-5579.
- Oleńska, E., Małek, W., Kotowska, U., Wydrych, J., Polińska, W., Swiecicka, I., Thijs, S. and Vangronsveld, J. (2021). Exopolysaccharide carbohydrate structure and biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strains inhabiting nodules of trifolium repens growing on an old Zn-Pb-Cd-polluted waste heap area. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 2808.
- Oliveira, T., Ramalhosa, E., Nunes, L., Pereira, J. A., Colla, E., and Pereira, E. L. (2017). Probiotic potential of indigenous yeasts isolated during the fermentation of table olives from Northeast of Portugal. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 44, 167-172.
- Olle, B. (2013). Medicines from microbiota. *Nature Biotechnology*, 31(4), 309-315.
- Oniszczyk, A., Oniszczyk, T., Gancarz, M., and Szymańska, J. (2021). Role of gut microbiota, probiotics and prebiotics in the cardiovascular diseases. *Molecules*, 26(4), 1172.
- Ooi, T. S., Ting, A. S. Y., and Siow, L. F. (2019). Influence of selected native yeast starter cultures on the antioxidant activities, fermentation index and total soluble solids of Malaysia cocoa beans: A simulation study. *Food Science and Technology*, 122(108977), 234-241.

- Orrhage, K., and Nord, C. E. (2000). *Bifidobacteria* and *lactobacilli* in human health. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 26(3), 95-111.
- O'Shea, E. F., Cotter, P. D., Stanton, C., Ross, R. P., and Hill, C. (2012). Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. *International journal of Food Microbiology*, 152(3), 189-205.
- Osińska-Jaroszuk, M., Jaszek, M., Mizerska-Dudka, M., Błachowicz, A., Rejczak, T. P., Janusz, G., Wydrych, J., Polak, J., Jarosz-Wilkolazka, A., and Kandefer-Szerszeń, M. (2014). Exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum* as a promising bioactive compound with cytostatic and antibacterial properties. *BioMed Research International*, 2014(743812), 1-10.
- Pabst, O., and Mowat, A. M. (2012). Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunology*, 5(3), 232-239.
- Pacini, S., and Ruggiero, M. (2017). Description of a novel probiotic concept: Implications for the modulation of the immune system. *American Journal of Immunology*, 13(2), 107-113.
- Palade, C. M., Vulpoi, G. A., Vulpoi, R. A., Drug, V. L., Barboi, O. B., and Ciocoiu, M. (2022). The Biotics Family: Current Knowledge and Future Perspectives in Metabolic Diseases. *Life*, 12(8), 1263.
- Palma, M. L., Zamith-Miranda, D., Martins, F. S., Bozza, F. A., Nimrichter, L., Montero-Lomeli, M., Marques Jr, E. T. A., and Douradinha, B. (2015). Probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains as biotherapeutic tools: is there room for improvement? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 6563-6570.
- Pan, D. D., Zeng, X. Q., uze Yan, Y. T. (2011). Characterisation of *Lactobacillus fermentum* SM-7 isolated from koumiss, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(3), 512-518.
- Pandey, K. R., Naik, S. R., and Vakil, B. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 7577-7587.
- Park, H. J., Bae, J. H., Ko, H. J., Lee, S. H., Sung, B. H., Han, J. I., and Sohn, J. H. (2018). Low-pH production of d-lactic acid using newly isolated acid tolerant yeast *Pichia kudriavzevii* NG7. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(9), 2232-2242.
- Pavlova, K., Koleva, L., Kratchanova, M., and Panchev, I. (2004). Production and characterization of an exopolysaccharide by yeast. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 435-439.
- Paul, M. S., Aravind, U. K., Pramod, G., and Aravindakumar, C. T. (2013). Oxidative degradation of fensulfothion by hydroxyl radical in aqueous medium. *Chemosphere*, 91(3), 295-301.
- Pavlova, K., Panchev, I., Krachanova, M., and Gocheva, M. (2009). Production of an exopolysaccharide by Antarctic yeast. *Folia Microbiologica*, 54, 343-348.

- Peivasteh-Roudsari, L., Pirhadi, M., Karami, H., Tajdar-Oranj, B., Molaee-Aghaee, E., uze Sadighara, P. (2019). Probiotics and food safety: an evidence-based review. *Journal of Food Safety and Hygiene*, 5(1), 1-9.
- Pennacchia, C., Blaiotta, G., Pepe, O., and Villani, F. (2008). Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains from different food matrices and their preliminary selection for a potential use as probiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 105(6), 1919-1928.
- Peredo-Lovillo, A., Romero-Luna, H. E., and Jiménez-Fernández, M. (2020). Health promoting microbial metabolites produced by gut microbiota after prebiotics metabolism. *Food Research International*, 136, 109473.
- Pereira, G. V., Alvarez, J. P., Neto, D. P. D. C., Soccol, V. T., Tanobe, V. O., Rogez, H., Goes-Neto, A., and Soccol, C. R. (2017). Great intraspecies diversity of *Pichia kudriavzevii* in cocoa fermentation highlights the importance of yeast strain selection for flavor modulation of cocoa beans. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 84, 290-297.
- Plaza-Diaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M., and Gil, A. (2019). Mechanisms of action of probiotics. *Advances in Nutrition*, 10(1), 49-66.
- Plessas, S., Bekatorou, A., Gallanagh, J., Nigam, P., Koutinas, A. A., and Psarianos, C. (2008). Evolution of aroma volatiles during storage of sourdough breads made by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* or *Lactobacillus helveticus*. *Food Chemistry*, 107(2), 883-889.
- Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. F., and van Sinderen, D. (2011). Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes and Nutrition*, 6, 285-306.
- Possemiers, S., Marzorati, M., Verstraete, W., and Van de Wiele, T. (2010). Bacteria and chocolate: a successful combination for probiotic delivery. *International Journal of Food Microbiology*, 141(1-2), 97-103.
- Posteraro, B., Sanguinetti, M., Romano, L., Torelli, R., Novarese, L., and Fadda, G. (2005). Molecular tools for differentiating probiotic and clinical strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 103(3), 295-304.
- Psomas, E. I., Fletouris, D. J., Litopoulou-Tzanetaki, E., and Tzanetakis, N. (2003). Assimilation of cholesterol by yeast strains isolated from infant feces and Feta cheese. *Journal of Dairy Science*, 86(11), 3416-3422.
- Qvirist, L., Vorontsov, E., Veide Vilg, J., and Andlid, T. (2017). Strain improvement of *Pichia kudriavzevii* TY13 for raised phytase production and reduced phosphate repression. *Microbial Biotechnology*, 10(2), 341-353.
- Ragavan, M. L., and Das, N. (2017). Isolation and characterization of potential probiotic yeasts from different sources. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(4), 451-455
- Ragavan, M. L., and Das, N. (2019). Optimization of exopolysaccharide production by probiotic yeast *Lipomyces starkeyi* VIT-MN03 using response surface methodology and its applications. *Annals of Microbiology*, 69(5), 515-530.

- Raha, S., and Robinson, B. H. (2000). Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(10), 502-508.
- Rai, A. K., Pandey, A., and Sahoo, D. (2019). Biotechnological potential of yeasts in functional food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 83, 129-137.
- Ramirez, M. A. J. R., and Ramirez, L. V. (2015). Application of plackettburman screening design to enhance exopolysaccharide production from *Rhodotorula* yeast strains. *Journal of Society and Technology*, 5(1), 16-23.
- Ramirez-Farias, C., Slezak, K., Fuller, Z., Duncan, A., Holtrop, G., and Louis, P. (2008). Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *British Journal of Nutrition*, 101(4), 541-550.
- Ramos, L. S., Oliveira, S. S., Silva, L. N., Granato, M. Q., Gonçalves, D. S., Frases, S., Seabra, S. H., Macedo, A. J., Kneipp, L. F., Branquinha, M. H., and Santos, A. L. (2020). Surface, adhesiveness and virulence aspects of *Candida haemulonii* species complex. *Journal of Medical Mycology*, 58(7), 973-986.
- Rani, R. P., Anandharaj, M., and Ravindran, A. D. (2018). Characterization of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus gasseri* FR4 and demonstration of its in vitro biological properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 772-783.
- Rashad, M. M., Mahmoud, A. E., Abdou, H. M., and Nooman, M. U. (2011). Improvement of nutritional quality and antioxidant activities of yeast fermented soybean curd residue. *African Journal of Biotechnology*, 10(28), 5504-5513.
- Rendueles, O., Kaplan, J. B., and Ghigo, J. M. (2013). Antibiofilm polysaccharides. *Environmental Microbiology*, 15(2), 334-346.
- Renye Jr, J. A., White, A. K., and Hotchkiss Jr, A. T. (2021). Identification of *Lactobacillus* strains capable of fermenting fructo-oligosaccharides and inulin. *Microorganisms*, 9(10), 2020.
- Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M. J., Leotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N. M., Cani, P. D., Neyrinck, A. M., and Meheust, A. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, 104(2), 1-63.
- Robertson, J. A., Ryden, P., Botham, R. L., Reading, S., Gibson, G., and Ring, S. G. (2001). Structural properties of diet-derived polysaccharides and their influence on butyrate production during fermentation. *Food Science and Technology*, 34(8), 567-573.
- Rogers, P., and Clarke, F. M. (2007, 6–10 May). *Sustainable redox power from beer proteins*. In Proceedings of 31st International Congress of the European Brewery Convention, Venice, Italy.

- Romero-Luna, H. E., Hernández-Sánchez, H., Ribas-Aparicio, R. M., Cauich-Sánchez, P. I., and Dávila-Ortiz, G. (2019). Evaluation of the probiotic potential of *Saccharomyces cerevisiae* Strain (C41) isolated from Tibicos by in vitro studies. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11, 794-800.
- Rosenberg, M., Gutnick, D., and Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *Federation of European Microbiological Societies*, 9(1), 29-33.
- Roşu, C. M., Vochiţa, G., Mihăşan, M., Avădanei, M., Mihai, C. T., and Gherghel, D. (2019). Performances of *Pichia kudriavzevii* in decolorization, biodegradation, and detoxification of CI Basic Blue 41 under optimized cultural conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(1), 431-445.
- Roupar, D., Gonzalez, A., Martins, J. T., Botelho, C. M., Teixeira, J. A., and Nobre, C. (2022). *Prebiotic potential of fructo-oligosaccharides produced by Aspergillus ibericus in a bacterial community representative of the gut microbiota*. Proceedings of the Bioiberoamerica —3rd Iberoamerican Congress on Biotechnology, Braga, Portugal, 148–149.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., and Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by *lactic acid* bacteria. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 163-171.
- Rubel, I. A., Pérez, E. E., Genovese, D. B., and Manrique, G. D. (2014). In vitro prebiotic activity of inulin-rich carbohydrates extracted from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers at different storage times by *Lactobacillus paracasei*. *Food Research International*, 62, 59-65.
- Rueda-Robles, A., Rodríguez-Lara, A., Meyers, M. S., Sáez-Lara, M. J., and Álvarez-Mercado, A. I. (2022). Effect of Probiotics on Host-Microbiota in Bacterial Infections. *Pathogens*, 11(9), 986.
- Rusinova-Videva, S., Pavlova, K., and Metcheva, R. (2009). Studies of Antarctic yeast isolates for exopolysaccharide synthesis. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23(1), 888-891.
- Rusinova-Videva, S., Pavlova, K., Panchev, I., Georgieva, K., and Kuncheva, M. (2010). Effect of different factors on biosynthesis of exopolysaccharide from Antarctic yeast. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24(1), 507-511.
- Rusinova-Videva, S., Pavlova, K., and Georgieva, K. (2011). Effect of different carbon sources on biosynthesis of exopolysaccharide from Antarctic strain *Cryptococcus laurentii* AL62. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 25(1), 80-84.
- Rusinova-Videva, S., Kambourova, M., Alipieva, K., Nachkova, S., and Simova, S. (2019). Metabolic profiling of Antarctic yeasts by proton nuclear magnetic resonance-based spectroscopy. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 12-19.
- Rycroft, C. E., Jones, M. R., Gibson, G. R., and Rastall, R. A. (2001). A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 91(5), 878-887.

- Saadat, Y. R., Khosroushahi, A. Y., and Gargari, B. P. (2019). A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the *lactic acid* bacteria exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 217, 79-89.
- Saber, A., Alipour, B., Faghfoori, Z., and Khosroushahi, A. Y. (2017). Secretion metabolites of dairy *Kluyveromyces marxianus* AS41 isolated as probiotic, induces apoptosis in different human cancer cell lines and exhibit anti-pathogenic effects. *Journal of Functional Foods*, 34, 408-421.
- Sadeghi, A., Ebrahimi, M., Shahryari, S., Kharazmi, M. S., and Jafari, S. M. (2022). Food applications of probiotic yeasts; focusing on their techno-functional, postbiotic and protective capabilities. *Trends in Food Science & Technology*, 128, 278–295.
- Sağlam, H., and Karahan, A. G. (2017). *Laktik asit* bakterilerinin plazmidleri ve bunların özellikleri. *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10(2), 252-285.
- Saidi, N., Owlia, P., Marashi, S. M. A., and Sadari, H. (2019). Inhibitory effect of probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* on biofilm formation and expression of α -hemolysin and enterotoxin a genes of *Staphylococcus aureus*. *Iranian Journal of Microbiology*, 11(3), 246–254.
- Salazar, N., Prieto, A., Leal, J. A., Mayo, B., Bada-Gancedo, J. C., de Los Reyes-Gavilán, C. G., and Ruas-Madiedo, P. (2009). Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains of human origin, and metabolic activity of the producing bacteria in milk. *Journal of Dairy Science*, 92(9), 4158-4168.
- Salazar, N., Gueimonde, M., De Los Reyes-Gavilán, C. G., and 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.
- Salimi, F. and Imanparast, S. (2022). Characterization of probiotic *Pichia* sp. DU2-derived exopolysaccharide with oil-in-water emulsifying and anti-biofilm activities. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 42(5), 695-699.
- Salminen, S., Stahl, B., Vinderola, G., and Szajewska, H. (2020). Infant formula supplemented with biotics: current knowledge and future perspectives. *Nutrients*, 12(7), 1952.
- Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M., Sanders, M. E., Shamir, R., Swann, J. R., Szajewska, H., and Vinderola, G. (2021). The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(9), 649-667.
- Salmon, T. B., Evert, B. A., Song, B., and Doetsch, P. W. (2004). Biological consequences of oxidative stress-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 32(12), 3712-3723.
- Sanalibaba, P., and Çakmak, G. A. (2016). Exopolysaccharides production by *lactic acid* bacteria. *Appli Micro Open Access*, 2(2), 1-5.

- Sandasi, M., Leonard, C. M., and Viljoen, A. M. (2010). The in vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 50(1), 30-35.
- Şanlıdere Aloğlu, H., Demir Özer, E., and Öner, Z. (2016). Assimilation of cholesterol and probiotic characterisation of yeast strains isolated from raw milk and fermented foods. *International Journal of Dairy Technology*, 69(1), 63-70.
- Sanz, M. L., Gibson, G. R., and Rastall, R. A. (2005). Influence of disaccharide structure on prebiotic selectivity in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(13), 5192-5199.
- Sarikaya, H., Aslim, B., and Yuksekdog, Z. (2017). Assessment of anti-biofilm activity and bifidogenic growth stimulator (BGS) effect of lyophilized exopolysaccharides (l-EPSs) from *Lactobacilli* strains. *International Journal of Food Properties*, 20(2), 362-371.
- Sasikumar, K., Vaikkath, D. K., Devendra, L., and Nampoothiri, K. M. (2017). An exopolysaccharide (EPS) from a *Lactobacillus plantarum* BR2 with potential benefits for making functional foods. *Bioresource Technology*, 241, 1152-1156.
- Sayem, S. M., Manzo, E., Ciavatta, L., Tramice, A., Cordone, A., Zanfardino, A., de Felice, M., and Varcamonti, M. (2011). Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. *Microbial Cell Factories*, 10(74), 1-12.
- Scevola, D., Perversi, L., Cavanna, C., Candiani, C., Uberti, F., Castiglioni, B., and Marone, P. (2003). Acid tolerance and fecal recovery following oral administration of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemotherapy*, 15(2), 143-147.
- Schaafsma, G. (2008). Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal*, 18(5), 458-465.
- Schmid, J., Sieber, V., and Rehm, B. (2015). Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Frontiers in Microbiology*, 6, 496.
- Scholz-Ahrens, K. E., and Schrezenmeir, J. (2007). Inulin and oligofructose and mineral metabolism: the evidence from animal trials. *The Journal of Nutrition*, 137(11), 2513-2523.
- Schrezenmeir, J., and de Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 361-364.
- Seveiri, R. M., Hamidi, M., Delattre, C., Sedighian, H., Pierre, G., Rahmani, B., Darzi, S., Brasselet, C., Karimitabar, F., Razaghpour, A. and Amani, J. (2020). Characterization and prospective applications of the exopolysaccharides produced by *Rhodospiridium babjevae*. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 10(2), 254-263.
- Shah, B. R., Li, B., Al Sabbah, H., Xu, W., and Mráz, J. (2020). Effects of prebiotic dietary fibers and probiotics on human health: With special focus on recent advancement in their encapsulated formulations. *Trends in Food Science & Technology*, 102, 178-192.

- Shamekhi, S., Abdolalizadeh, J., Ostadrahimi, A., Mohammadi, S. A., Barzegari, A., Lotfi, H., Bonabi, E., and Zarghami, N. (2019). Apoptotic Effect of *Saccharomyces cerevisiae* on human colon cancer SW480 cells by regulation of Akt/NF- κ B signaling pathway. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12, 311-319.
- Shang, H. M., Zhou, H. Z., Yang, J. Y., Li, R., Song, H., and Wu, H. X. (2018). In vitro and in vivo antioxidant activities of inulin. *PloS one*, 13(2), 0192273.
- Sharifi-Rad, J., Rodrigues, C. F., Stojanović-Radić, Z., Dimitrijević, M., Aleksić, A., Neffe-Skocińska, K., Zielinska, D., Kolożyn-Krajewska, D., Salehi, B., Prabu, S. M., Schutz, F., Docea, A. O., Martins, N., and Calina, D. (2020). Probiotics: versatile bioactive components in promoting human health. *Medicina*, 56(9), 433.
- Sharma, S., Kandasamy, S., Kavitha, D., and Shetty, P. H. (2018). Probiotic characterization and antioxidant properties of *Weissella confusa* KR780676, isolated from an Indian fermented food. *Food Science and Technology*, 97, 53-60.
- Shehata, M. G., El Sohaimy, S. A., El-Sahn, M. A., and Youssef, M. M. (2016). Screening of isolated potential probiotic *lactic acid* bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(1), 65-75.
- Shehata, M. G., El-Sahn, M. A., El Sohaimy, S. A., and Youssef, M. M. (2019). Role and mechanisms lowering cholesterol by dietary of probiotics and prebiotics: a review. *Journal of Applied Sciences*, 19(8), 737-746.
- Shi, Y., Davis, K. J., Zhang, F., Duffy, C. J., and Yu, X. (2014). Parameter estimation of a physically based land surface hydrologic model using the ensemble Kalman filter: A synthetic experiment. *Water Resources Research*, 50(1), 706-724.
- Shruthi, B., Deepa, N., Somashekaraiah, R., Adithi, G., Divyashree, S., and Sreenivasa, M. Y. (2022). Exploring biotechnological and functional characteristics of probiotic yeasts: A review. *Biotechnology Reports*, 34, 716.
- Shukla, R., Shukla, S., Bivolarski, V., Iliev, I., Ivanova, I., and Goyal, A. (2011). Structural characterization of insoluble dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149 in the presence of maltose. *Food Technology and Biotechnology*, 49(3), 291-296.
- Silva, L. A., Lopes Neto, J. H. P., and Cardarelli, H. R. (2019). Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum*: technological properties, biological activity, and potential application in the food industry. *Annals of Microbiology*, 69, 321-328.
- Singh, R. P., Shukla, M. K., Mishra, A., Kumari, P., Reddy, C. R. K., and Jha, B. (2011). Isolation and characterization of exopolysaccharides from seaweed associated bacteria *Bacillus licheniformis*. *Carbohydrate Polymers*, 84(3), 1019-1026.
- Slavin, J. (2013). Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients*, 5(4), 1417-1435.
- Smid, E. J., and Lacroix, C. (2013). Microbe–microbe interactions in mixed culture food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(2), 148-154.

- Smith, I. M., Baker, A., Arneborg, N., and Jespersen, L. (2015). Non-Saccharomyces yeasts protect against epithelial cell barrier disruption induced by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium. *Letters in Applied Microbiology*, 61(5), 491-497.
- Smith, L. (2021). Postbiotics and their potential applications in early life nutrition and beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, 122, 2335.
- Smukowski Heil, C., Burton, J. N., Liachko, I., Friedrich, A., Hanson, N. A., Morris, C. L., Schacherer, J., Shendure, J., Thomas, J. H., and Dunham, M. J. (2018). Identification of a novel interspecific hybrid yeast from a metagenomic spontaneously inoculated beer sample using Hi-C. *Yeast*, 35(1), 71-84.
- Soccol, C. R., de Souza Vandenberghe, L. P., Spier, M. R., Medeiros, A. P., Yamaguishi, C. T., De Dea Lindner, J., Pandey, A., and Thomaz-Soccol, V. (2010). The potential of probiotics: a review. *Food Technology and Biotechnology*, 48(4), 413-434.
- Sornsenee, P., Chatatikun, M., Mitsuwan, W., Kongpol, K., Kooltheat, N., Sohbenalee, S., Pruksaphanrat, S., Mudpan, A., and Romyasamit, C. (2021). Lyophilized cell-free supernatants of *Lactobacillus* isolates exhibited antibiofilm, antioxidant, and reduces nitric oxide activity in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Peer Journal*, 9, 12586.
- Srinivas, B., Rani, G. S., Kumar, B. K., Chandrasekhar, B., Krishna, K. V., Devi, T. A., and Bhima, B. (2017). Evaluating the probiotic and therapeutic potentials of *Saccharomyces cerevisiae* strain (OBS2) isolated from fermented nectar of toddy palm. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 7(2), 1-14.
- Stanislaw, H., and Todorov, N. (1999). Calculation of signal detection theory measures. *Behavior Research Methods, Instruments, and Computers*, 31(1), 137-149.
- Stinson, L. F., Payne, M. S., and Keelan, J. A. (2017). Planting the seed: origins, composition, and postnatal health significance of the fetal gastrointestinal microbiota. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(3), 352-369.
- Suárez-Zamorano, N., Fabbiano, S., Chevalier, C., Stojanović, O., Colin, D. J., Stevanović, A., Veyrat-Durebex, C., Tarallo, V., Rigo, Germain, S., Ilievska, M., Montet, X., Seimbille, Y., Hapfelmeier, S., and Trajkovski, M. (2015). Microbiota depletion promotes browning of white adipose tissue and reduces obesity. *Nature Medicine*, 21(12), 1497-1501.
- Suchodolski, J., Muraszko, J., Korba, A., Bernat, P., and Krasowska, A. (2020). Lipid composition and cell surface hydrophobicity of *Candida albicans* influence the efficacy of fluconazole–gentamicin treatment. *Yeast*, 37(1), 117-129.
- Suez, J., Zmora, N., Zilberman-Schapira, G., Mor, U., Dori-Bachash, M., Bashiares, S., Zur, M., Regev-Lehavi, D., Brik, R. B. Z., Federici, S., Horn, M., Cohen, Y., Moor, A. E., Zeevi, D., Korem, T., Kotler, E., Harmelin, A., Itzkovitz, S., Maharshak, N., Shibolet, O., and Elinav, E. (2018). Post-antibiotic gut mucosal microbiome reconstitution is impaired by probiotics and improved by autologous FMT. *Cell*, 174(6), 1406-1423.

- Sun, Z., Harris, H. M., McCann, A., Guo, C., Argimón, S., Zhang, W., Yang, X., Jeffery, I. B., Cooney, J. C., Kagawa, T. F., Liu, W., Song, Y., Salvetti, E., Wrobel, A., Rasinkangas, P., Parkhill, J., Rea, M. C., O'Sullivan, O., Ritari, J., Douillard, F. P., Ross, P. R., Yang, R., Briner, A. E., Felis, G. E., de Vos, W. M., Barrangou, R., Klaenhammer, T. R., Caufield, P. W., Cui, Y., Zhang, H., and O'Toole, P. W. (2015). Expanding the biotechnology potential of *lactobacilli* through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nature communications*, 6(1), 8322.
- Sun, X., and Zhang, J. (2021). Bacterial exopolysaccharides: Chemical structures, gene clusters and genetic engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 173, 481-490.
- Suzuki, C., Ando, Y., and Machida, S. (2001). Interaction of SMKT, a killer toxin produced by *Pichia farinosa*, with the yeast cell membranes. *Yeast*, 18(16), 1471-1478.
- Swanson, K. S., Gibson, G. R., Hutkins, R., Reimer, R. A., Reid, G., Verbeke, K., Scott, K. P., Hoscher, H. D., Azad, M. B., Delzenne, N. M., and Sanders, M. E. (2020). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 17(11), 687-701.
- Szabó, C., Ischiropoulos, H., and Radi, R. (2007). Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(8), 662-680.
- Szlufman, C., and Shemesh, M. (2021). Role of probiotic bacilli in developing synbiotic food: Challenges and opportunities. *Frontiers in Microbiology*, 12, 638830.
- Tamang, J. P., Cotter, P. D., Endo, A., Han, N. S., Kort, R., Liu, S. Q., Mayo, B., Westerik, N., and Hutkins, R. (2020). Fermented foods in a global age: East meets West. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(1), 184-217.
- Tang, X. Z., Kumar, P., Alavi, S., and Sandeep, K. P. (2012). Recent advances in biopolymers and biopolymer-based nanocomposites for food packaging materials. *Critical reviews in food science and nutrition*, 52(5), 426-442.
- Tang, Y., Dai, X., Dong, B., Guo, Y., and Dai, L. (2020). Humification in extracellular polymeric substances (EPS) dominates methane release and EPS reconstruction during the sludge stabilization of high-solid anaerobic digestion. *Water Research*, 175, 115686.
- Thambiraj, S. R., Phillips, M., Koyyalamudi, S. R., and Reddy, N. (2018). Yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) polysaccharides: Antioxidant, immunomodulatory and prebiotic activities and their structural characterisation. *Food Chemistry*, 267, 319-328.
- Thilakarathna, W. W., Langille, M. G., and Rupasinghe, H. V. (2018). Polyphenol-based prebiotics and synbiotics: potential for cancer chemoprevention. *Current Opinion in Food Science*, 20, 51-57.
- Thorakkattu, P., Khanashyam, A. C., Shah, K., Babu, K. S., Mundanat, A. S., Deliephan, A., Deokar, G. S., Santivarangkna, C., and Nirmal, N. P. (2022). Postbiotics: current trends in food and pharmaceutical industry. *Foods*, 11(19), 3094.

- Thu, T. V., Loh, T. C., Foo, H. L., Yaakub, H., and Bejo, M. H. (2011). Effects of liquid metabolite combinations produced by *Lactobacillus plantarum* on growth performance, faeces characteristics, intestinal morphology and diarrhoea incidence in postweaning piglets. *Tropical Animal Health and Production*, 43, 69-75.
- Tomaro-Duchesneau, C., Jones, M. L., Shah, D., Jain, P., Saha, S., and Prakash, S. (2014). Cholesterol assimilation by *Lactobacillus* probiotic bacteria: an in vitro investigation. *BioMed Research International*, 2014, 380316.
- Topping, D. L., and Clifton, P. M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological reviews*, 81, 1031-1064.
- Toushik, S. H., Mizan, M. F. R., Hossain, M. I., and Ha, S. D. (2020). Fighting with old foes: The pledge of microbe-derived biological agents to defeat mono-and mixed-bacterial biofilms concerning food industries. *Trends in Food Science & Technology*, 99, 413-425.
- Tsai, C. C., Lin, P. P., Hsieh, Y. M., Zhang, Z. Y., Wu, H. C., and Huang, C. C. (2014). Cholesterol-lowering potentials of *lactic acid* bacteria based on bile-salt hydrolase activity and effect of potent strains on cholesterol metabolism in vitro and in vivo. *The Scientific World Journal*, 2014(690752), 1-10.
- Tsuda, H., Hara, K., and Miyamoto, T. (2008). Binding of mutagens to exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* mutant strain 301102S. *Journal of Dairy Science*, 91(8), 2960-2966.
- Tsuda, H., and Miyamoto, T. (2010). Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus plantarum* and the prebiotic activity of the exopolysaccharide. *Food Science and Technology Research*, 16(1), 87-92.
- Tsuda, H., Okuda, S., Haraguchi, T., and Kodama, K. (2019). Influence of exopolysaccharide on the growth of *lactic acid* bacteria. *Italian Journal of Food Science*, 31(2), 10-17.
- Tukenmez, U., Aktas, B., Aslim, B., and Yavuz, S. (2019). The relationship between the structural characteristics of *lactobacilli*-EPS and its ability to induce apoptosis in colon cancer cells in vitro. *Scientific Reports*, 9(1), 8268.
- Tzounis, X., Rodriguez-Mateos, A., Vulevic, J., Gibson, G. R., Kwik-Urbe, C., and Spencer, J. P. (2011). Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93(1), 62-72.
- Ural, S. ve Yüksekdağ, Z. (2020). *Lactobacillus cinsi* bakterilerinin farklı yöntemler ile antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi. *Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi*, 1(1-2), 13-21.
- Urdaneta, V., and Casadesús, J. (2017). Interactions between bacteria and bile salts in the gastrointestinal and hepatobiliary tracts. *Frontiers in Medicine*, 4, 163.
- Usui, T., Yamaoka, N., Matsuda, K., Tuzimura, K., Sugiyama, H., and Seto, S. (1973). ¹³C nuclear magnetic resonance spectra of glucobioses, glucotrioses, and glucans. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1, 2425-2432.

- Vagelas, I., Gougoulas, N., Nedesca, E. D., and Liviu, G. (2011). Bread contamination with fungus. *Carpathian Journal of Food Science and Technology*, 3(2), 1-6.
- Van Bogaert, I.N.A., De Maeseneire, S.L., and Vandamme, E.J. (2009). Extracellular polysaccharides produced by yeasts and yeast-like fungi. In T. Satyanarayana and G. Kunze, (Eds.), *Yeast biotechnology: Diversity and applications*. Dordrecht: Springer, 651-671.
- Van Calsteren, M. R., Pau-Roblot, C., Bégin, A., and Roy, D. (2002). Structure determination of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains RW-9595M and R. *Biochemical Journal*, 363(1), 7-17.
- Vandeputte, D., Falony, G., Vieira-Silva, S., Wang, J., Sailer, M., Theis, S., Verbeke, K., and Raes, J. (2017). Prebiotic inulin-type fructans induce specific changes in the human gut microbiota. *Gut*, 66(11), 1968-1974.
- Vargas-Ochoa, B., Mejía-Barajas, J., Clemente-Guerrero, M., Manzo-Avalos, S., Salgado-Garciglia, R., and Saavedra-Molina, A. (2016). Evaluation of antioxidant activity from different yeast extracts. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 30(1), 1174.22-1174.22.
- Vazquez-Rodriguez, A., Vasto-Anzaldo, X. G., Barboza Perez, D., Vázquez-Garza, E., Chapoy-Villanueva, H., García-Rivas, G., Ganza-Cervantes, J. A., Gomez-Lugo, J. J., Gomez-Lorendo, A. E., Garza Gonzalez, M. T., Zarate, X., and Morones-Ramirez, J. R. (2018). Microbial competition of *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L and *E. coli* increase biosynthesis of non-toxic exopolysaccharide with applications as a wide-spectrum antimicrobial. *Scientific Reports*, 8(1), 798.
- Veereman-Wauters, G. (2005). Application of prebiotics in infant foods. *British Journal of Nutrition*, 93(1), 57-60.
- Viljoen, B. C., and Greyling, T. (1995). Yeasts associated with Cheddar and Gouda making. *International Journal of Food Microbiology*, 28(1), 79-88.
- Viljoen, B. C. (2006). Yeast ecological interactions. A. Querol and G. Fleet (Eds.), *Yeast'yeast, yeast'bacteria, yeast'fungi interactions and yeasts as biocontrol agents: in yeasts in food and beverages*. Berlin: Springer, 83–110.
- Vinderola G, Burns P. (2021). The Biotics Family. Probiotics and prebiotics in foods. [DOI: 10.1016/b978-0-12-819662-5.00014-8]
- Vlasova, A. N., Kandasamy, S., Chattha, K. S., Rajashekara, G., and Saif, L. J. (2016). Comparison of probiotic *lactobacilli* and *bifidobacteria* effects, immune responses and rotavirus vaccines and infection in different host species. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 172, 72-84.
- Voidarou, C., Antoniadou, M., Rozos, G., Tzora, A., Skoufos, I., Varzakas, T., Lagiou, A., and Bezirtzoglou, E. (2020). Fermentative foods: Microbiology, biochemistry, potential human health benefits and public health issues. *Foods*, 10(1), 69.
- Vulevic, J., Rastall, R. A., and Gibson, G. R. (2004). Developing a quantitative approach for determining the in vitro prebiotic potential of dietary oligosaccharides. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 236(1), 153-159.

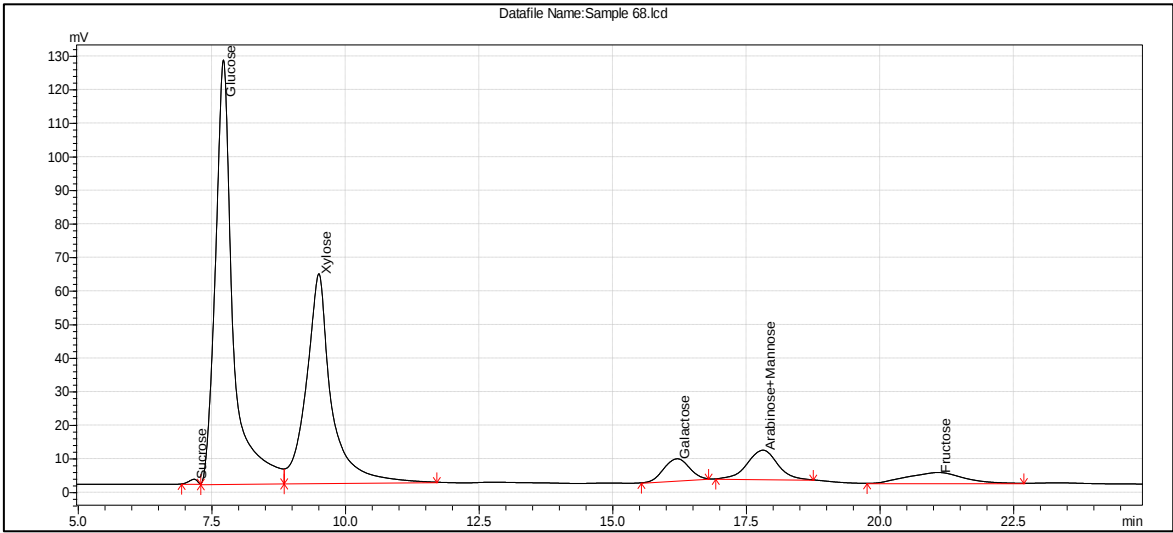
- Wagner, J. M., and Alper, H. S. (2016). Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: current tools and future advances. *Fungal Genetics and Biology*, 89, 126-136.
- Walencka, E., Wieckowska-Szakiel, M., Rozalska, S., Sadowska, B., and Rozalska, B. (2007). A surface-active agent from *Saccharomyces cerevisiae* influences *staphylococcal adhesion* and biofilm development. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 62(5-6), 433-438.
- Wang, J., Hu, S., Nie, S., Yu, Q. and Xie, M. (2016). Reviews on mechanisms of in vitro antioxidant activity of polysaccharides. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 64, 1–13
- Wang, J., Zhang, D., Sun, Y., Wang, S., Li, P., Gatlin III, D. M., and Zhang, L. (2016). Effect of a dairy-yeast prebiotic (G roBiotic®-A) on growth performance, body composition, antioxidant capacity and immune functions of juvenile starry flounder (*P latichthys stellatus*). *Aquaculture Research*, 47(2), 398-408.
- Wang, J., Zhao, X., Tian, Z., Yang, Y., and Yang, Z. (2015a). Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, 125, 16-25.
- Wang, K., Niu, M., Song, D., Song, X., Zhao, J., Wu, Y., Lu, B., and Niu, G. (2019). Preparation, partial characterization and biological activity of exopolysaccharides produced from *Lactobacillus fermentum* S1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 129(2), 206-214.
- Wang, X., Brown, I. L., Khaled, D., Mahoney, M. C., Evans, A. J., and Conway, P. L. (2002). Manipulation of colonic bacteria and volatile fatty acid production by dietary high amylose maize (amylomaize) starch granules. *Journal of Applied Microbiology*, 93(3), 390-397.
- Wang, Z., Zhuge, J., Fang, H., and Prior, B. A. (2001). Glycerol production by microbial fermentation: A review. *Biotechnology Advances*, 19(3), 201-223.
- Wang, Z., Zhao, Y., Jiang, Y., and Chu, W. (2021). Prebiotic, antioxidant, and immunomodulatory properties of acidic exopolysaccharide from marine *Rhodotorula* RY1801. *Frontiers in Nutrition*, 8, 710668.
- Watson, D., O'Connell Motherway, M., Schoterman, M. H. C., van Neerven, R. J., Nauta, A., and Van Sinderen, D. (2013). Selective carbohydrate utilization by *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Journal of Applied Microbiology*, 114(4), 1132-1146.
- Wegh, C. A., Geerlings, S. Y., Knol, J., Roeselers, G., and Belzer, C. (2019). Postbiotics and their potential applications in early life nutrition and beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4673.
- Westfall, S., and Pasinetti, G. M. (2019). The gut microbiota links dietary polyphenols with management of psychiatric mood disorders. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 1196.
- Wichienchot, S., Jatupornpipat, M., and Rastall, R. A. (2009). Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. *Food Chemistry*, 120(3), 850-857.

- Willems, J. L., and Low, N. H. (2012). Major carbohydrate, polyol, and oligosaccharide profiles of agave syrup. Application of this data to authenticity analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(35), 8745-8754.
- Wilson, B., and Whelan, K. (2017). Prebiotic inulin-type fructans and galacto-oligosaccharides: definition, specificity, function, and application in gastrointestinal disorders. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 32, 64-68.
- Wu, P. W. (2015). A review on the analysis of ingredients with health care effects in health food in Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(3), 343-350.
- Wulan, R., Astuti, R. I., Rukayadi, Y., and Meryandini, A. (2021). Evaluation of Indigenous *Pichia kudriavzevii* from cocoa fermentation for a probiotic candidate. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 22(3), 124-133.
- Xie, D., Jackson, E. N., and Zhu, Q. (2015). Sustainable source of omega-3 eicosapentaenoic acid from metabolically engineered *Yarrowia lipolytica*: from fundamental research to commercial production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(4), 1599-1610.
- Xie, J. H., Jin, M. L., Morris, G. A., Zha, X. Q., Chen, H. Q., Yi, Y., Li, J. E., Wang, Z. J., Gao, J., Nie, S. P., Shang, P., and Xie, M. Y. (2016). Advances on bioactive polysaccharides from medicinal plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(1), 60-84.
- Xie, Y., Zhang, H., Liu, H., Xiong, L., Gao, X., Jia, H., Lian, Z., Tong, N., and Han, T. (2015). Hypocholesterolemic effects of *Kluyveromyces marxianus* M3 isolated from Tibetan mushrooms on diet-induced hypercholesterolemia in rat. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 389-395.
- Xie, Z., Thompson, A., Sobue, T., Kashleva, H., Xu, H., Vasilakos, J., and Dongari-Bagtzoglou, A. (2012). *Candida albicans* biofilms do not trigger reactive oxygen species and evade neutrophil killing. *The Journal of Infectious Diseases*, 206(12), 1936-1945.
- Yadav, A. S., Kolluri, G., Gopi, M., Karthik, K., Malik, Y. S., and Dhama, K. (2016). Exploring alternatives to antibiotics as health promoting agents in poultry-a review. *Journal of Experimental Biology and Agriculture Sciences*, 4(3), 368-383.
- Yang, X., Li, L., Duan, Y., and Yang, X. (2017). Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* JM113 in vitro and its protective effect on broiler chickens challenged with deoxynivalenol. *Journal of Animal Science*, 95(2), 837-846.
- Yeo, S. K., Ooi, L. G., Lim, T. J., and Liong, M. T. (2009). Antihypertensive properties of plant-based prebiotics. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(8), 3517-3530.
- Yi, Y., Huang, W., and Ge, Y. (2008). Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(7), 1059-1065.
- Yıldıran, H., Başıyigit Kılıç, G., and Karahan Çakmakçı, A. G. (2019). Characterization and comparison of yeasts from different sources for some probiotic properties and exopolysaccharide production. *Food Science and Technology*, 39(2), 646-653.

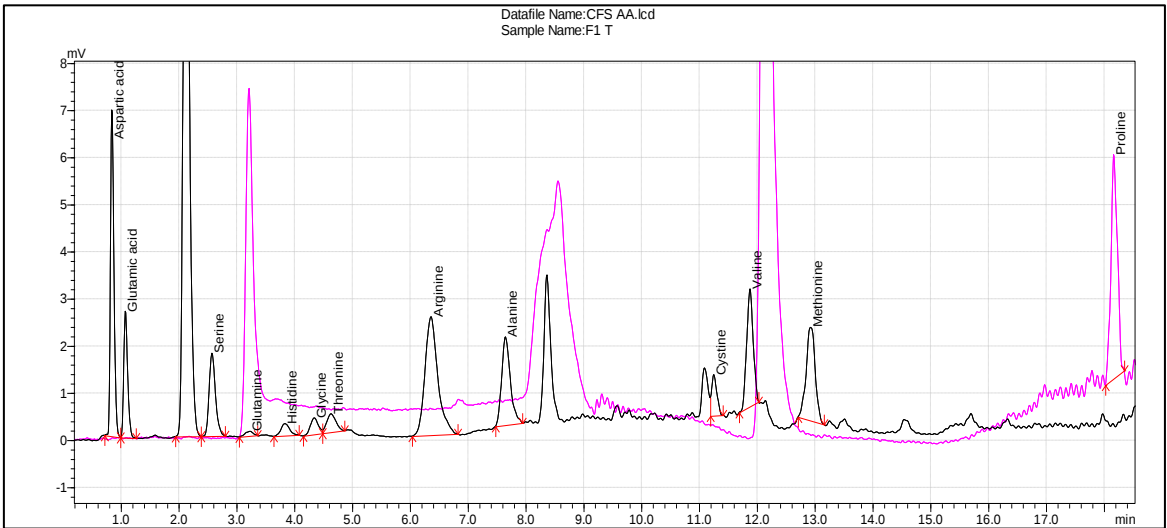
- Yıldız, G. G., Öztürk, M., and Aslım, B. (2011). Identification of *Lactobacillus* strains from breast-fed infant and investigation of their cholesterol-reducing effects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 2397-2406.
- Yin, J. Y., Nie, S. P., Zhou, C., Wan, Y., and Xie, M. Y. (2010). Chemical characteristics and antioxidant activities of polysaccharide purified from the seeds of *Plantago asiatica* L. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(2), 210-217.
- Yin, R., Kuo, H. C., Hudlikar, R., Sargsyan, D., Li, S., Wang, L., Wu, R., and Kong, A. N. (2019). Gut microbiota, dietary phytochemicals, and benefits to human health. *Current Pharmacology Reports*, 5, 332-344.
- Yoo, H. D., Kim, D. J., Paek, S. H., and Oh, S. E. (2012). Plant cell wall polysaccharides as potential resources for the development of novel prebiotics. *Biomolecules & Therapeutics*, 20(4), 371-379.
- Younis, K., Ahmad, S., and Jahan, K. (2015). Health benefits and application of prebiotics in foods. *Journal of Food Processing & Technology*, 6(4), 1-7.
- Zaman, S. A., and Sarbini, S. R. (2016). The potential of resistant starch as a prebiotic. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(3), 578-584.
- Zannini, E., Waters, D. M., Coffey, A., and Arendt, E. K. (2016). Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 1121-1135.
- Zarnowski, R., Westler, W. M., Lacmbouh, G. A., Marita, J. M., Bothe, J. R., Bernhardt, J., Sahraoui, A. L. H., Fontaine, J., Sanchez, H., Hatfield, R. D., Ntambi, J. M., Nett, J. E., Mitchell, A. P., and Andes, D. R. (2014). Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *MBio Journal*, 5(4), 1-13.
- Ze, X., Duncan, S. H., Louis, P., and Flint, H. J. (2012). *Ruminococcus bromii* is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. *International Society for Microbial Ecology*, 6(8), 1535-1543.
- Zhang, L., Liu, C., Li, D., Zhao, Y., Zhang, X., Zeng, X., Yang, Z., and Li, S. (2013). Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. *International Journal of Biological Macromolecules*, 54, 270-275.
- Zhu, Y., Wang, C., Jia, S., Wang, B., Zhou, K., Chen, S., Yang, Y., and Liu, S. (2018). Purification, characterization and antioxidant activity of the exopolysaccharide from *Weissella cibaria* SJ14 isolated from Sichuan paocai. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 820-828.
- Żółkiewicz, J., Marzec, A., Ruszczyński, M., and Feleszko, W. (2020). Postbiotics—a step beyond pre-and probiotics. *Nutrients*, 12(8), 2189.
- Žuntar, I., Petric, Z., Bursać Kovačević, D., and Putnik, P. (2020). Safety of probiotics: Functional fruit beverages and nutraceuticals. *Foods*, 9(7), 947.

EKLER

EK-1. EPS_{JD2}'lerin HPLC analiz sonuçları

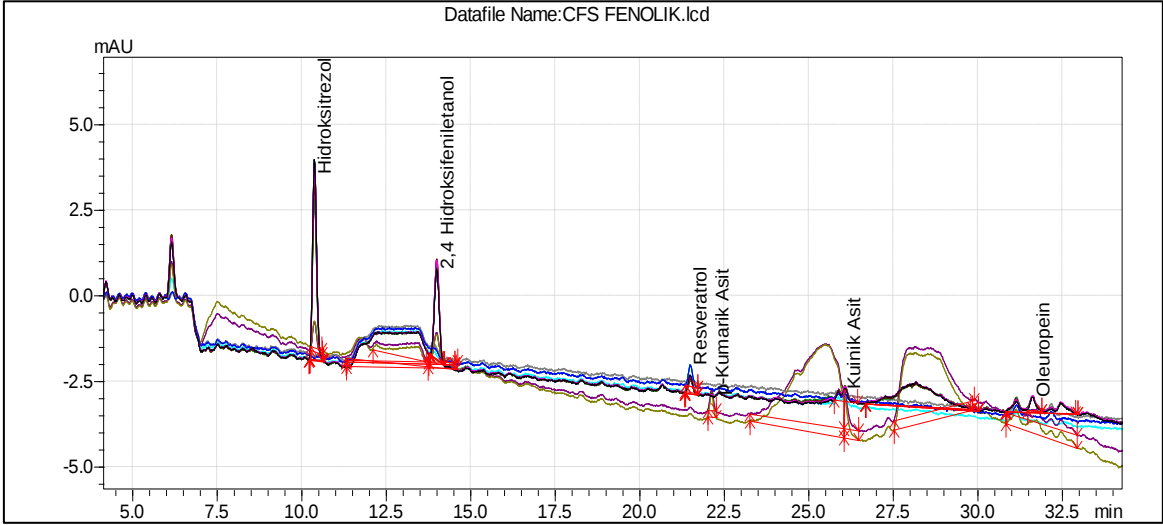


Şekil 1.1. şeker karışımlarının HPLC analizine ilişkin kromatogramları



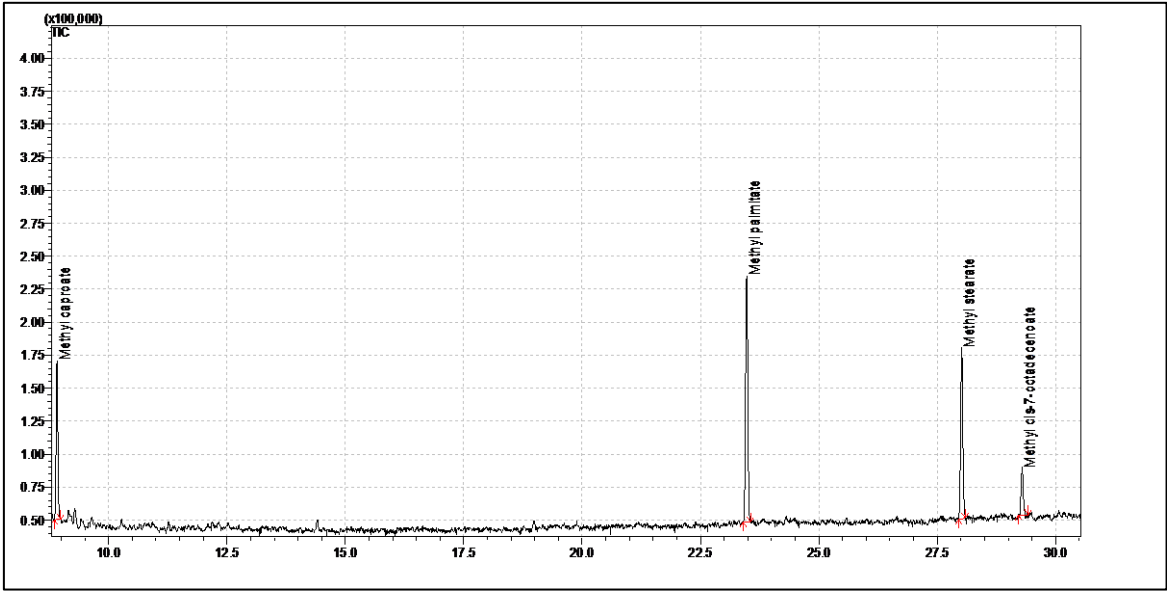
Şekil 1.2. Amino asit karışımlarının HPLC analizine ilişkin kromatogramları

EK-1. (devam) EPS_{JD2}’lerin HPLC analiz sonuçları



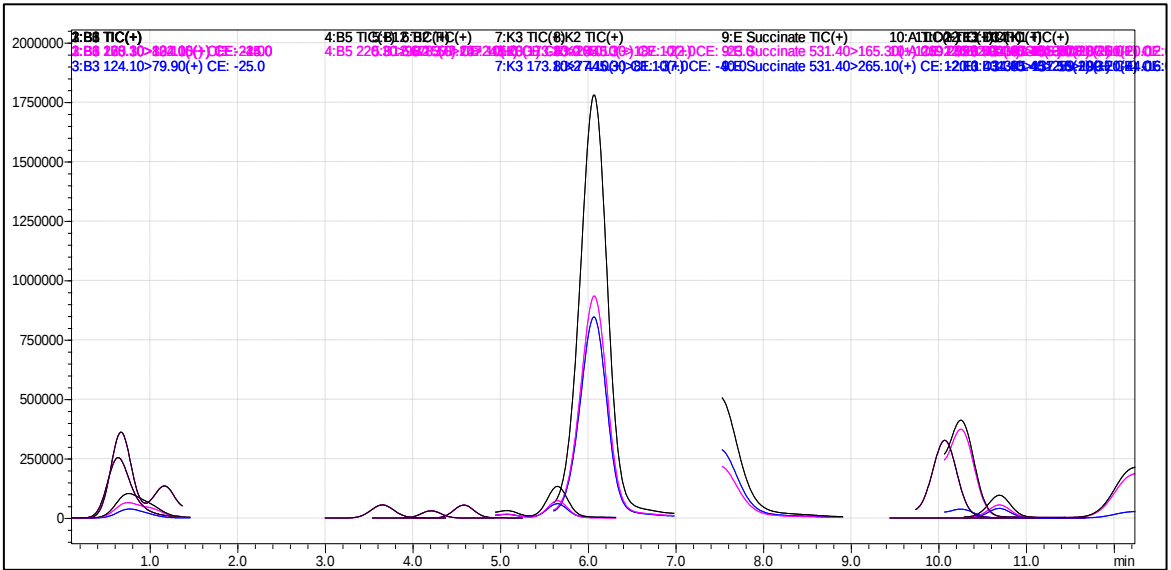
Şekil 1.3. Fenolik bileşikler karışımlarının HPLC analizine ilişkin kromatogramları

EK-2. EPS_{JD2}'lerin GC analiz sonuçları

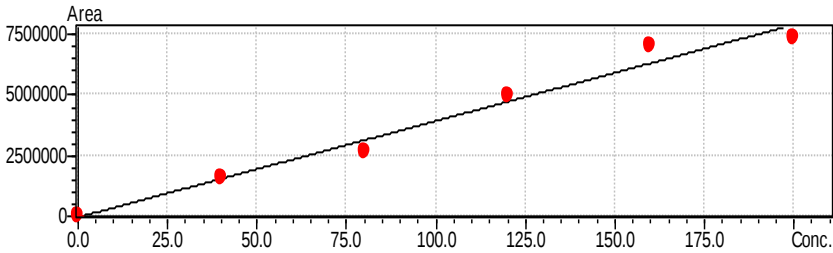


Şekil 2.1. Yağ asiti GCMS analizine

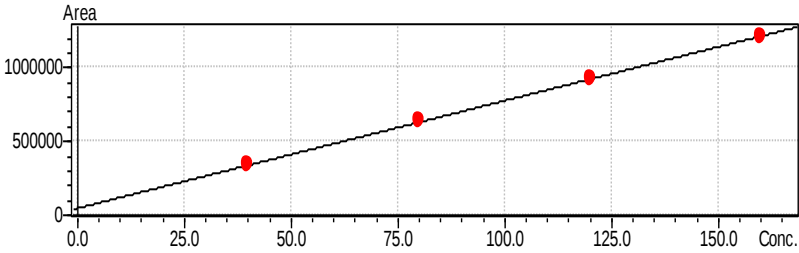
EK-3. EPS_{JD2}'lerin LC-MS MS, Tandem Kütle Spektrometrisi ile Sıvı Kromatografisi



Şekil 3.1. Vitamin spektroskopisi

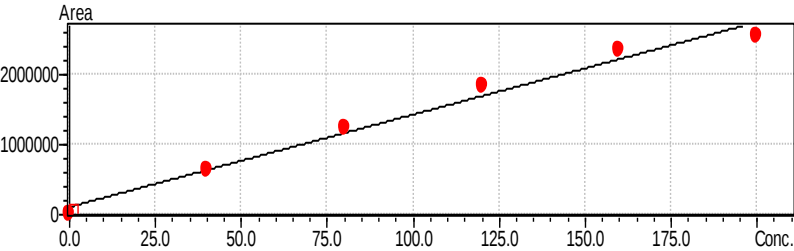


Şekil 3.2. Vitamin B1 spektroskopisi

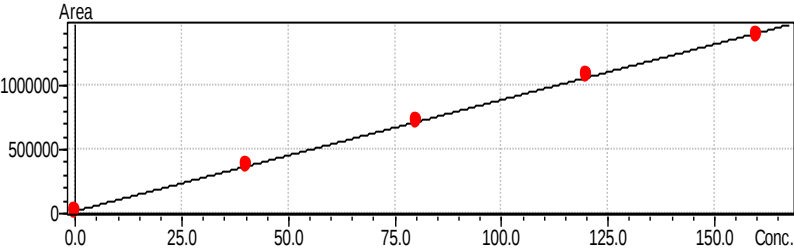


Şekil 3.3. Vitamin B2 spektroskopisi

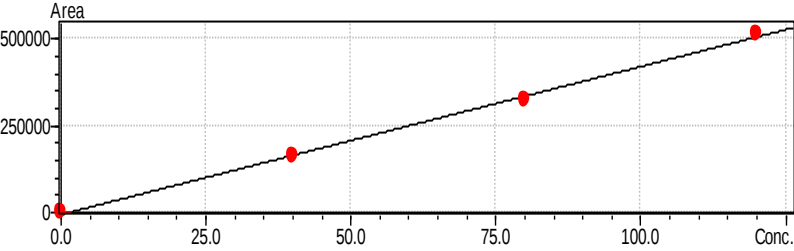
EK-3. (devam) EPS_{JD2}'lerin LC-MS MS, Tandem Kütle Spektrometrisi ile Sıvı Kromatografisi



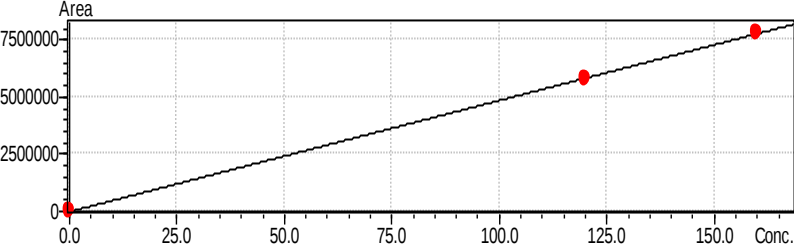
Şekil 3.4. Vitamin B3 spektroskopisi



Şekil 3.5. Vitamin B5 spektroskopisi

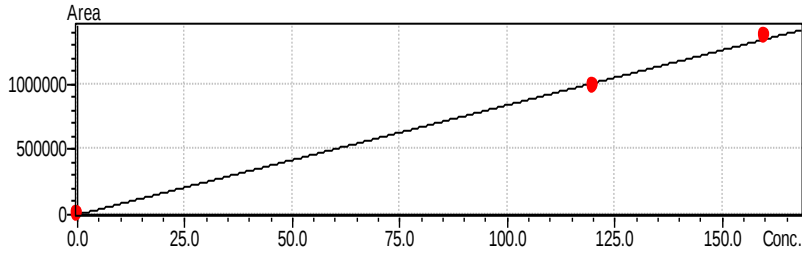


Şekil 3.6. Vitamin B12 spektroskopisi

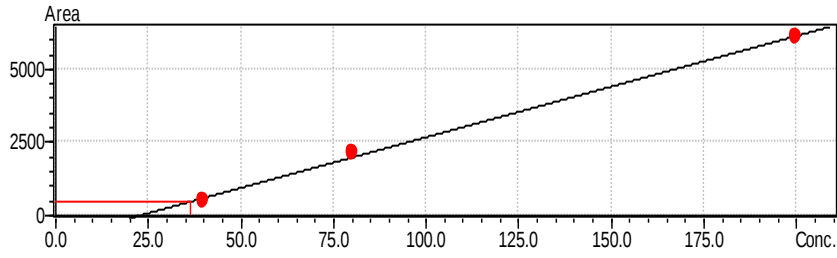


Şekil 3.7. Vitamin D2 spektroskopisi

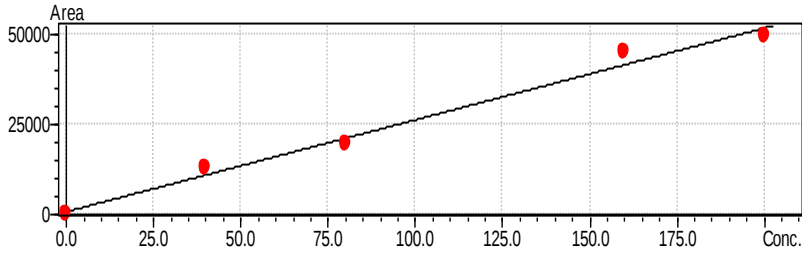
EK-3. (devam) EPS_{JD2}'lerin LC-MS MS, Tandem Kütle Spektrometrisi ile Sıvı Kromatografisi



Şekil 3.8. Vitamin D3 spektroskopisi

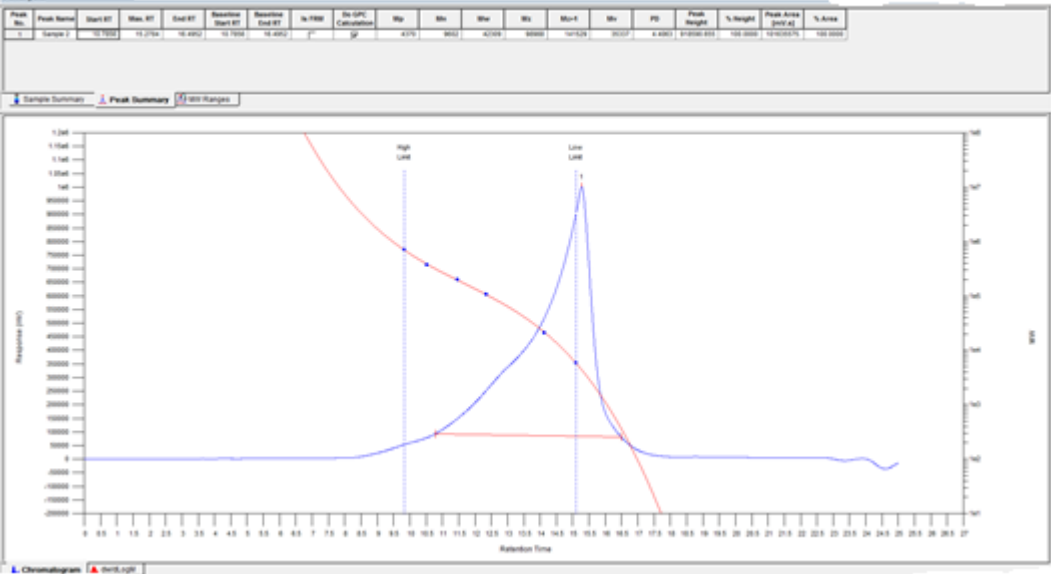


Şekil 3.9. Vitamin E1 spektroskopisi



Şekil 3.10. Vitamin K1 spektroskopisi

EK-4. EPS_{JD2}'lerin SEC analiz sonuçları



Şekil 4.1. SEC analizinde hazırlanan standarda ilişkin spektrumlar



Gazili olmak ayrıcalıktır