

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**TAPYOKA NİŞASTASI FERMANTASYONU İLE PROBİYOTİK BAKTERİYEL
METABOLİTLERİN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZEL KARADAĞ

TEZ DANIŐMANI
DOÇ. DR. SİNEM TUNÇER GURBANOV

İKİNCİ TEZ DANIŐMANI
DR. RAFİG GURBANOV

BİLECİK, 2021

10413903

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**TAPYOKA NİŞASTASI FERMANTASYONU İLE PROBİYOTİK BAKTERİYEL
METABOLİTLERİN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZEL KARADAĞ

TEZ DANIŐMANI
DOÇ. DR. SİNEM TUNÇER GURBANOV

İKİNCİ TEZ DANIŐMANI
DR. RAFİG GURBANOV

BİLECİK, 2021

10413903

BEYAN

‘Tapyoka Nişastası Fermantasyonu İle Probiyotik Bakteriyel Metabolitlerin Üretimi Ve Karakterizasyonu’’ adlı yüksek lisans tezimin hazırlık ve yazımı sırasında bilimsel araştırma ve etik kurallarına uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezin herhangi bir kısmının Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını, aksinin tespit edileceği muhtemel durumlarda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Bu çalışmanın, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP), TÜBİTAK veya benzeri kuruluşlarca desteklenmesi durumunda; projenin ve destekleyen kurumun adı proje numarası ile birlikte, ETİK KURUL onayı alınması durumunda ise ETİK KURUL tarih karar ve sayı bilgilerinin beyan edilmesi gerekmektedir.			
DESTEK ALINMIŞTIR	<input type="checkbox"/>	DESTEK ALINMAMIŞTIR	<input checked="" type="checkbox"/>
Destek alındı ise;			
Destekleyen kurum;			
Desteğin Türü		Proje Numarası	
1- BAP (Bilimsel Araştırma Projesi)			
2- TÜBİTAK			
Diğer;.....			
ETİK KURUL onayı var ise;			
ETİK KURUL karar tarih/sayı:	/.....	

Hazel Karadağ

Tarih

.....

İmza

.....

ÖN SÖZ

Tez çalışmam boyunca danışmanlığımı yürüten ve tez konumun belirlenmesinden çalışmanın sonuçlandırılmasına kadar değerli görüş ve önerilerini sunan, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yardımlarını ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, yoğun çalışmalarını sırasında sabır gösterdikleri için Dr. Rafiq GURBANOV ve Doç. Dr. Sinem TUNÇER GURBANOV'a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım boyunca bilgilerinden yararlandığım, desteklerini hiçbir şekilde esirgemeyen ve her koşulda yanımda olan Gülçin ÇETİN KILIÇASLAN ve Özge KAYGUSUZ'a sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmamda ve laboratuvar çalışmalarımda yanımda olup maddi manevi destek veren ve yalnız bırakmayan Sevinç KARAÇAM ve Gizem SAMGANE'e sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim de dahil olmak üzere hayatımın her anında maddi ve manevi destekleriyle yanımda olan çok kıymetli büyükbabam Rıza KARADAĞ, babam Hasan Hüseyin KARADAĞ, annem Pakize KARADAĞ, kardeşlerim Elif ve Zülal KARADAĞ'a sonsuz teşekkür ederim.

Yoğun tempolu bu süreçte desteklerini esirgemeyen, beni hiç yalnız bırakmayan, zor anlarımı paylaştığım, maddi ve manevi yanımda olan Gizem ERTEKİN, Şule Aybüke DİKİCİAŞIK, Gizem KUŞCU, Zeynep HAVABULUT ve Ayten KUMAŞ'a sonsuz teşekkür ederim.

Hazel KARADAĞ

2021

ÖZET

TAPYOKA NİŞASTASI FERMANTASYONU İLE PROBİYOTİK BAKTERİYEL METOBOLİTLERİN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

Postbiyotikler, enzimler, peptitler, teikoik asitler, peptidoglikan türevi muropeptitler, polisakkaritler, hücre yüzey proteinleri ve organik asitler gibi, canlı bakteriler tarafından üretilen ve salınan biyomolekülleri ifade eder. Son yıllarda canlı probiyotik mikroorganizmaların kullanıma alternatif olmak üzere “postbiyotik” olarak adlandırılan mikrobiyal türevli biyomoleküllerin kullanımı, oldukça ilgi çeken konulardandır. Bu tez çalışmasında, insan bağırsak mukozasına iyi kolonize olabilen baskın bir probiyotik bakteri olarak *Lactobacillus plantarum* tarafından üretilen postbiyotik ürünlerin biyoaktif özelliklerinin araştırılmış; doğal bir dirençli nişasta kaynağı olarak tapyoka nişastasının, bir prebiyotik olarak tek başına ve yağsız süt ile kombinasyon halinde *L. plantarum*'un probiyotik aktivitesini nasıl etkileyebileceği incelenmiştir. Sonuçlarımız, tapyoka nişastası ve yağsız sütün birlikte kullanımının, *L. plantarum* post-fermantasyon ortamının *Pseudomonas aeruginosa* ve *Klebsiella pneumonia* patojenleri üzerindeki anti-bakteriyel ve ayrıca kolon kanseri hücreleri üzerindeki anti-kanser etkinliklerini desteklediğini göstermektedir. Tez çalışmasında ayrıca tapyoka dirençli nişastası ve yağsız süt tozunun ayrı ayrı ve birlikte kullanımının, *L. plantarum* hücreli post-fermantasyon ortamının moleküler içeriğini nasıl değiştirdiği, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) kullanılarak belirlenmiş ve karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Diyet, mikrobiyota bileşiminin, çeşitliliğinin ve işlevinin ana itici güçlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Prebiyotik bileşenler içeren fonksiyonel gıdaların üretimi, gıda endüstrisinde baskın olma potansiyeline sahip, gelecek vaat eden bir pazardır. Bu açıdan bu tez çalışması, düşük maliyetli ve kolay erişilebilir gıda kaynakları ve doğal ve “temiz etiketli” gıda bileşenleri olarak dirençli nişasta kaynağı tapyoka nişastası ve yağsız süt tozu yoluyla *L. plantarum* postbiyotiklerinin biyofonksiyonelliğinin modüle edilebileceğinin gösterilmesi açısından önemlidir.

Anahtar Kelimeler: *Lactobacillus plantarum*, Prebiyotik, Probiyotik, Postbiyotik, Tapyoka Nişastası.

ABSTRACT

THE PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF PROBIOTIC BACTERIAL METABOLITES THROUGH TAPIOCA STARCH FERMENTATION

Postbiotics refer to biomolecules produced and released by living bacteria, such as enzymes, peptides, teichoic acids, peptidoglycan-derived muropeptides, polysaccharides, cell surface proteins, and organic acids. In recent years, the use of microbial-derived biomolecules, called "postbiotics", as an alternative to the use of live probiotic microorganisms, is one of the subjects of great interest. In this thesis, the bioactive properties of postbiotic products produced by *Lactobacillus plantarum*, as one of the dominant probiotic bacteria that can colonize the human intestinal mucosa, were investigated by focusing on how prebiotic tapioca starch, as a natural source of resistant starch, can affect the probiotic activity of *L. plantarum* when used alone and in combination with skim milk powder. Our results show that the combined use of tapioca starch and skim milk promotes the anti-bacterial effects of the *L. plantarum* post-fermentation medium on the pathogens *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumonia* as well as anti-cancer activities on colon cancer cells. In the thesis, the use of Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) technique allowed us to identify the molecular changes in the post-fermentation medium obtained from the *L. plantarum* grown in the presence of tapioca resistant starch or skim milk alone or in combination. Diet is recognized as one of the main drivers of microbiota composition, diversity, and function. The production of functional foods containing prebiotic ingredients is a promising market with the potential to dominate the food industry. In this aspect, this thesis is important in demonstrating that the biofunctionality of *L. plantarum* postbiotics can be modulated through low-cost and easily accessible food sources and natural and "clean label" food ingredients: tapioca resistant starch and skim milk powder.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, Prebiotic, Probiotic, Postbiotic, Tapioca Starch.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖN SÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1. Bağırsak Mikrobiyotası.....	3
2.1.1. Bağırsak Mikrobiyotasının Tanımı.....	3
2.1.2. Bağırsak Mikrobiyotasının Bileşimi ve Gelişimi.....	3
2.1.3. Bağırsak Mikrobiyotasının İşlevleri.....	5
2.1.4. Bağırsak Mikrobiyotasının Hastalıklar ile İlişkisi.....	7
2.2. Probiyotikler.....	11
2.2.1. Laktik Asit Bakterileri.....	13
2.3. Prebiyotikler.....	14
2.3.1. Dirençli Nişasta.....	14
2.4. Postbiyotikler.....	16
3. MATERYAL METOT.....	21
3.1. Besiyerinin Hazırlanması ve Bakteriyel Büyüme Koşulları.....	21
3.2. Büyüme Dinamiklerinin Belirlenmesi.....	22
3.3. Hücresiz Post-Fermentasyon Ortamın Elde Edilmesi.....	22
3.4. Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi.....	23
3.5. Antibiyofilm Aktivitenin Belirlenmesi.....	23

3.6. Hücre Kültürü, Muamelesi ve MTT Deneyleri.....	24
3.7. Hücresiz Post-Fermentasyon Ortamından Protein Çöktürme	25
3.8. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE).....	26
3.9. Western Blot.....	26
3.10. ATR-FTIR Spektroskopi Ölçümleri ve Veri Analizi	29
3.11. İstatistiksel Analiz.....	29
4. BULGULAR	30
4.1. Modifiye Tapyoka Nişastası ve Yağsız Süt Tozunun <i>Lactobacillus plantarum</i> Büyüme Dinamikleri Üzerindeki Etkisi	30
4.2. <i>Lactobacillus plantarum</i> Hücresiz Post-fermantasyon Ortamının <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ve <i>Klebsiella pneumoniae</i> Patojenlerine Karşı Antibakteriyel Etkisi.....	33
4.3. <i>Lactobacillus plantarum</i> Hücresiz Post-fermantasyon Ortamının <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Patojeninin Önceden Oluşturulmuş Biyofilmine Karşı Dağıtıcı Etkisinin Belirlenmesi.....	36
4.4. <i>Lactobacillus plantarum</i> Hücresiz Post-fermantasyon Ortamının Kolon Kanseri Hücreleri Üzerindeki Anti-kanser Etkisinin Belirlenmesi.....	38
4.5. <i>Lactobacillus plantarum</i> Hücresiz Post-fermantasyon Ortamının ATR-FTIR Spektroskopisi ile Tanımlanması	40
4.5.1. 1800-1700 cm ⁻¹ Spektral Bölgesinin Analizi	42
4.5.2. 1700-1500 cm ⁻¹ Spektral Bölgesinin Analizi	44
4.5.3. 1500-1300 cm ⁻¹ Spektral Bölgesinin Analizi	46
4.5.4. 800-650 cm ⁻¹ Spektral Bölgesinin Analizi	48
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	50
KAYNAKÇA	59

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2.1. İnsan Bağırsak Mikrobiyotasında Bulunan Ana Bakteriler	4
Tablo 3.1. Deneysel Koşullar	22
Tablo 3.2. BSA Standart Eğrisi için Seyreltme Şeması	28
Tablo 4.1. Yağsız Süt Tozu ve Modifiye Tapyoka Nişastası Varlığında Büyütülen <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un Koloni Oluşturan Birimleri (CFU'lar).....	32
Tablo 4.2. <i>Lactobacillus plantarum</i> Hücresiz Post-Fermantasyon Ortamına ait Başlıca Spektal Bant Bölgeleri ve Bantların Tanımları	41

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2. 1. Bağırsak Mikrobiyal Topluluklarının Sağlık Üzerindeki Etkisi.....	8
Şekil 2. 2. Probiyotiklerin Etki Mekanizmaları	12
Şekil 3. 1. BSA Standart Grafiği.....	28
Şekil 4. 1. Modifiye Tapyoka Nişastası ve Yağsız Süt Tozu Varlığında Büyütülen <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un Büyüme Dinamikleri.....	31
Şekil 4. 2. <i>Lactobacillus plantarum</i> Hüresiz Post-Fermantasyon Ortamının <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Üzerindeki Antibakteriyel Etkisinin Araştırılması.....	34
Şekil 4. 3. <i>Lactobacillus plantarum</i> Hüresiz Post-Fermantasyon Ortamının <i>Klebsiella pneumoniae</i> Üzerindeki Antibakteriyel Etkisinin Araştırılması..	35
Şekil 4. 4. <i>Lactobacillus plantarum</i> Hüresiz Post-Fermantasyon Ortamının <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın Biyofilmi Üzerindeki Dağıtıcı Etkisi.....	37
Şekil 4. 5. <i>Lactobacillus plantarum</i> Hüresiz Post-Fermantasyon Ortamının Anti-Kanser Potansiyeli.....	39
Şekil 4. 6. <i>Lactobacillus plantarum</i> Hüresiz Post-Fermantasyon Ortamına Ait 1800-1700 Cm-1 Bölgesinin A) İkincil Türevi Alınmış Ve Vektör-Normalize Edilmiş Ortalama Spektrumları Ve B) Spektral Bantların Mutlak Yoğunlukları.....	43
Şekil 4. 7. <i>Lactobacillus plantarum</i> Hüresiz Post-Fermantasyon Ortamına Ait 1700-1500 Cm-1 Bölgesinin A) İkincil Türevi Alınmış Ve Vektör-Normalize Edilmiş Ortalama Spektrumları Ve B) Spektral Bantların Mutlak Yoğunlukları..	45
Şekil 4. 8. <i>Lactobacillus plantarum</i> Hüresiz Post-Fermantasyon Ortamına Ait 1500-1300 Cm-1 Bölgesinin A) İkincil Türevi Alınmış Ve Vektör-Normalize Edilmiş Spektrumları Ve B) Spektral Bantların Mutlak Yoğunlukları.....	47
Şekil 4. 9. <i>Lactobacillus plantarum</i> Hüresiz Post-Fermantasyon Ortamına Ait 800-650 Cm-1 Bölgesinin A) İkincil Türevi Alınmış Ve Vektör-Normalize Edilmiş Spektrumları Ve B) Spektral Bantların Mutlak Yoğunlukları.....	49

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

%: Yüzde

AMP: Antimikrobiyal Proteinler

ATR: Attenuated Total Reflection (Zayıflatılmış Toplam Yansıma)

BS: Bakteriyel Selüloz

BSA: Bovin Serum Albumini

CFU: Colony Forming Units (Koloni Oluşturan Birimler)

CO₂: Karbondioksit

CRC: Colorectal Cancer (Kolorektal Kanser)

CV: Cyristal Violet

dH₂O: Distilled Water (Distile Su)

DN: Dirençli Nişasta

ECL: Enhanced Chemi Luminescence

EPS: Extracellular Polymeric Substances (Ekstraselular Polimerik Maddeler)

FOS: Fructo-Oligosaccharides (Frukto Oligosakkarit)

FTIR: Fourier Transform Infrared (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi)

g/L: Litre Başına Gram

G: Glikoz

GAPDH: Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz

GRAS: Generally Recognized as Safe

HRP: Horseradish Peroxidase

IBD: Inflammatory Bowel Disease (İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı)

L: Litre

LAB: Laktik Asit Bakterisi

mg: Miligram

mL: Mililitre

MRS: De Man, Rogosa ve Sharpe Brot

MRSA: De Man, Rogosa ve Sharpe Agar

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NAD: Nikotinamid Adenin Dinükleotit

nm: Nanometre

ns: Non-Significant (Önemsiz)

°C: Santigrat

OD: Optical Density (Optik Yoğunluk)
OM: Only Medium (Sadece Besiyeri)
PBS: Phosphate Buffered Saline
PES: Polietersülfon
pH: Potential of Hydrogen (Hidrojen Potansiyeli)
PVDF: Poliviniliden Florür
rpm: Revolutions Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
SCFA: Short Chain Fatty Acid-Kısa Zincirli Yağ Asitleri
SDS-PAGE: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid jel Elektroforez
SM: Skim Milk (Yağsız Süt)
TBS-T: Tris-Buffered Saline-Tween
TMA: Trimetilamin
TMAO: Trimetilamin-N-oksit
TMS: Tapioca Modified Starch (Modifiye Tapyoka Nişastası)
TSA: Triptik Soya Agar
TSB: Tryptic Soya Broth (Triptik Soya Besiyeri)
ud: Dilüye Edilmeyen
V: Voltaj
vd: ve diğerleri
w/v: Ağırlıkça yüzde
XIAP: X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (X'e Bağlı Apoptoz Protein İnhibitörü)
β: Beta
µg/mL: Mililitre Başına Mikrogram
µL: Mikrolitre
µM: Mikrometre
µM: Mikromolar

1. GİRİŞ

Bağırsak florasının ‘‘biyo-dost ajanları’’ olarak da adlandırılan probiyotikler, yeterli miktarda uygulandığında konakçı üzerinde sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalardır (LeBlanc vd., 2017: 1). Probiyotik suşlar, yerli ve fırsatçı patojenlerin büyümesini kontrol ederken faydalı bakteri popülasyonlarını artırarak, gastrointestinal sistemdeki normal mikrobiyal dengenin (homeostaz) korunmasına ve geri kazanılmasına yardımcı olabilirler (Weiss, 2013: 3). Antimikrobiyal aktivitelere dayanarak probiyotiklerin, potansiyel olarak zararlı bağırsak mikroorganizmalarının oranını kontrol etmek için kullanıldığı bildirilmiştir (Arias vd., 2013: 8). Son yıllarda patojenik mikroorganizmalarda antibiyotik direncinin artması ile birlikte antimikrobiyal aktiviteye sahip alternatif bileşiklerin araştırılması büyük ilgi çekmektedir (Cotter vd., 2013: 100; Danilova vd., 2017: 400). Probiyotiklerin antagonistik etkileri, antimikrobiyal bileşiklerin üretimi ve/veya adezyon ve besin için rekabet yoluyla mikrobiyal büyümenin doğrudan inhibisyonuna dayanır (Danilova vd., 2019: 752). Laktik asit bakterileri (LAB) ve bifidobakteriler en yaygın kullanılan probiyotiklerdendir (LeBlanc vd., 2017: 1). LAB arasında *Lactobacillus plantarum* suşları, özellikle gıda kaynaklı patojenler olmak üzere zararlı bakterilere karşı probiyotik özellikleri nedeniyle fermente gıdaların güvenliğini ve raf ömrünü artırmak için fonksiyonel gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Behera vd., 2018: 5). Probiyotik *L. plantarum*'un sadece patojenik bakterilerin büyümesini baskılamakla kalmayıp, aynı zamanda bağırsak epitel hücrelerine bağlanmalarını da engellediği bilindiğinden (Ashenafi ve Busse, 1991: 610; Golowcyc vd., 2007: 267; Johansson vd., 1998: 31) *L. plantarum* suşları, kronik ve/veya sistemik inflamasyon ile karakterize edilen çeşitli insan hastalıklarının tedavisi ve önlenmesi için önerilmiştir (Woo vd., 2014: 24). Kompozisyonel ve fonksiyonel mikrobiyom değişikliklerinin yaygın çok faktörlü hastalıkların patogenezi ile ilişkili olduğu bildirildiğinden (Fan ve Pedersen, 2021: 5), mikrobiyomun değişen metabolit profillerinin, konakçının immün yanıtları ve metabolizma gibi fizyolojik fonksiyonları üzerinde bir etkisi olabileceği önerilebilir (Blacher vd., 2017: 578). Ayrıca, diyetin mikrobiyotayı modüle edebileceğini ortaya koyan son verilere dayanarak diyet stratejilerinin, mikrobiyal kompozisyon, çeşitlilik, aktivite ve stabiliteyi manipüle ederek, konağın fizyolojisini ve sağlığını etkileyebilmesi de mümkündür (Wang vd., 2019a: 265). Bu bağlamda, prebiyotikler ile probiyotik bağırsak bakterileri arasındaki etkileşimlerin fonksiyonel ve biyolojik sonuçlarını tanımlamak için daha fazla bilimsel çalışmaya ihtiyaç vardır (Gurbanov vd., 2021: 200).

Genel şemsiye terim olarak postbiyotikler, canlı bakteriler tarafından salınan çözümler faktörleri veya metabolik yan ürünleri ifade eder (Aguilar-Toalá vd., 2018: 106). Dolayısıyla, bakteriler tarafından üretilerek salınan tüm fonksiyonel biyoaktif bileşikler yani enzimler, peptitler, teikoik asitler, peptidoglikan türevi muropeptitler, polisakkaritler, hücre yüzey proteinleri ve organik asitler, postbiyotik tanımına girmektedir (Wegh vd., 2019: 4673). Postbiyotiklerle ilgili güncel araştırmalar, bakteriyosinler ve kısa zincirli yağ asitleri (SCFA'lar-Short Chain Fatty Acids) üzerine yoğunlaşmış olup, özellikle SCFA'ların konakçı üzerindeki olumlu sağlık etkileri vurgulanmaktadır (Bindels vd., 2017: 12; Wegh vd., 2019: 4673). Ayrıca, arasında bakteriyosinlerin de bulunduğu bazı postbiyotik ürünler, patojen bakterilere karşı gıda ve sağlık alanlarında antibiyotik kullanımına alternatif olarak önerilmektedir (Rad vd., 2021: 14535).

Bu tez çalışmasında, bir dirençli nişasta kaynağı olarak tapyoka nişastasının, tek başına ve yağsız süt tozu ile birlikte kullanımının, *L. plantarum*'un probiyotik aktivitesine etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, tapyoka nişastası ve yağsız süt tozunun ayrı ayrı ve birlikte kullanım durumlarında probiyotik üzerindeki büyüme modüle edici etkisi araştırılmış ve ayrıca, bu besi yeri ilaveleri varlığında büyütülen *L. plantarum*'dan elde edilen post-fermantasyon ortamlarının, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Klebsiella pneumonia* patojenleri üzerindeki anti-mikrobiyal, kolon kanseri hücreleri üzerindeki anti-kanser aktiviteleri belirlenmiştir. Tez çalışmasında ayrıca, tapyoka dirençli nişastası ve yağsız süt tozunun ayrı ayrı ve birlikte kullanımının, *L. plantarum* hücreli post-fermantasyon ortamının moleküler içeriğini nasıl değiştirdiğinin karşılaştırmalı olarak belirlenmesi amaçlanmış olup, bu amaçla FTIR spektroskopisi yaklaşımı kullanılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Bağırsak Mikrobiyotası

2.1.1. Bağırsak Mikrobiyotasının Tanımı

Mikrobiyota terimi, insan vücudundaki çeşitli ekosistemlerde bulunan tüm mikroorganizmaları belirtir. Mikrobiyota; bakteri, arkea, virüs, faj, maya ve mantarları kapsayan çeşitli türlerdeki mikroorganizmalardan oluşur (Cani, 2018: 1718). Bu mikroorganizmalar bağırsak, akciğer, vajinal ve idrar yolları ve cilt dahil olmak üzere insan vücudunun çeşitli bölgelerinde bulunur. Gastrointestinal sistemde doğal olarak bulunan mikrobiyal organizmaların tamamı, bağırsak mikrobiyotası olarak adlandırılmaktadır. İnsan gastrointestinal sistemi, simbiyotik bir şekilde yaşayan 10^{13} - 10^{14} mikroorganizmanın bulunduğu oldukça çeşitli ve karmaşık bir topluluğa sahiptir (The Human Microbiome Project Consortium, 2012: 207). Bağırsakta yaşayan mikroorganizmaların, çoğunlukla bakterilerin, sindirim, metabolizma veya bağışıklık modülasyonu gibi konağın sağlığı üzerinde farklı işlevleri ve etkileri vardır (Sekirov vd., 2010: 860). Bu nedenle bağırsak florası, belirli bakterilerin kolonizasyonuna bağlı olarak bir bireyin sağlık durumu üzerinde yararlı veya zararlı etkilere sahip olabilir (O'Connor vd., 2017: 15).

2.1.2. Bağırsak Mikrobiyotasının Bileşimi ve Gelişimi

İnsan vücudu ekseriyeti kalın bağırsakta olmak üzere yaklaşık 4×10^{13} bakteri hücresi bulundurur (Sender vd., 2016: 338). Tahmini 100 trilyon hücre kompozisyonu ile insan simbiyotları, konakçı hücrelerde, konakçı genomundan en az 10 kat daha fazla benzersiz gen eksprese eder (Ley vd., 2006: 839). İnsan genomu yaklaşık 23 000 genden oluşmakta iken bağırsak mikrobiyomu binlerce metabolit üreten üç milyondan fazla geni kodlamaktadır (Valdes vd., 2018: 37). Bu nedenle, bağırsak mikrobiyotasının metabolik kapasitesi, insan hücrelerinin metabolik kapasitesini büyük ölçüde aşmaktadır (Cani vd., 2019: 34).

Maya ve virüsler dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizma türlerinden oluşan bağırsak mikrobiyotasının ana bileşeni bakterilerdir (Feng vd., 2018 :1354). Taksonomik olarak bakteriler, filuma, sınıflara, takımlara, ailelere, cinslere ve türlere göre sınıflandırılır. İnsan bağırsak mikrobiyotasında bulunan ana bakteriler Tablo 2.1'de gösterilmektedir (Abenavoli vd., 2019: 2690).

Tablo 2. 1. İnsan Bağırsak Mikrobiyotasında Bulunan Başlıca Bakteriler

ALEM	FİLUM	SINIF	TAKIM	AİLE	CİNS
Bakteri	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i>
				<i>Prevotellaceae</i>	<i>Prevotella</i>
					<i>Xylanibacter</i>
	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Rikenellaceae</i>	<i>Rikenella</i>
				<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>
				<i>Ruminococcae</i>	<i>Faecalibacterium</i> <i>Ruminococcus</i>
				<i>Peptostreptococcae</i>	<i>Peptostreptococcus</i> <i>Fusibacter</i>
				<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Eubacterium</i>
				<i>Veillonellaceae</i>	<i>Veillonella</i>
				<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Roseburia</i>
		<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>
				<i>Lysteriaceae</i>	<i>Lysteria</i>
				<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>
				<i>Pasteuriaceae</i>	<i>Pasteuria</i>
			<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>
				<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>
				<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>		<i>Bifidobacteriales</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i> <i>Gardnerella</i>
			<i>Actinomycetales</i>	<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Actinomices</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>		<i>Desulfobacteriales</i>	<i>Desulfobulbaceae</i>	<i>Desulfovibrio</i>
	<i>Gammaproteobacteria</i>		<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia</i> <i>Enterobacter</i> <i>Klebsiella</i> <i>Proteus</i>
		<i>Epsilonproteobacteria</i>	<i>Camphylobacteriales</i>	<i>Camphylobacteriaceae</i>	<i>Camphylobacter</i>
				<i>Helicobacteriaceae</i>	<i>Helicobacter</i>
<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteria</i>		<i>Fusobacteriales</i>	<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Fusobacterium</i>
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>		<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	<i>Verrucomicrobium</i>
<i>Synergistetes</i>	<i>Synergistia</i>		<i>Synergistales</i>	<i>Synergistaceae</i>	<i>Synergistes</i>
<i>Spirochates</i>	<i>Spirochaetes</i>		<i>Spirochaetales</i>	<i>Spirochaetaceae</i>	<i>Spirochaeta</i> <i>Treponema</i>
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>				

Kaynak: (Abenavoli vd., 2019: 2690)

Baskın bağırsak mikrobiyal filumları *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* ve *Verrucomicrobia*'dır. *Firmicutes* ve *Bacteroidetes* filumları bağırsak mikrobiyotasının % 90'ını temsil etmektedir. *Firmicutes* filumu, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* ve *Ruminococcus* gibi 200'den fazla farklı cinsten oluşmaktadır (Rinninella vd., 2019: 14). Yapılan çalışmalar bağırsak mikrobiyotasının parmak izi gibi eşsiz olduğunu ve her insanda farklı bir model oluşturduğunu göstermiştir (Bohan vd., 2019: 210).

Yenidoğan ve bebeklik dönemleri, bağırsak mikrobiyotasının oluşmasında önemli aşamalarıdır (Rautava vd., 2012: 565). Vajinal doğum sırasında, bebekler genellikle *Lactobacillus* ve *Prevotella* türlerinin baskın olduğu vajinaya özgü bakterilere maruz kalırlar. Aksine, sezaryen yoluyla doğan bebeklerin mikrobiyotasına vajinal doğumdan farklı olarak cilt mikrobiyal popülasyonuna benzer *Staphylococcus*, *Corynebacterium* ve *Propionibacterium* türleri hakimdir (Dominguez-Bello vd., 2010: 11972). Doğumdan itibaren yenidoğan bağırsak mikrobiyotası beslenme şekline önemli ölçüde etkilenir. Sadece anne sütüyle beslenen bebekler ile mamayla beslenen bebeklerin bağırsak mikrobiyotaları arasında farklılıklar olduğu bilinmektedir (O'Sullivan vd., 2015: 5). Emzirilen bebeklerin bağırsak mikrobiyotaları mama ile beslenen bebeklere göre daha az çeşitlilik göstermektedir. Yapılan çalışmalar anne sütü ile beslenen bebeklerin dışkılarında yüksek seviyelerde olmak üzere *Bifidobacterium* ve *Lactobacilli* türlerinin, mama ile beslenen bebeklerde ise *Enterococcus*, *Enterobacteria*, *Bacteroides*, *Clostridia* ve *Streptococcus* türlerinin baskın olduğunu göstermektedir (Zhuang vd., 2019: 17) Bebek-bağırsak mikrobiyotası simbiyozu doğumdan itibaren oluşur ve yaşamın ilk birkaç yılında şekillenir (Wopereis vd., 2014: 430) Doğum şekli ve bebek beslenmesinin yanı sıra yaşam tarzı, diyet, ilaçlar ve konağın genetik yapısı dahil olmak üzere birçok faktör insan bağırsak mikrobiyotasının ana bileşenlerini önemli derecede etkilemektedir (Fan ve Pedersen, 2020: 5). Mikrobiyotanın bu gelişimsel süreci, konağın metabolik fenotipini modüle eder ve konakçı biyokimyasını ve hastalığa yatkınlığını büyük ölçüde etkiler (Nicholson ve Wilson, 2003: 669).

2.1.3. Bağırsak Mikrobiyotasının İşlevleri

İnsan, doğumuyla beraber başlayan mikrobiyal kolonizasyon nedeni ile mikroorganizmalarla binlerce yıldır simbiyotik ilişki halindedir. Bağırsak mikrobiyotası, konakçı ile etkileşime girer ve insan sağlığını korumak için birçok temel işlevi yerine getirerek "metabolik organ" görevi görür (Tremaroli ve Bäckhed, 2012: 245).

Bağırsak mikrobiyotası, gastrointestinal sistem boyunca sindirim, besin ve metabolit ekstraksiyonuna, sentez ve absorpsiyona aracılık etme gibi temel süreçlerde düzenleyici rol oynar (Gubert vd., 2020: 104621).

Kompleks sindirilemeyen diyet karbonhidatlarının ve proteinlerinin parçalanması, bağırsak mikrobiyotasının metabolik aktivitesi sayesinde mümkündür. Bağırsak bakterileri, konakçı hücrelerin parçalamakta yetersiz kaldığı karbonhidatları sindirerek faydalı metabolitlere dönüştürebilen enzimlere sahiptir (Sun vd., 2017: 4). Sindirilemeyen karbonhidatlar, bağırsak mikrobiyotası tarafından anaerobik lümen içerisinde parçalanarak fermentasyon yan ürünleri olan kısa zincirli yağ asitlerini (SCFA) oluşturur (Sun ve O’Riordan 2013: 95). Bu SCFA’lar gastrointestinal membran yoluyla emilir ve çeşitli dokulara taşınır. Başta asetat, propiyonat ve bütirat olmak üzere SCFA’lar, bağırsak epitel hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını olumlu yönde etkileyen farklı metabolik özelliklere sahiptir (Lepage vd., 2013: 148). Bütirat, insan kolon hücreleri için enerji kaynağı oluşturur ve ayrıca kolon kanseri hücrelerinde apoptozisi indüklemeye ve histon deasetilazları inhibe ederek gen ekspresyonunu düzenleme yetenekleri ile potansiyel anti-kanser aktivitelere sahiptir (Steliou vd., 2012: 195). Propiyonat, epitel hücreleri için bir enerji kaynağıdır, ancak aynı zamanda karaciğere taşınarak glukoneogenezde rol oynar. Bağırsak glukoneogenezinde propiyonatın glukoz dönüşümü, hepatik glukoz üretimini azaltarak doğrudan enerji homeostazını teşvik eder ve sonuç olarak yağlanmayı (adipozite) azaltır (De Vadder vd., 2014: 86). Asetat, periferik dokulara taşınarak kolesterol metabolizması ve lipogenezde kullanılır. Yapılan çalışmalar asetatin aynı zamanda merkezi iştah düzenlemesinde de önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Frost vd., 2014: 3). SCFA üreten komensal türlerin eksiklikleri, tip 2 diyabet, obezite, kolorektal kanser, inflamatuvar bağırsak hastalığı ve irritabl bağırsak sendromu dahil olmak üzere birçok metabolik ve inflamatuvar hastalığın artan şiddeti ile ilişkilendirilmiştir (Smith vd., 2013: 570; Pozuelo vd., 2015: 4; Macia vd., 2015: 3; Singh vd., 2014: 130). Enerji homeostazı ve insülin duyarlılığının modülatörleri olan SCFA’ların, insülin direnci ve glukoz metabolizması ile ilişkili metabolik hastalıklarda koruyucu ve iyileştirici etkileri de bilinmektedir (Canfora vd., 2015: 577).







Bağırsak mikrobiyotası, konağın hem doğuştan hem de edinilmiş bağışıklık sistemlerinin gelişiminde önemlidir. Bağırsak bakterileri, SCFA’larının oluşumuna bağlı asidik ortam oluşturarak, bağırsak epiteli üzerindeki bağlanma bölgeleri için rekabet ederek ve bakteriyostatik ürünler üreterek patojen bakterilerin çoğalmasını engelleyebilmekte, böylece mukozal immün sistemi olumlu olarak etkilemektedir (Neish, 2009: 67).


Ek olarak bağırsak mikrobiyotası vitamin üretimine ve amino asit sentezine katılır, iyon emilimini etkiler, besinsel polifenolik bileşiklerin dönüşümünde ve safra asidi biyotransformasyon sürecinde rol oynar (Wu vd., 2011: 106; Cani vd., 2007: 2375). Ayrıca mikrobiyal proteazlar ve peptidazlar yoluyla protein metabolizmasını etkilemektedir. K vitamini ve B vitamininin çeşitli bileşenlerinin sentezi, bağırsak mikrobiyotasının bir başka önemli metabolik işlevidir (Jandhyala vd., 2015: 8787). Bağırsak mikrobiyal enzimleri safra asidi metabolizmasına da katkıda bulunmaktadır. Nitekim, safra asitleri hem bağırsak mikrobiyota çeşitliliğini hem de çoğalmasını etkileyebilir (Cani vd., 2019: 36). Birincil safra asitleri, bağırsak mikrobiyotası tarafından, sinyal molekülleri ve metabolik düzenleyiciler olarak hareket eden konjuge olmayan ikincil safra asitlerine dönüştürülür (Long vd., 2017: 56). Bununla birlikte, bağırsak mikrobiyal enzimleri, besin maddesi olan kolinin, trimetilamine (TMA) dönüşümünü de katalize eder (Dumas vd., 2006: 12513) ve TMA daha sonra trimetilamin-N-oksit (TMAO) üretmek için karaciğerde metabolize edilir. Diyet kolininin mikrobiyal dönüşümü, karaciğer ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili metabolik bir belirteçtir (Nicholson vd., 2012: 1265).

Bağırsak mikrobiyotasının çeşitli molekülleri, hücrel ve metabolik bileşenleri insan organlarıyla süreklilik arz eden bir etkileşim içinde olup, bu şekilde konakçı sağlığını etkilemektedir. Bu nedenle, bağırsak mikrobiyotasının “unutulmuş” organ olarak anılması şaşırtıcı değildir (O'Hara ve Shanahan, 2006: 690; İlhan, 2018: 115).

2.1.4. Bağırsak Mikrobiyotasının Hastalıklar ile İlişkisi

Bağırsak mikrobiyotası ile konakçı arasındaki kompleks ilişki, bağırsak homeostazının korunmasında anahtar rol oynar. Bağırsak mikrobiyotasında, birçok farklı bakteri popülasyonu, belirli oranlarda olmak üzere birlikte yaşar (Faith vd., 2013:44). Bazı türler diğerlerine hükmetmeye ve bu türleri baskılamaya başladığında (floradaki faydalı/zararlı bakteri oranı azaldığında), patolojik bir süreç başlayabilir. Bu nedenle, konağın fayda veya zarar dengesi, mikrobiyal topluluğun çeşitliliği, türleri ve metabolitlerine bağlıdır (Şekil 2.1) (Flint vd., 2012: 577). Çevresel faktörler, yaşam tarzı, hastalık durumu veya enfeksiyonların neden olduğu herhangi bir değişiklik, bakteriyel kompozisyonunun değişmesine neden olarak mikrobiyotadaki dengeyi bozar. Bu durum, “mikrobiyal disbiyozis” olarak bilinir (Carding vd., 2015: 26191). Yapılan son çalışmalar, anormal veya değişmiş bağırsak mikrobiyomunun (disbiyozis) kronik gastrointestinal (Hollister vd., 2014: 1450), nörolojik (Tremlett vd., 2017: 371) ve metabolik (Mazidi vd., 2016: 152) sağlık sorunlarına neden olduğuna işaret etmektedir (Nagpal vd., 2018: 2).

Sağlık	Mikrobiyal Üretim veya İşlevler	Hastalık
 Besin ve enerji sağlama	<ul style="list-style-type: none"> • SCFA üretimi, vitamin sentezi • Enerji sağlama üzerindeki etkiler, bağırsak hormonları, tokluk, enerji harcama • Lipopolisakkarit, inflamasyon 	Obezite ve metabolik sendrom
 Kanser önleme	<ul style="list-style-type: none"> • Bütirat üretimi, fitokimyasal salınım • Toksinler, karsinogenez, inflamasyon 	Kanser oluşumu
 Patojenlerin engellenmesi	<ul style="list-style-type: none"> • SCFA üretimi, bağırsak pH'ı, bakteriyosinler, substrat ve bağlanma noktaları için rekabet • Toksin üretimi, doku istilası, inflamasyon 	Patojenlerin kaynağı
 Normal gastrointestinal immün fonksiyon	<ul style="list-style-type: none"> • Anti-inflamatuar sinyallere karşı proinflamatuar dengesi, gelişme • İnflamasyon, bağışıklık bozuklukları 	İnflamatuar bağırsak hastalığı (IBD)
 Normal bağırsak hareketliliği	<ul style="list-style-type: none"> • Sindirilemeyen karbonhidrat metabolitleri (SCFA, gazlar) 	IBS (kabızlık, ishal, şişkinlik)
 Kardiyovasküler sağlık	<ul style="list-style-type: none"> • Lipit, kolesterol metabolizması 	Kardiyovasküler hastalıklar



Mikrobiyal Disbiyozis

Şekil 2. 1. Bağırsak Mikrobiyal Topluluklarının Sağlık Üzerindeki Etkisi

Orta sütunda belirtilen mikrobiyal aktiviteler tüm bağırsak mikrobiyotası topluluğunun işlevleridir. Topluluğun dengesi, sağlığa veya hastalığa net katkıyı belirler.

Kaynak: (Flint vd., 2012: 577)

İnflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD), gastrointestinal sistemi etkileyen ve bağışıklık sisteminin aracılık ettiği heterojen bir dizi inflamatuvar hastalıktır. Crohn Hastalığı (CD) ve ülseratif kolittir (UC), iki ana IBH formudur (Chiara vd., 2020: 944). Çok sayıda çalışmada, IBD'li hastalar ile sağlıklı bireyler arasındaki bağırsak mikrobiyotasının bileşiminde, özellikle mikrobiyal çeşitlilik ve spesifik bakteri taksonlarının görece bolluğu açısından farklılıkları ortaya konmuştur. Yapılan çalışmaların sonuçları, IBD'li hastaların mikrobiyota biyoçeşitliliğinde genel bir azalmanın yanı sıra *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Lactobacillus* ve *Eubacterium* dahil olmak üzere spesifik taksonlarda bir azalma olduğunu göstermektedir (Frank vd., 2011: 180; Frank vd., 2007: 13782; Morgan vd., 2012: 4; Gevers vd., 2014: 383; Ott vd., 2004: 686; Li vd., 2015: 141). Ayrıca IBD hastalarında, bütirat üretimi ile bağırsak homeostazını pozitif olarak modüle eden ve iltihabı azaltan bakteri türlerinde de bir azalma söz konusudur (Machiels vd., 2014: 1276). Bu hastalarda, *Escherichia coli* ve *Fusobacterium* dahil olmak üzere *Enterobacteriaceae*'lerde nispi bir artış gözlenmiştir (Lupp vd., 2007: 120). Genel olarak IBD'de, mikrobiyotanın toplam tür sayısı ve çeşitliliğin azalması, bağırsak disbiyozu ile ilişkilendirilmektedir.

Bağırsak mikrobiyotasının kolorektal karsinogenez ile de güçlü bir şekilde ilişkili olduğu öne sürülmektedir. Kolorektal kanserin (Colorectal Carcinogenesis-CRC) başlangıcı ve teşvikinin, mikrobiyal metabolitlerden ve inflamatuvar yollardan kaynaklandığı rapor edilmektedir (Corrêa-Oliveira vd., 2016: e73). Örneğin, IBD'nin kolon kanseri riskini arttırdığı gösterilmiş olup hem IBD hem de kolon kanserinin ilk aşamalarında normal florada değişiklik olduğunu bildirilmiştir (Tomasello vd., 2014: 18121; Ryan vd., 2014: 385). Yapılan çalışmalar, CRC hastaları ve sağlıklı popülasyonlar arasında mikrobiyal farklılıklar olduğunu önermektedir: *Fusobacterium* gibi proinflamatuvar bakterilerde bir artış görülürken, bütirat üreten bakterilerin azaldığı belirlenmiştir (Wu vd., 2013: 462; Wang vd., 2012: 322). Proinflamatuvar bakterilerin normal konakçı tepkilerini inhibe edebileceği, bozabileceği veya şiddetlendirebileceği ve dolayısıyla anormal apoptozise, hücre proliferasyonuna ve inflamasyona yol açabileceği düşünülmektedir. CRC'nin başlaması için önerilen başka bir mekanizma, konakçı DNA'sına zarar verebilen ve hücre dönüşümünü indükleyebilen reaktif oksijen ara ürünleri veya bazı toksinler gibi bakteriyel ikincil metabolitlerin varlığıdır (Sobhani vd., 2013: 218; Zackular vd., 2013: e00692).

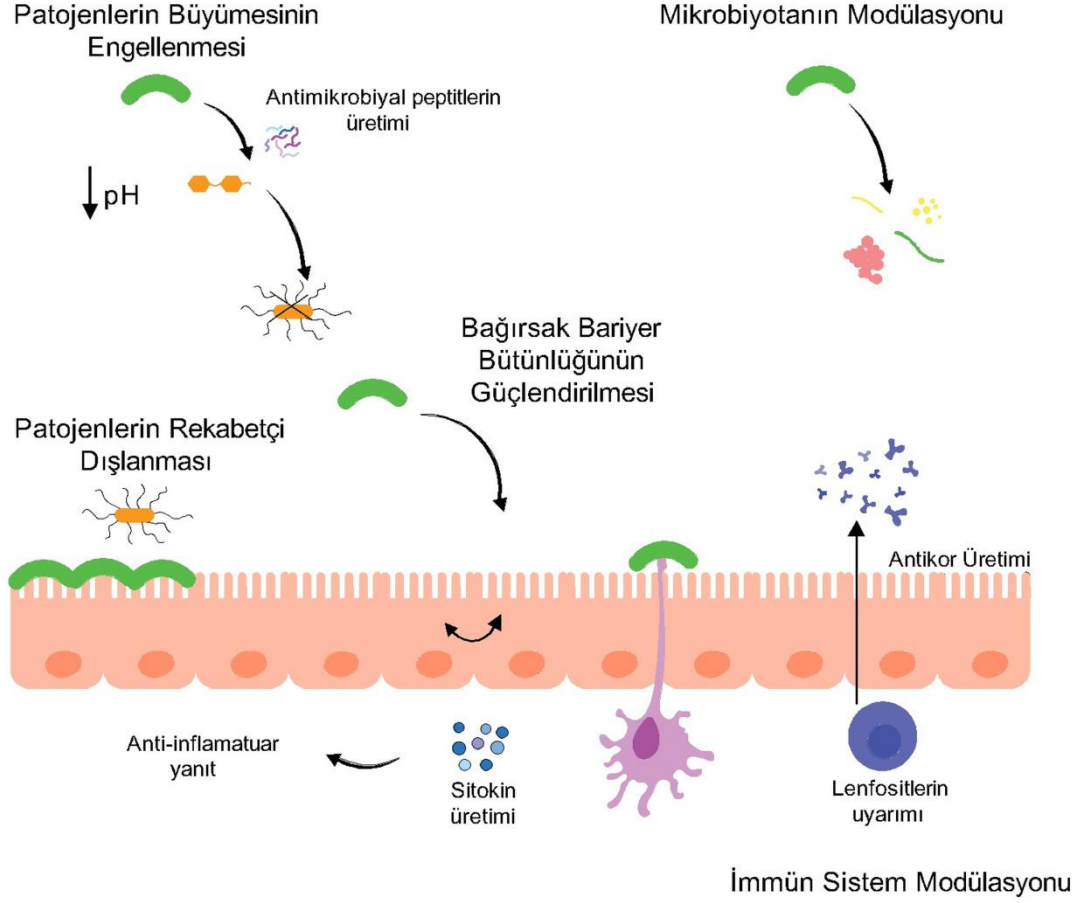
Bağırsak mikrobiyotasının, özellikle disbiyozis durumunda, nörolojik hastalıkların ilerlemesini etkileyebileceği ve hatta hastalığın oluşumunu başlatabileceği düşünülmektedir. İlerleyen yaşa bağlı olarak bağırsak mikrobiyotasında azalan çeşitlilik, nörodejenerasyon gelişiminde önemli bir faktör olabilir (Westfall vd., 2017: 3770). Bağırsaklardaki hormonal, sinirsel ve bakteriyel değişim vagus siniri üzerinden beyne iletilmektedir (Wang vd., 2002: 540). Nörotransmitterler dahil diğer metabolitler bağırsak-beyin ekseninde rol oynar. Bağırsak bakterileri, nörotransmitterlerin seviyelerini ya doğrudan ya da bu bileşiklerin konakçı biyosentetik yollarının modülasyonu yoluyla düzenleyebilir. Bağırsak bakterileri çok sayıda nörotransmitter üretebilir ve metabolize edebilir (Strandwitz, 2018: 129). Spesifik bağırsak bakterileri ayrıca bağırsakta konakçı tarafından nörotransmitter üretimini kısmen uyarır ve kandaki ve beyindeki nörotransmitter seviyelerini modüle eder (Yano vd., 2015: 266). Bağırsak mikrobiyotasının bu etkileri, depresyon (Kelly vd., 2016: 111; Zheng vd., 2016: 788), anksiyete (De Palma vd., 2017: 379), Parkinson hastalığı (Sampson vd., 2016: 1470), Alzheimer hastalığı (Minter vd., 2016: 3), multipl skleroz (Berer vd., 2017: 10721) ve otizm spektrum bozukluğunun semptomları (Gurbanov, 2020: 13) dahil olmak üzere, insanlardaki merkezi sinir sisteminin çeşitli hastalıkları ile ilişkilendirilmiştir (Hsiao vd., 2013: 1453).

Yapılan çalışmalar, bağırsak mikrobiyotası ile kardiyovasküler hastalıklar arasında da bir ilişkiye işaret etmektedir (Emoto vd., 2016: 32672). TMAO, hem insan hem de hayvan çalışmalarında kardiyovasküler risklerle güçlü bir şekilde ilişkili olan bakteriyel bir metabolittir (Org vd., 2017: 4; Heianza vd., 2018: 67; Gao vd., 2014: 477). Kolin ve L-karnitin, TMAO'nun başlıca öncüleridir ve kırmızı et, süt ürünleri, yumurta ve balık açısından zengin olan Batı diyetinde oldukça bol miktarda bulunurlar. Bu moleküller bağırsak mikroorganizmaları tarafından sırasıyla γ -butirobetain (γ -BB) ve TMA'ya dönüştürülür. TMA karaciğere ulaştığında, flavin içeren enzim monooksijenaz-3 (FMO3) tarafından TMAO'ya dönüştürülür (Koeth vd., 2014: 780). Artan kanıtlar, TMAO veya öncüllerinin yanı sıra γ -BB'nin artan seviyelerinin de metabolik komplikasyonlarla bağlantılı olduğunu göstermektedir (Cani vd., 2019: 38).

Özetle, bağırsak mikrobiyotasında meydana gelen değişimlerin, insan hastalıkları ve sağlık durumu ile ilişkili olduğu önerilmektedir. Flora dengesinin bozulduğu durumlarda ise probiyotik desteği önem kazanmaktadır. Bu bağlamda probiyotik bakteriler, potansiyel bir biyolojik kaynak olarak oldukça önem arz etmektedir (Gaudana vd., 2010: 1621; Millette vd., 2008: 1198).

2.2.Probiyotikler

Bağırsak florasının ‘‘biyo-dost ajanları’’ olarak da adlandırılan probiyotikler, yeterli miktarda uygulandığında konakçı üzerinde sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalardır (LeBlanc vd., 2017: 1). Canlı mikroorganizmaların probiyotik olarak adlandırılması için konakçı üzerinde kanıtlanmış yararlı etkiye sahip olması, patojenik, toksik ve önemli bir yan etkisinin olmaması ve düşük pH gibi bağırsak koşullarında hayatta kalması gerekmektedir (Sanders vd., 2019: 832). Konakçı-mikrobiyota dengesinin kurulması, konakçının sağlığı için zorunludur ve gastrointestinal sistemdeki bu etkileşimin bozulmasına dayalı olarak çok sayıda patolojik durum tanımlanmıştır (Conte vd., 2006: 1761; Ott vd., 2004: 687). Bu anlamda probiyotik suşlar, fırsatçı patojenlerin büyümesini kontrol ederken faydalı bakteri popülasyonlarını artırarak, gastrointestinal sistemdeki normal mikrobiyal dengenin (homeostaz) korunmasına ve geri kazanılmasına yardımcı olabilirler (Weiss, 2013: 3). Probiyotiklerin, bakteriyosinler ve organik asitler gibi maddeler üreterek patojenler üzerinde doğrudan inhibe edici etkiler sağladığı gösterilmiştir (Ott vd., 2004: 687). Probiyotiklerden türetilen antimikrobiyal moleküller yararlı etkilerini, patojenlerin büyümesini kontrol etmek için tek başına veya sinerjistik olarak gösterir. Probiyotikler, antimikrobiyal maddelerin üretimiyle birlikte gastrointestinal sistemde yer alan patojenik mikroorganizmalara epitelyal inhibisyon sağlayarak mukozal yapışmayı engeller. Ayrıca ortamda bulunan sınırlı besin maddeleri için rekabet eder ve patojenlerin istilasını engelleyerek bağırsak mikrobiyotasının modülasyonunu sağlar (Wan vd., 2016: 2629). Bağırsak bariyerinin bütünlüğü, bağırsak emilim kapasitesinin en üst düzeyde gerçekleşmesi ve mikrobiyal ve kimyasal etkilere karşı savunmanın sürdürülmesi için gereklidir. Müsin glikoproteinler (müsinler), epitelyal mukusun başlıca makromoleküler bileşenleridir ve uzun süredir bağırsak sağlığında ve bağırsak ile ilişkili birçok hastalıkta rol oynadıkları bilinmektedir. Probiyotikler, mukus salgılanmasını teşvik ederek bağırsak bariyer bütünlüğüne katkı sağlarlar (Bermudez-Brito vd., 2012: 161). Ayrıca, probiyotik mikroorganizmaların epitelyal hücrelere yapışması, immün modülasyona yol açan bir sinyal zincirini tetikleyebilir. Alternatif olarak, bazı çözünen bileşenlerin salınması, immün hücrelerin doğrudan veya dolaylı (epitel hücreleri vasıtasıyla) aktivasyonuna neden olabilir. Bu etki, bulaşıcı hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde olduğu kadar, gastrointestinal sistemin veya onun bir kısmının kronik inflamasyonunda da önleyici bir rol oynar (Oelschlaeger, 2010: 58). Probiyotik mikroorganizmaların konakçı üzerindeki etkileri Şekil 2.2’de özetlenmiştir (Gresse vd., 2017: 852).



Şekil 2. 2. Probiyotiklerin Etki Mekanizmaları

Probiyotikler, antimikrobiyal peptitler aracılığı ile ve lümen pH'sını düşürerek ve/veya patojenlerle doğrudan etkileşime girerek patojenik bakterilerin kolonizasyonunu engeller, immünomodülatörler aracılığı ile antitümör bağışıklığı teşvik eder, mün üretimini destekler ve sıkı bağlantı protein ekspresyonunu artırarak epitel bariyer bütünlüğünün korunmasına katkı sağlar.

Kaynak: (Gresse vd., 2017: 852)

Klinik çalışmalar, probiyotiklerin gastrointestinal sistem ile ilgili patolojiler (örneğin irritabl bağırsak sendromu, *Helicobacter* bağlı mide kanseri, inflamatuvar bağırsak hastalığı, ishaller), alerjik hastalıklar (örneğin atopik dermatit), insülin direnci sendromu, tip 2 diyabet ve alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı gibi hastalıkların tedavisinde etkili olabileceğini öne sürmektedir. Ayrıca, probiyotikler vücudun bağışıklığını artırarak (immünomodülasyon), insan sağlığı üzerinde olumlu etkiler gösterebilir. Probiyotiklerin farklı kanser türlerinde profilaktik olarak ya da kanser tedavi sürecinin bir parçası olmak üzere tedavi yöntemlerinin yan etkilerini azaltmak amacıyla kullanılabilirliği de önerilmiştir (Markowiak ve Śliżewska, 2017: 2). Bu anlamda, en sık kullanılan probiyotikler laktik asit bakterileri (LAB) ve bifidobakterilerdir (LeBlanc vd., 2017: 1).

2.2.1. Laktik Asit Bakterileri

LAB, anaerobik (aerotolerant anaerob) olarak büyüyen ve geleneksel olarak çeşitli fermente gıda ürünlerinin korunmasında kullanılan Gram pozitif, spor oluşturmayan, fermentatif bakterilerdir (De Vries vd., 2006: 1020). LAB, doğada yaygın olarak hayvanlar, yiyecekler, yemler, insanlar, bitkiler ve toprak gibi besleyici yönden zengin çeşitli habitatlarda bulunur (Ruiz Rodríguez vd., 2019: 1091; Duar vd., 2017: 28). Hammaddelerde bulunan şekerlerin fermentatif olarak laktik aside dönüştürülmesi ana işlevi iken, antimikrobiyal peptidlerin, ekzopolisakkaritlerin ve çeşitli diğer metabolitlerin üretimi diğer önemli özelliklerdir (De Vries vd., 2006: 1020). Çok yönlü metabolizmaları ve laktik asit üretimine ek olarak çok çeşitli yararlı metabolitleri sentezleme yetenekleri nedeniyle LAB, biyoteknoloji, gıda ve terapötik ürünlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. LAB, patojenik mikroorganizmaların neden olduğu bozulmaları engellemenin yanı sıra antifungal ve antibakteriyel ajanlar, bakteriyosin venutrasötik üreticileri, probiyotikler ve başlangıç kültürleri olarak kullanılır. Çok sayıda LAB türü ve bunlardan türetilen gıda katkı maddeleri “genel olarak güvenli (Generally Recognized As Safe-GRAS)” kabul edilmektedir (Mora-Villalobos vd., 2020: 23). En büyük LAB grubu, 50'den fazla farklı tür içeren *Lactobacillus* cinsine aittir (De Vries vd., 2006: 1020). Bazı *Lactobacillus* türlerinin patojenik bakterilerin büyümesini ve bağırsak epitel hücrelerine tutunmasını baskıladığı gösterilmiştir (Ashenafi ve Busse, 1991: 610; Golowczyc vd., 2007: 267; Johansson vd., 1998: 31). *Lactobacillus plantarum*, mannoz adezyonunun spesifik bir mekanizması nedeniyle insan bağırsak mukozasına iyi kolonize olabilen probiyotik bir suştur (Johansson vd., 1993: 18). Bir dizi çalışmaya göre *L. plantarum*, *Escherichia coli* (*E. coli* 0157: H7 dahil), *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* spp., vb. birçok gram pozitif ve gram negatif bakterilere ve ayrıca *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Candida* spp., vb. bir dizi küf ve maya türüne karşı inhibitör aktiviteye sahiptir (Dinev vd., 2018: 3). *L. plantarum*, gıda endüstrisindeki uygulamaların yanı sıra, herhangi bir yan etkisi bulunmadığından insan tıbbına önemli ölçüde katkıda bulunur ve ilaç endüstrisinde geniş uygulamalara sahiptir (Arasu vd., 2016: 9). *L. plantarum*, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, diyabet, obezite, kanser, hipertansiyon, ürogenital komplikasyonlar, karaciğer rahatsızlıkları ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli kronik hastalıkların tedavi süreçlerinde de uygulanmaktadır (Woo vd., 2014: 24).

LAB'lar büyümeleri sırasında, çevre pH'sını düşürmek üzere, patojenler de dahil olmak üzere diğer birçok organizma için elverişsiz koşullar yaratan asidik son ürünler üretir. Probiyotik LAB'ların patojen inhibitör aktivitesi çoğunlukla organik asitler, diasetil, hidrojen peroksit, bakteriyosinler ve bakteriyosin benzeri inhibitör maddeler (BLIS'ler) dahil olmak üzere çeşitli metabolitlerden kaynaklanır (Tunçer ve Karaçam 2020: 2835). Dolayısıyla, tıpta ve gıda endüstrisinde probiyotik ve doğal koruyucu olarak yaygın kullanılan LAB'lar ve onların postbiyotik metabolitleri özel bir öneme sahiptir.

2.3. Prebiyotikler

Lactobacillus gibi probiyotik bakterilerin büyümesi ve metabolik aktivitesi, konakçı tarafından sindirilemeyen, “prebiyotikler” adı verilen çeşitli diyet karbonhidratları tarafından seçici olarak uyarılabilir (LeBlanc vd., 2017: 1). Prebiyotikler, gastrointestinal mikrobiyota tarafından seçici olarak kullanılan, konakçı sağlığı üzerine fayda sağlayan substratlar olarak tanımlanmaktadır (Gibson vd., 2017: 491). Prebiyotik kavramı geniş kapsamlı olmasına rağmen, tipik olarak sindirilemeyen karbonhidratlardan oluşurlar (Gibson vd., 2017: 491). Prebiyotikler, konakçı enzimleri tarafından sindirilmez; bu nedenle proksimal kolona girerler ve bakteriyel enzimler tarafından fermente edilirler (Slavin, 2013: 1416). Prebiyotikler, sindirime yardımcı olma, kabızlığı azaltma, enfeksiyonlara direnç gösterme, ishali önleme ve iltihaplı bağırsak hastalığını iyileştirme yeteneklerine sahip olan *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türlerinin artışı ile ilişkilendirilmiştir (Gibson vd., 2010: 2). Prebiyotiklerin spesifik olarak, bağırsaktaki zararlı bakterilere göre faydalı bakterilerin büyümesini destekledikleri düşünülmektedir. Bu nedenle araştırmacılar özellikle son yıllarda prebiyotiklerin bağırsak mikrobiyotasını değiştirme yeteneğine ilgi duymaktadırlar (O'Connor vd., 2017: 12). Bu alanda özellikle dirençli nişasta (DN) gibi diyet lifleri incelenmektedir (Slavin, 2013: 1416). Önceki çalışmalar lif bakımından zengin diyetin obezite, kalp hastalıkları, diyabet ve kanser gibi hastalıklara yakalanma riskini azalttığını ortaya koymuştur (Canovas, Perez-Alvarez, 2006: 88).

2.3.1. Dirençli Nişasta

DN, mide ve ince bağırsakta sindirime uğramadan, belirli mikroorganizmalar tarafından fermente edilebileceği kolona ulaşır (Bello-Perez vd., 2020: 5010). Bu özelliğinden dolayı kandaki şeker seviyesinin kontrolünde, kolesterol metabolizması üzerinde, diyabet ve kolon kanserinin önlenmesinde ve mide-bağırsak sağlığının iyileştirilmesinde olumlu etkilere sahiptir (Higgins ve Brown, 2013: 191; Yue ve Waring, 1998: 692).

DN, bitkisel çiğ gıdalarda doğal olarak bulunabilir ya da gıda işleme sırasında oluşturulabilir. DN, fonksiyonel olarak ele alındığında yapısına, hidroliz, jelatinizasyon, retrogradasyon gibi değişimler geçirmesine ve modifiye olmasına göre beş (5) kategoriye ayrılır (Eliasson, 2004: 4). DN1, hücre duvarları ve gıda matrisleri içinde gömülmüş, böylece amilolizi önleyen fiziksel olarak erişilemeyen nişastayı içerir. DN2, granüler formdaki nişastadır ve enzim sindirimine dayanıklıdır (Fuentes-Zaragoza vd., 2011: 407). DN3 oluşumunda nişasta önce jelatinleşir ve sonra retrogradasyon için soğutulur. Retrogradasyon sırasında polimer zincirleri, çift heliks oluşturmak üzere hidrojen bağlarının oluşumu ile yeniden birleşir (Hsien-Chih ve Sarko, 1978: 28). DN4 kimyasal olarak modifiye edilmiş nişastadır ve esterifikasyon, eterifikasyon veya çapraz bağlama gibi modifikasyonları içerir (Ashwar vd., 2016: 288). DN5, jelatinleşme için daha yüksek sıcaklıklar gerektiren ve retrogradasyona daha duyarlı olan amiloz-lipit kompleksli nişastadır (Jiang vd., 2010: 5634). DN, insan bağırsak mikrobiyotası tarafından fermente edilerek anaerobik ortamda bulunan bakteriler için karbon ve enerji kaynağı sağlar ve böylece mikrobiyotanın bileşimini ve metabolik aktivitesini değiştirebilir (Fuentes-Zaragoza vd., 2011: 407). Sıçanlar üzerine yapılan bir çalışmada, DN bakımından zengin bir diyetin, *Lactobacilli*, *Bifidobacteria* ve *Streptococci* popülasyonlarını önemli ölçüde artırdığı, *Enterobacteria* popülasyonunu ise azaltarak kalın bağırsağın enzim metabolizmasını değiştirdiği gösterilmiştir (Silvi vd., 1999: 522). Ayrıca, DN gibi karbonhidratların anaerobik bakteriler tarafından fermantasyonu sırasında lümen pH'sını düşüren ve kanserin oluşumuna daha az eğilimli bir ortam yaratan SCFA üretilmektedir (Yao vd., 2009: 2041).

Tapyoka nişastası, manyok bitkisinin (*Manihot esculenta*) kökünün temel bileşenidir ve kök ağırlığının yaklaşık %80'ini oluşturur (Charoenthai vd., 2018: 196). Manyok kolayca yetiştirildiğinden, tapyoka nişastası tedariki sürdürülebilir ve ucuzdur ve gıda sektöründe rutin olarak kullanılır (Kasote vd., 2018: 1). Ham tapyoka nişastasının DN2 içeriği DN3'ten daha yüksek olduğundan, DN3 içeriğini arttırmada nemlendirme ve ısı işlemlerin (otoklavlama) etkili olduğu gösterilmiştir (Kasote vd., 2018: 1). Ek olarak, tapyoka nişastasındaki DN3 oluşumunun otoklav süresi ve sıcaklığa bağlı olduğu bulunmuştur (Kasote vd., 2018: 1).

Manyok kökenli nişastanın sağlık üzerindeki etkileri iyi araştırılmamıştır, ancak literatürde konuyla ilgili sınırlı sayıda da olsa çalışmaların mevcut olduğunu da belirtmek gerekir. Örneğin, manyok pulpasının SCFA'ların üretimini arttırdığı ve insan kolonunun *in vitro* simülasyon modelinde inülin benzeri “bifidojenik etki” yarattığı gösterilmiştir (de Souza vd., 2014: 211).

Tapyoka ve sago dirençli nişastaların probiyotik *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium animalis* üzerindeki “bifidojenik etkisi” de bilinmektedir (Arshad vd., 2018: 3). Tapyoka nişastasının mikrobiyal amilomaltaz ve transglukozidaz enzimleri tarafından parçalanmasıyla üretilen uzun zincirli izomaltooligosakkaritlerin (IMO) prebiyotik özellikler sergilediği ve probiyotik *Lactobacillus casei*'nin büyümesini teşvik ettiği de *in vitro* olarak gösterilmiştir (Kaulpiboon vd., 2015: 128). İnsanlar üzerinde yakın zamanda yapılan bir çalışmanın bulgularına göre, tapyoka nişastası dahil olmak üzere farklı dirençli nişastalar asetat, bütirat ve propiyonat gibi yararlı SCFA'ların oluşumunu indüklemiştir (Erickson vd., 2018: 18). Bu kapsamda, grubumuz tarafından yapılan bir çalışmada, tapyoka nişastasının oral mikrobiyota üyesi probiyotikler olan *Streptococcus salivarius* K12/M18 suşlarında birçok hücresel süreci değiştirerek, bu bakterilerin probiyotik potansiyelini arttırdığı gösterilmiştir (Gurbanov vd., 2020: 205). Buna rağmen tapyoka nişastasının prebiyotik etkisini ortaya koyacak daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

2.4.Postbiyotikler

Probiyotik kullanımının olumlu göstergelerini ortaya koyan çalışmalara rağmen, probiyotik hücrelerin canlı formunun tüketilmesiyle ilgili istenmeyen sistemik enfeksiyonlar ve aşırı bağışıklık uyarımı gibi yan etkiler de dahil olmak üzere önerilen riskler nedeniyle, canlı probiyotik bakterilerin yerine canlı olmayan probiyotik türevli biyomoleküllerin, yani postbiyotiklerin kullanılması söz konusudur (Karaçam ve Tunçer 2021: 13). Öngörülemeyen, nişlere özgü aktiviteler ve metabolit üretimi, konakçı kaynaklı gen ekspresyon değişimleri, fırsatçı enfeksiyonlara neden olma potansiyeli, kommensal bağırsak mikroflorasının kolonizasyonuna müdahale etme ve kan veya diğer dokulara bakteriyel translokasyon, probiyotik tüketiminin teorik riskleri arasındadır (Nataraj vd., 2020: 15). Hastalarda uzun süreli probiyotik kullanımının etkilerini inceleyen uzun süreli ve kapsamlı klinik çalışmalar ise bulunmamaktadır. Ayrıca, teknolojik üretim süreçleri sırasında canlılık ve saflığın korunması da dahil olmak üzere probiyotik hücrelerin ilaç sektörlerinde ve gıda üretimindeki tüm potansiyeli ile kullanımını kısıtlayan biyoteknolojik sınırlamalar söz konusudur. Bu nedenle araştırmacılar, sağlık açısından olumlu etkileri yönünden canlı probiyotiklere kıyasla benzer ve hatta artmış biyolojik etkinlik sunan canlı olmayan bakterilerin, bakteriyel bileşiklerin veya postbiyotiklerin kullanımına daha fazla ilgi göstermektedir (Karaçam ve Tunçer, 2021: 15; Rad vd., 2021: 14540).

Genel şemsiye terim olarak postbiyotikler, canlı bakteriler tarafından salınan çözünür faktörleri veya metabolik yan ürünleri ifade eder (Aguilar-Toalá vd., 2018: 106). Dolayısıyla, bakteriler tarafından üretilerek salınan tüm fonksiyonel biyoaktif bileşikler yani enzimler, peptitler, teikoik asitler, peptidoglikan türevi muropeptitler, polisakkaritler, hücre yüzey proteinleri ve organik asitler, postbiyotik tanımına girmektedir (Wegh vd., 2019: 4673). Postbiyotikler, tanımlanan kimyasal bileşim, güvenlik, kullanım ve saklama kolaylığı, geniş bir pH ve sıcaklık aralığında stabilite ve geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivite nedeniyle probiyotiklerden daha fonksiyonel olarak kabul edilmektedir (Barros vd., 2020: 2). Postbiyotiklerin sağlığa yararlı etkilerine dahil olan mekanizmaları tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen bilimsel veriler, postbiyotiklerin antimikrobiyal, antioksidan ve immünomodülatör aktivitelerinin yanı sıra farklı fonksiyonel özelliklere de sahip olduğuna dair kanıtlar sağlamıştır. Bu özellikler, mikrobiyota homeostazını ve konakçı metabolik ve sinyal yollarını olumlu etkileyebilir; böylece spesifik olarak fizyolojik, immünolojik ve nöro-hormonal etki gösterebilirler (Aguilar-Toalá vd., 2018: 107).

LAB kaynaklı hücresiz süpernatantın benzersiz bileşimsel profili, çeşitli sağlık geliştirici özelliklere sahip biyomoleküller aramayı hedefleyen araştırmacılar arasında ilgi uyandırmıştır. LAB hücresiz süpernatantlarının (postbiyotiklerin) düşük moleküler ağırlıklı (hidrojen peroksit, reuterin, organik asitler, karbon dioksit ve di-asetilen gibi) metabolitler ve yüksek moleküler ağırlıklı (bakteriyosinler ve bakteriyosin benzeri moleküller) biyomolekülleri içerdiği bilinmektedir (Siedler vd., 2019: 139). Organik asitler, aside toleranslı olmayan patojenler için çevre pH'sını düşürerek, bu patojenleri hayatta kalma kabiliyetini azaltır. *L. plantarum* suşları tarafından postbiyotik üretimi sırasında, üretici hücrelerin büyümesini desteklemek için asetik asit ve laktik asit üretilir (Savadogo vd., 2006: 9; Foo vd., 2003: 404). Yüksek organik asit konsantrasyonları ve düşük pH, gıda kaynaklı patojenlerin ve organizmaların bozulmasını önleyebilir (Cintas vd., 2001: 282).

Remesy ve arkadaşlarına (1993: 858) göre, prebiyotik inülin ve FOS'un fermantasyonu, önemli miktarda organik asit üretimine yol açar. Ayrıca bağırsak içeriğinin asitleşmesini de artırabilir. Dahası, prebiyotikler, mikrobiyotanın belirli üyeleri için fermantasyon elemanları olarak işlev görürler ve hem sayılarını hem de postbiyotik fermantasyonu arttırırlar (Kareem vd., 2014: 5). Prebiyotiklerin dolaylı antimikrobiyal etkisinin, bakteriyosin ve pH'nın düşürülmesi yoluyla patojenleri azaltabilen SCFA gibi fermantasyon ürünlerinin üretiminden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Dunkley vd., 2009: 27; Rehman vd., 2009: 76).

Diyet bileşenlerinin fermantasyonu ile üretilen postbiyotikler arasında, *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* aile üyesi suşlar tarafından üretilen SCFA'lara ve bağırsak mikrobiyotasının başlıca son ürünlerine büyük önem verilmiştir. SCFA'lar, bağırsaktaki anti-inflamatuar özellikleri ve yararlı bakteri suşlarının verimli bir döngü içinde gelişmesini destekleme yetenekleri nedeniyle kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır (Corrêa-Oliveira vd., 2016: 73). Gastrointestinal sistemde SCFA 'lar, lüminal pH'yı azaltabilir ve bazı besin maddelerinin emilimini artırabilir (Macfarlane ve Macfarlane, 2012: 52). Ayrıca, SCFA'lar bağırsak mikrobiyota kompozisyonunu doğrudan etkileyebilir.

Bir yandan, SCFA 'lar bağırsak mikrobiyotası için bir karbon kaynağı olarak hizmet edebilirken, diğer taraftan, yüksek konsantrasyondaki SCFA 'lar bazı bağırsak mikrobiyota türleri (*Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* vb.) üzerinde toksik etkiler sergilerler (Sun ve O'Riordan, 2013: 96). Başta asetat, propiyonat ve bütirat olmak üzere SCFA'lar, diyetle alınan prebiyotiklerin fermantasyonu ile üretilir ve hem lokal hem de sistemik seviyelerde etki gösterebilir (Nataraj vd., 2020: 4). Asetat ve propiyonatin bağırsakta adsorbe edildiği ve dolaşıma girerek kaslara ve diğer dokulara ulaştığı bilinmektedir. Özellikle propiyonat karaciğer tarafından alınır. Bütirat, daha düşük konsantrasyondaki enterositler için bir enerji kaynağı görevi görür, ancak daha yüksek konsantrasyonlarda hücre döngüsünü inhibe eder (LeBlanc vd., 2017: 5). Lokal olarak ise SCFA'lar, inflamatuvar bağırsak hastalıklarında güçlü anti-inflamatuar etkileri açısından incelenmektedir. Ayrıca bağırsak bariyerinin gelişimini destekledikleri ve kolonda kanserli hücrelerinin gelişimini engelleyebildikleri gösterilmiştir (Zeng vd., 2019: 1214). Genellikle artan bağırsak mikrobiyal çeşitliliği ve SCFA üretimi ile ilişkilendirilen diyet lifi alımı sınırlandırıldığında mikrobiyal metabolizma, daha verimsiz substratların, yani diyet ve endojen proteinlerin ve diyet yağlarının fermantasyonuna doğru kayar; bu da daha düşük miktarda SCFA üretimine neden olur ve insan sağlığını olumsuz etkileyebilir (Makki vd., 2018: 706). Bu bağlamda SCFA'lar nörolojik, metabolik ve bağırsak hastalıklarının tedavisinde umut verici ve potansiyel biyo-müdahale ajanları olarak nitelendirilmektedir.

Bakteriyosinler, ribozomal olarak sentezlenmiş ve güçlü bakterisidal veya bakteriyostatik fonksiyonlara sahip küçük antimikrobiyal peptitlerin bir sınıfıdır (Perez vd., 2014: 3). *L. plantarum* suşu tarafından üretilen bakteriyosinler plantarisinler olarak bilinir (Yusuf, 2013: 46). Sınıf II bakteriyosinlere ait olan plantarisinler, amfifilik α -sarmal yapıya sahip, ısıya dayanıklı, küçük (<10 kDa), hidrofobik peptidlerdir (Heeney vd., 2019: 827).

Plantarisinlerin klinik olarak bazı patojen bakteriler için yüksek özgüllüğe sahip olduğu ve çoklu antibiyotiğe dirençli suşlara karşı aktif olduğu bildirilmiştir (Perez vd., 2014: 3). *L. plantarum* suşları, ST28MS, ST26MS, bacST202Ch, bacST216Ch, ST71KS, AMA-K, plantarisin B, D, G, K, K25, S, BN, UG1, S, T, C19, CTC 305, CTC 306, 35d, Q7, MG, 163, ASM1, EF, JK, N, NC8, ZJ008, vb. gibi geniş bir bakteriyosin üretim yelpazesine sahiptir (Buntin ve Hongpattarakere, 2014: 74; Dinev vd., 2018: 3; Enan vd., 1996: 210; Gong vd., 2010: 95; Hata vd., 2010: 96; Liu vd., 2016: 388; Martinez vd., 2013: 380; Todorov ve Dicks, 2005: 321; Todorov vd., 2007: 662; Wen vd., 2016: 435; Zhu vd., 2014: 220).

L. plantarum ST8SH tarafından salgılanan bir bakteriyosinin ve vankomisin antibiyotiginin kombine uygulaması, bazı *Listeria monocytogenes* suşları tarafından üretilen biyofilmin inhibisyonunu sağlamıştır (Todorov vd., 2018: 52). Öte yandan bazı bakteriyosinler, patojen mantarlara ve mayalara karşı da etki göstermiştir. *L. plantarum* sp. TN635 tarafından salınan BacTN635 plantarisini, patojen maya *Candida tropicalis* R2 CIP203'e karşı aktivite göstermiştir (Smaoui vd., 2010: 1142). Benzer şekilde *L. plantarum* MTCC 9503 ve *Lactobacillus acidophilus* NCDC 291 tarafından üretilen bakteriyosinler, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Penicillium* gibi birçok mantar türünün spor canlılığını, spor çimlenmesini ve misel büyümesini azaltmıştır (Garcha, 2018: 624). Plantarisinlerin insan sağlığı üzerine olumlu etkileri de bildirilmiştir. Örneğin, plantarisin E ve plantarisin F'in lökosit, hematokrit ve hemoglobin seviyelerini düzenlediği ve malondialdehit (lipit peroksidasyonu ürünü) seviyelerini düşürdüğü bildirilmiştir (Hanny vd., 2019: 6510). *L. plantarum* genomunun *pln* lokuslarında on dört farklı plantarisin kodlayan genin kolesterol düşürücü ve antioksidan aktiviteye sahip olması da kayda değerdir (Devi ve Halami, 2019: 18). Bakteriyosin uygulamalarından biri de potansiyel antikanser ajanları olarak kullanılmasıdır (Baindara vd., 2018: 10396). İlginç bir şekilde bakteriyosinler, büyük olasılıkla sağlıklı ve kanser hücrelerinin zarlarının karakteristik farklılıkları nedeniyle, kanser hücrelerine karşı seçici olarak etki edebilmektedir (Meade vd., 2020: 32). *L. plantarum* PBS067 suşundan izole edilen plantarisin P1053'ün, sağlıklı hücrelerin canlılığını artırarak ve kanser hücrelerinin çoğalmasını azaltarak insan epitel hücre hatlarında olumlu etkiler gösterdiği de rapor edilmiştir (De Giani vd., 2019: 9). Dünyada hızla artan mikrobiyal direnç nedeniyle doğal antibakteriyel maddelerin kullanımı günümüzün acil bir ihtiyacı haline gelmiştir. Bilimsel çalışmalar, plantarisinlerin doğal ve güvenli antimikrobiyal peptidler olarak patojen bakteri/mayalara karşı antimikrobiyal etkilerinin yanı sıra antikanser özellikler sergilediğini de ortaya koymuştur.

Dolayısıyla, plantarisinlerin çeşitli yan etkiler gösteren kimyasal kökenli ilaç moleküllerinin yerine alternatif biyolojik ajan olarak kullanılması önerilmektedir (Mokoena, 2017: 1255).

L. plantarum, mükemmel antimikrobiyal aktiviteye sahip önemli bir LAB türü olarak kabul edilir. Bundan dolayı *L. plantarum* suşları, gıda endüstrisinde etkili biyo-koruyucular olarak veya zorlu/inatçı patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde destekleyici terapötik ajanlar olarak kullanılabilir. Bu kapsamda *L. plantarum* kökenli postbiyotiklerin yeni ve daha etkin bir yaklaşım olarak koruyucu ve terapötik alternatifler olarak kullanımı umut vadetmektedir.

Özetle tanımlanmış kompozisyonel ve fonksiyonel mikrobiyom değişiklikleri, yaygın multifaktöriyel hastalıkların patogenezi ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, mikrobiyomun değiştirilmiş metabolit profillerinin çok sayıda hastalıkla bağlantılı olabileceği açıktır. Bu değişmiş metabolit seviyeleri ve kombinasyonları, bağışıklık fonksiyonunu ve metabolizmayı ve aynı zamanda fizyolojik fonksiyonları etkileyebilir (Blacher vd., 2017: 578). Son veriler, diyetin mikrobiyota kompozisyonunu dolayısıyla oluşacak metabolit profillerini etkileyebileceğini göstermekte olup, diyet-mikrobiyom ilişkisinin konakçı organizma fizyolojisi üzerinde son derece önemli etkileri olduğuna işaret etmektedir. Tapyoka nişastasının bağırsak bakterileri üzerindeki "bifidojenik etkisi" ve probiyotik bakteriler tarafından fermente edilebilirliği hakkında literatürde yer alan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu tez çalışması kapsamında, dirençli tapyoka nişastasının tek başına ve yağsız süt tozu ile kombinasyon halinde probiyotik *L. plantarum* üzerindeki probiyotik aktivite uyarıcı etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Prebiyotikler ile desteklenen *L. plantarum* hücresiz post-fermantasyon ortamının anti-mikrobiyal, anti-biyofilm ve anti-kanser etkinlikleri araştırılarak, hücresiz post-fermantasyon ortamının mevcut metabolit içeriği FTIR spektroskopisi ile tekniği ile incelenmiştir.

3. MATERYAL METOT

3.1. Besiyerinin Hazırlanması ve Bakteriye Büyüme Koşulları

Ortam bileşenlerinin *L. plantarum* büyüme kinetiği üzerindeki etkisini ve *L. plantarum* hücre içermeyen süpernatantının anti-bakteriyel ve anti-kanser etkilerini değerlendirmek için probiyotik bakteriler, tek başına veya kombinasyon halinde tapyoka modifiye nişastası (Tapioca Modified Starch-TMS) ve yağsız süt (Skim Milk-SM) ile inkübe edilmiştir. TMS, bunzen beki üzerinde kaynatılarak dH₂O ile çözündürülmüştür. Takiben De Man, Rogosa ve Sharpe (MRS) sıvı besiyeri bileşenleri (kazein pepton 10 g/L, et özütü 8 g/L, maya özütü 4 g/L, di-potasyum fosfat 2 g/L, Tween 80 1,1 mL/L, di-amonyum hidrojen sitrat 2 g/L, sodyum asetat 5 g/L, magnezyum sülfat 0.2 g/L, manganez sülfat 0.04 g/L) glikoz hariç olmak üzere çözünmüş TMS üzerine ilave edilerek elde edilen besi yeri 121°C 'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Alevle kaynatma ve ardından otoklavlama sonucunda hem kültür işlemi için gerekli steril koşullar sağlanmış hem de probiyotik bakteriler tarafından metabolize edilecek TMS'nin dirençli nişasta oranları artırılmıştır (Kasote vd., 2018: 1). Yağsız süt tozu (%0 yağ, Sigma) dH₂O içinde çözündürülmüş ve 90°C'de 5 dakika sterilize edilerek TMS'li veya TMS'siz sterilize edilmiş ve soğutulmuş MRS ortamına ilave edilmiştir. Aksi belirtilmedikçe MRS ortamı, yalnızca potansiyel birincil karbon kaynağı olarak TMS'nin etkisini belirlemek için glikozsuz (G-) olarak hazırlanmıştır. Karşılaştırma için pozitif kontrol olarak glikoz içeren (G+) MRS besi yeri (20 g/L glikoz) kullanılmıştır. *L. plantarum* B-1846 suşu (Lp olarak kısaltılmıştır), daha önce bildirildiği şekli ile (Gurbanov vd., 2021: 200) düşük oksijen koşulları altında 37°C'de çalkalama inkübatörde (160 rpm) ve yukarıda belirtilen farklı besi yeri ortamlarında (Tablo 3.1) büyütülmüştür. Probiyotik bakteri inoküle edilmemiş ancak aynı koşullarda inkübe edilen besi yeri “sadece besi yeri (Only medium-OM)” kontrolü olarak kullanılmıştır.

Tablo 3. 1. Deneysel Koşullar

Lactobacillus plantarum büyümesi için kullanılan büyüme ortamları. Lp: *Lactobacillus plantarum*; TMS: Modifiye tapyoka nişastası; MRS broth: De Man, Rogosa ve Sharpe; SM: Yağsız süt tozu; G: Glikoz

Çalışmada kullanılan <i>Lactobacillus plantarum</i> büyüme ortamları				
Lp + MRS broth G(-)	Lp + MRS broth + %1.0 (v/w) SM G(-)	Lp + MRS broth + %0.5 (v/w) TMS G(-)	Lp + MRS broth + %0.5 TMS (v/w) + %1.0 (v/w) SM G(-)	Lp + %2 (v/w) glikoz içeren G(+) MRS broth

3.2. Büyüme Dinamiklerinin Belirlenmesi

Bakteri kültürlerinin büyüme dinamiklerinin belirlenmesi için, kültürlerin 600 nm'de (OD₆₀₀) optik yoğunlukları 72 saat boyunca 2 saatte bir ölçülmüştür. Ayrıca fermantasyon ortamının pH değişimini belirlemek için her 2 saatte bir numune alınarak pH metre cihazında ölçüm yapılmıştır. Her bir deney koşulunda probiyotik canlılığı belirlemek için CFU'lar (Koloni Oluşturan Birimler) sayılmış ve CFU/mL olarak hesaplanmıştır. Bunun için 100 µL numuneler 1 mL MRS broth içinde seri dilüsyonlara (10⁻¹-10⁻⁷) tabi tutulmuş ve her dilüsyondan 100 µL alınarak MRS agar plakalarına yayılmıştır. Plakalar, 37°C'de 48 saat süreyle inkübe edilmiş, inkübasyonun sonunda koloniler sayılarak CFU/mL değerleri belirlenmiştir.

3.3. Hücresiz Post-Fermantasyon Ortamın Elde Edilmesi

Biyofonksiyonel çalışmalarda kullanılmak üzere hücresiz süpernatantlar, daha önce bildirildiği gibi elde edilmiştir (Tunçer ve Karaçam, 2020: 2828). Kısaca, *L. plantarum*, yukarıda belirtildiği şartlar altında 14 saat boyunca 15 mL falkon tüplerde büyütülmüş, inkübasyon sonunda fermantasyon ortamı 4°C'de 1844 xg'de 10 dakika süreyle santrifüjlenmiş, ardından süpernatantlar toplanarak mikrofiltrasyona (0.22 µm PES membran) tabi tutulmuştur. Tez çalışması kapsamında filtratlar, *L. plantarum*'un hücre içermeyen süpernatantını (Lp supernatant) belirtmek için "SLp" olarak adlandırılarak 1.5 mL steril eppendorf tüplerine alikotlanarak toplanmış ve sonraki deneylerde kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır.

3.4. Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi

L. plantarum hücresiz post-fermantasyon ortamının antibakteriyel aktivitesi, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ve *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) üzerinde analiz edilmiştir. *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae* suşları, kazein 17 g/L, soya peptonu 3 g/L, sodyum klorür 5 g/L di-potasyum fosfat 2.5 g/L, dekstroz 2.5 g/L içeren triptik soya besiyeri (TSB; Merck Cat No: M105459.0500) ortamında büyütülmüştür. Her iki suşun gecelik kültürü (10^6 CFU/mL) 96 kuyulu plakalarda (Nest Scientific, Maryland, ABD) % 50 (v/v) hücresiz post-fermantasyon ortamı (TSB içinde) veya kontrol büyüme ortamı (%50 v/v OM, TSB içinde) ile 37°C'de 24 saat boyunca çalkalanmadan inkübe edilmiştir. Probiyotik hücre içermeyen süpernatantların patojen büyümesini inhibe edici etkilerini belirlemek için *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae* suşlarının OD₆₀₀ değerleri, 24 saatlik inkübasyonun sonunda çok kuyulu plaka okuyucu (Multiskan FC, Thermo Scientific, Massachusetts, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Agar spot plaka deneyleri için, *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae*, 96 kuyulu plakalarda % 50 (v/v) hücresiz post-fermantasyon ortamı (veya kontrol büyüme ortamı, OM) içeren TSB'de 24 saat büyütüldükten sonra TSB içerisinde seri seyreltmeye tabi tutulmuş, her seyreltmeden 3.0 µL alınarak triptik soya agar (TSA) petrilere damlatma yapılmış ve petrilere gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Damlatmalar, G: BOX Chemi XRQ görüntüleme sistemi (Syngene, İngiltere) kullanılarak fotoğraflanmıştır.

3.5. Antibiyofilm Aktivitenin Belirlenmesi

L. plantarum hücresiz süpernatantının anti-biyofilm etkisinin belirlenmesi için statik biyofilm oluşum deneyleri daha önce belirtildiği şekli ile ancak bazı modifikasyonlar uygulanarak gerçekleştirilmiştir (Zamani vd., 2017: 40). Bunun için, biyofilm ürettiği bilinen bir bakteri olan *P. aeruginosa*'nın gecelik kültürü 10^6 CFU/mL olacak şekilde 96 kuyulu polistiren plakalara (Nest Scientific) 100 µL/kuyu olarak inoküle edilerek 8 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyulardaki besiyeri uzaklaştırılmış ve plakalar, planktonik hücreleri uzaklaştırmak için kuyu başına 120 µL fosfat tamponlu tuz çözeltisi (Phosphate Buffered Saline-PBS) ile üç kez yıkanmıştır. Takiben, kuyu başına 120 µL *L. plantarum* hücresiz post-fermantasyon ortamı ve her grubun kontrol ortamı (OM) eklenmiş ve plakalar 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda *L. plantarum* hücresiz süpernatantı veya OM uzaklaştırılmış ve kuyular üç kez dH₂O ile yıkanmıştır. Fiksasyon için kuyulara 150 µL metanol eklenmiş ve plakalar, oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir.

Metanol uzaklaştırılıp oda sıcaklığında kuruma gerçekleştikten sonra, kuyularında oluşan statik biyofilmler, kristal mor (Crystal violet-CV) boyama yöntemi ile değerlendirilmiştir (Tunçer ve Karaçam, 2020: 2828). Bu amaçla her kuyuya 130 µL % 0,1 (w/v) CV (Sigma-Aldrich) boya solüsyonu eklenerek plakalar 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiş, inkübasyon sonunda boya uzaklaştırılmış ve dH₂O içeren kaplara plakaların daldırılması suretiyle üç kez yıkama yapılmıştır. Oda sıcaklığında gerçekleştirilen kurutmadan sonra biyofilme bağlı CV'yi çözmek için her bir kuyuya 130 µL % 30 asetik asit (v/v, dH₂O içinde) eklenmiş, her kuyunun OD'si, çok kuyulu plaka okuyucu (Multiskan FC, Thermo Scientific) kullanılarak 550 nm'de ölçülmüştür. İnoküle edilmemiş kültür ortamı içeren kuyular, kör (blank) olarak kullanılmıştır.

3.6. Hücre Kültürü, Muamelesi ve MTT Deneyleri

Probiyotik hücre içermeyen süpernatantların anti-kanser etkinliği, HCT-116 kolon kanseri hücreleri üzerinde *in vitro* olarak araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan HCT-116 kolon kanseri hücreleri, %10 fetal sıgır serum (FBS), %1 pen/strep, 2.8% v/v NaHCO₃ (7.5%, w/v) içeren, 10.5 g/L RPMI-1640 (cat. no: 11-100; Biological Industries, Israil) besi yerinde (pH 7.5), 37°C'de, % 5 CO₂, %95 hava içeren nemli inkübatörde büyütülmüştür (Karaçam ve Tunçer, 2021: 10).

Hücesiz post-fermantasyon ortamının kolon kanseri hücreleri üzerindeki etkisini belirlemek için MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) deneyi yapılmıştır (Onat vd., 2019: 25). MTT deneyi, biyolojik olarak aktif olan hücrelerde tetrazolyum bileşiğinin, Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) bağımlı hücresel oksidoredüktaz enzimleri tarafından mor renkli çözünmeyen formazana indirgenmesi prensibine dayanır (Kuete vd., 2017: 275). Oluşan formazan kristalleri uygun bir çözelti kullanılarak çözdürülür ve renk değişimi 500-600 nm'de ölçülür. Çözelti ne kadar koyu olursa, metabolik olarak aktif (canlı) hücrelerin sayısı o kadar fazla olur (Mosmann, 1983: 59).

MTT deneyi için HCT-116 hücreleri, 96 kuyulu bir plakaya 1x10⁴ hücre / kuyu olarak şekilde ekilmiş ve sonraki gün, % 30 (v/v), post-fermantasyon hücesiz süpernatant (SLp) veya kontrol ortamı (OM) içeren RPMI-1640 besi yeri ile inkübe edilmiştir. 37°C'de ve % 5 CO₂, % 95 hava inkübatöründe 24 saat inkübasyonun ardından besi yeri uzaklaştırılmış ve hücreler, 1.2 mM MTT içeren 100 µL besi yeri ile 4 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. MTT indirgeme ürünü formazan kristallerini çözmek için SDS-HCl çözeltisi kullanılmıştır.

Bunun için her bir kuyuya 100 µL SDS-HCl (10 ml 0.01 M HCl içinde 1 g SDS) çözeltisi eklenmiş ve plakalar 16 saat boyunca 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda ise her bir kuyudaki renk değişimi 570 nm absorbansta, çok kuyulu plaka okuyucu (Multiskan FC, Thermo Scientific) kullanılarak ölçülmüş ve MTT indirgenmesi, kontrol ortamı (OM) ile muamele edilmiş hücrelere göre yüzde olarak hesaplanmıştır. Blank olarak MTT ajanı ve SDS eklenmiş ancak hücre içermeyen kuyulardan alınan absorbans değerleri kullanılmıştır. Hücreler, MTT ve western blot deneyleri öncesinde Nikon Eclipse TS100 (Japonya) ters ışık mikroskobu ile 4X objektif lens ile gözlenmiş ve Toupcam (Çin) HD kamera ile fotoğraflanmıştır.

3.7. Hücresiz Post-Fermantasyon Ortamından Protein Çöktürme

Hücresiz post-fermantasyon ortamında bulunan proteinler, trikloroasetik asit (TCA)-aseton yöntemi kullanılarak çöktürülmüştür (Link ve LaBaer, 2011: 993). Proteazları inhibe etmek için fenilmetil sülfonil florür (PMSF, 1mM) eklenmiş örnekler (1 mL), 0.11 hacim buzda beklemiş % 100 (v/w) TCA çözeltisi ilave edilmiştir (1 mL numune için 110 µL). 10 dakika boyunca buz üzerinde inkübasyon ardından 500 µL buzda beklemiş % 10 (v/w) TCA solüsyonu eklenmiş ve 20 dakika boyunca buz üzerinde inkübasyona devam edilmiştir. +4°C 'de 30 dakika boyunca 20.000 xg'de gerçekleştirilen santrifüj sonunda süpernatant, protein pelletini bozmadan dikkatlice uzaklaştırılmış ve pellete 500 µL soğuk aseton ilave edilmiş ve pelleti yıkamak için tüp nazikçe bir -iki kez çalkalanmıştır. Tüpler 20.000 xg'de 10 dakika süreyle +4°C'de santrifüj edilmiş ve protein pelletini bozmamak için süpernatant çok dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır. Protein pelleti, tüp kapağı açık (20 dakika) bırakılarak havayla kurutulmuştur. Pellet 50 µL 2x SDS yükleme tamponunda süspanse edildikten sonra 100°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Örnekler SDS yükleme tamponu eklendiğinde, bromofenol mavisi içeriğinden dolayı mavi renk oluşur, mavi yerine koyu sarı görünüyorsa TCA kontaminasyonunu gösterir (Link ve LaBaer, 2011: 994). TCA kalıntısından kurtulmak için protein örneklerine 1 M Tris-HCl tampon solüsyonu (pH 8.0) damlatılmış ve mavi renk alması sağlanmıştır. Bu şekilde denatüre edilen protein örnekleri ya hemen SDS-PAGE deneyinde kullanılmış ya da daha sonra kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır. Saklanması halinde kullanımdan önce bir kez daha denatürasyon uygulanmıştır.

3.8. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroföresi (SDS-PAGE)

2.6 mL dH₂O, 2.1 µL 4x ayırma tamponu (0,5 M Tris 181.7 g/L, SDS 3.84 g/L, pH 6.8), 3.3 mL akrilamid/bis akrilamid, 40.0 µL amonyum persülfat ve 10.0 µL TEMED'ten oluşan % 12.5 ayırma (separating) jeli () ve 1.8 mL dH₂O, 780 µL 4x yığılma tamponu (5 M Tris 60.56 g/L, SDS 3.84 g/L, pH 8.8), 400 µL akrilamid/bis akrilamid, 15.0 µL amonyum persülfat ve 3.75 µL TEMED'ten oluşan % 4 yığılma (stacking) jelinden (oluşan protein jeli hazırlanmış ve proteinler, SDS-PAGE sistemi (OmniPage Mini, Clever Scientific) kullanılarak ayrılmıştır. Bunun için 2x SDS yükleme tamponunda denatüre edilmiş proteinler 30 µL olacak şekilde kuyulara yüklenerek 70V'de stacking jel (üst jel) ve 110V'de separating jel (alt jel) boyunca yürütülmüştür. Yürütme işlemi bittiğinde jel 15 dakika boyunca Coomassie brillant mavi G-250 boyama tamponunda (% 50 metanol, % 10 asetik asit, % 0,1 Coomassie brillant mavi) shaker kullanılarak inkübe edilmiştir. 15 dakika sonunda sonunda jel % 10 (v/v) asetik asit, % 40 (v/v) metanol ve % 50 dH₂O içeren yıkama solüsyonuna alınarak gece boyunca, oda sıcaklığında, shaker üzerinde inkübe edilmiştir. Boyadan arındırılan jel, G: BOX Chemi XRQ jel dokümantasyon sistemi (Syngene) ile görüntülenmiştir. Eksprese edilen proteinlerin toplam miktarları (% bant alanı), ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) görüntü işleme programı kullanılarak hesaplanmıştır. 11-245 kDa Protein Ladder (Applied Biological Materials Inc. Cat.No: G266), protein bantlarının moleküler ağırlığını (MW) belirlemek için kullanılmıştır.

3.9. Western Blot

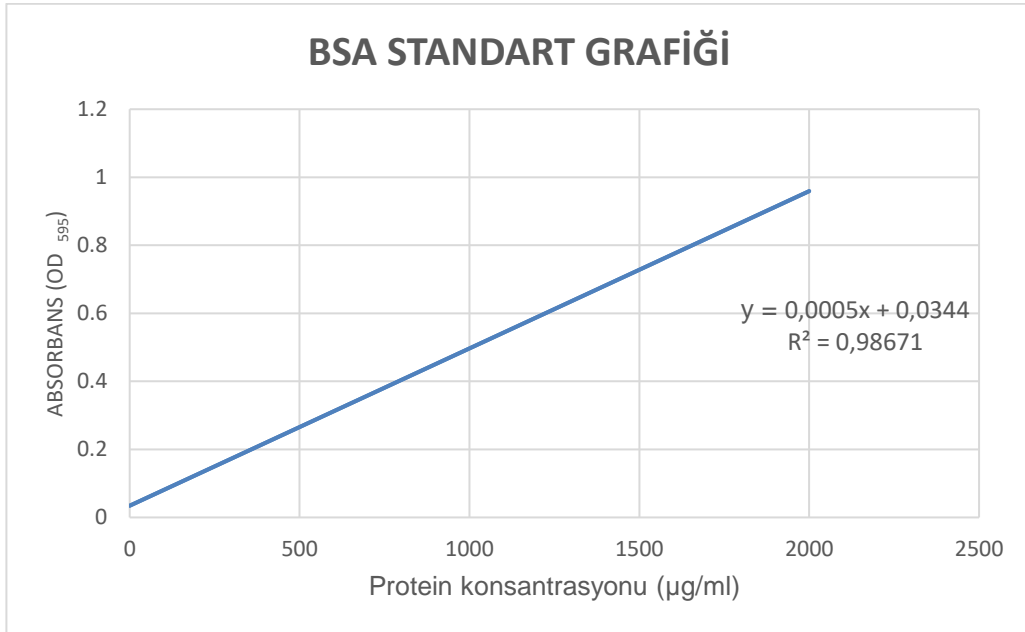
HCT-116 kolon kanseri hücrelerinin *L. plantarum* post-fermantasyon ortamı ile muamele edildiğinde apoptozisi tetikleyip tetiklemediğini değerlendirmek için, anti-apoptotik protein X'e bağlı apoptoz inhibitörünün (XIAP) ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler western blot kullanılarak incelenmiştir. Bu amaçla HCT-116 hücreleri, 24 kuyulu plakaya 3x10⁵ hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. Gece boyunca inkübasyonun ardından hücreler, % 30 (v/v) post-fermantasyon hücresiz ortam (SLp) veya kontrol ortamı (OM) ile 24 saat boyunca 37°C'de ve %5 CO₂, %95 hava içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda besi yeri uzaklaştırılmış ve toplam hücre proteinleri daha önce belirtildiği şekilde izole edilmiştir (Tunçer vd., 2020: 334). Total protein izolasyonu için hücreler buz üzerinde, soğuk PBS kullanılarak yıkanmış ve lizis, proteaz (Roche, Switzerland) ve fosfataz inhibitör kokteyli (Roche) içeren 60 µL T-PER (Thermo Scientific) protein ekstraksiyon tamponu kullanılarak yapılmıştır.

Lizis tamponu eklenen hücreler eppendorflara hücre kazıyıcı (scraper) kullanılarak toplanmıştır ve her 10 dakikada bir kuvvetli bir şekilde vorteksenerek 30 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda proteinler, 14.000 xg'de, 4°C'de, 15 dakika boyunca santrifüjlenen örneklerin üst fazının toplanması ile elde edilmiştir. Western blot'ta kullanılacak proteinlerin miktar tayini için Bradford ajanı (Comassie Plus Protein Assay Reagent, Thermo Scientific) kullanılmıştır. Bunun için öncelikli olarak BSA (Bovin Serum Albumin)'nın bilinen konsantrasyonları ile bir standart eğri oluşturulmuştur. Bu eğrinin oluşturulmasında üretici firmanın (Comassie Plus Protein Assay Reagent, Thermo Scientific, ABD, Cat.No:23238) talimatları takip edilmiştir. Kullanılan BSA dilüsyonları Tablo 3.2'de verilmiştir. Western blot'ta SDS jele yüklenecek proteinlerin miktarını belirlemek amacı ile protein konsantrasyonu, elde edilen bu standart eğriye göre belirlenmiştir (Şekil 3.1).

Western blot için, 15 µg protein, % 12 SDS, % 30 β-merkaptoetanol, % 30 gliserol, % 0.02 bromofenol mavisi, 375 mM Tris HCl (pH 6.8) içeren 6X yükleme boyası ile 95°C'de 6 dakika kaynatılmış, % 10'luk ayırma (separating) jeli ve % 4'lük yığılma (stacking) jeli olacak şekilde hazırlanan SDS-PAGE'e yüklenmiş ve 70V'da stacking jel (üst jel) ve 110V'da seperating jel (alt jel) boyunca yürütülmüştür. Jeldeki proteinlerin Poliviniliden florür (PVDF) membrana aktarımından önce membran 30 saniye metanol ile aktive edilmiş ve ardından 5 dakika transfer tamponunda bekletilmiştir. Proteinler Hoefer TE70XP yarı-kuru transfer sistemi (Massachusetts, ABD) kullanılarak 200 mA'da 1.5 saat süreyle poliviniliden diflorür (PVDF) membrana aktarılmıştır. Membran, TBS-T (Tris tamponlu salin, % 0.1 Tween 20) içerisinde hazırlanan % 5 yağsız süt tozu ile 1 saat bloke edildikten sonra, XIAP (Cat. No: sc-11426, Santa Cruz Biotechnology, Texas, ABD; % 5 yağsız süt içinde 1:300 seyreltme) antikoru ile gece boyu, +4°C'de inkübe edilmiştir. Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrojenaz (GAPDH, kat. No: sc-25778, Santa Cruz Biotechnology; % 5 yağsız süt içinde 1:1000 seyreltme) ise yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Primer antikor toplandıktan sonra membran 3 kez 15 dakika boyunca 1X TBS-T ile yıkanmış ve ardından HRP konjuge ikincil antikor (G-HRP, kat. no: bs-0295, anti-rabbit, Bioss, Massachusetts, ABD; % 5 yağsız süt içinde 1:1000 seyreltme) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. 3 kez 15 dakika boyunca 1X TBS-T ile yıkanan membran, ECL solüsyonu (Bio-Rad, California, ABD) kullanılarak Syngene G: BOX görüntüleme cihazında görüntülenmiştir.

Tablo 3. 2. BSA Standart Eğrisi için Seyreltme Şeması (Çalışma Aralığı = 100–1500 µg / mL)

Ependorf etiketi	Dilüsyon miktarı	BSA (2mg/ml) kaynağı ve hacmi	Final BSA konsantrasyonu
A	0	300 µl stok BSA	2000 µg/ml
B	125 µl	375 µl stok BSA	1500 µg/ml
C	325 µl	325 µl stok BSA	1000 µg/ml
D	175 µl	175 µl B dilüsyonu	750 µg/ml
E	325 µl	325 µl C dilüsyonu	500 µg/ml
F	325 µl	325 µl E dilüsyonu	250 µg/ml
G	325 µl	325 µl F dilüsyonu	125 µg/ml
H	400 µl	100 µl G dilüsyonu	25 µg/ml
I	400 µl	0	0 µg/ ml = Blank



Şekil 3. 1. BSA Standart Grafiği

3.10. ATR-FTIR Spektroskopi Ölçümleri ve Veri Analizi

L. plantarum hücresiz post-fermantasyon ortamı içerisindeki metabolitler FTIR tekniği kullanılarak incelenmiştir. 10 µL hücresiz post-fermantasyon ortamı, ATR (Attenuated Total Reflectance) ünitesinin (MIRacle, PIKE) Zn/Se kristali üzerine yerleştirilmiş ve inert azot gazı (N₂) ile 5 dakika süreyle kurutulmuştur. Örnekler ATR-FTIR spektrometresi (Frontier FTIR Spectrometer, Perkin Elmer) ile 4 cm⁻¹ çözünürlük, 32 tarama olarak 4000-650 cm⁻¹ spektral aralığında toplanmıştır. Spektrumlar her biri iki teknik replike içermek üzere üç biyolojik replikeden hem bakteriyel post-fermantasyon ortamları hem de bakteri uygulanmamış kontrol ortamları için elde edilmiştir. Her bir post-fermantasyon ortamının spektrumunun karşılık gelen kontrol besi yeri spektrumlarından farkı alınarak elde edilen fark (difference) spektrumlar, detaylı spektral veri analizleri için kullanılmıştır. Spektrumların eldesi Spectrum One (Perkin Elmer) yazılımı ile, spektral veri analizi OPUS 5.5 (Bruker) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İncelenen spektrumlardan elde edilen her bir gruba ait ortalama spektrumlar, değişimlerin görsel ifadesi için temel çizgi (baseline) düzeltilmesi yapıp normalize edilmiş olup, detaylı spektral analizlerde ise ham spektrumların OPUS 5.5 (Bruker) yazılımı ile farklı spektral bölgelerde ikincil türevleri alınarak vektör-normalizasyonu uygulanmış ve % 10 sensivity pikler seçilmiştir. Bu şekilde işlenen spektrumlardaki çeşitli biyomoleküllere özgü bantların birim zamandaki dalga sayısı ve mutlak yoğunlukları (absolute intensity) analiz edilmiştir (Gurbanov ve Tunçer, 2021; 15).

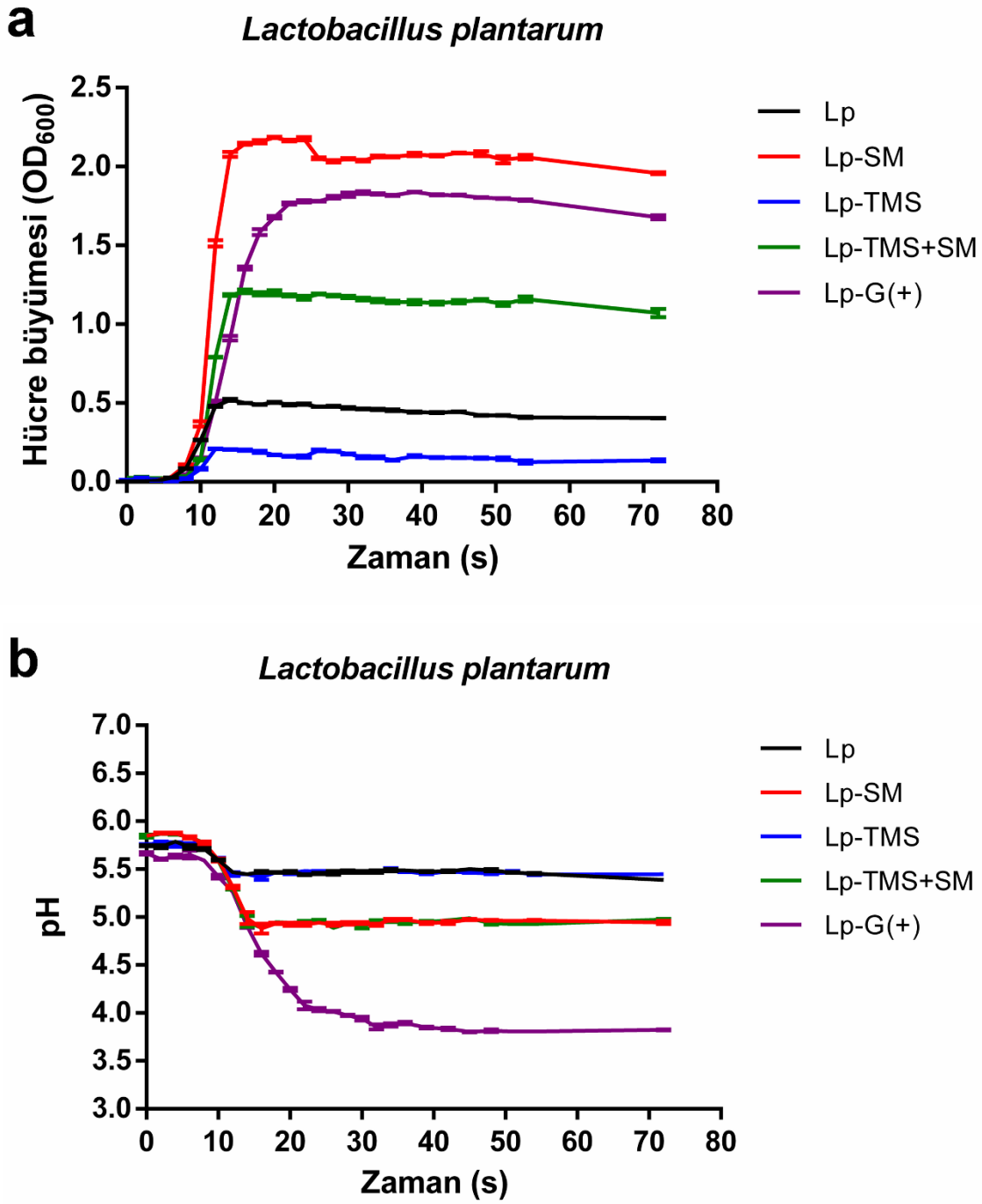
3.11. İstatistiksel Analiz

Sonuçların istatistiksel değerlendirmeleri ve grafik çizimleri GraphPad Prism 6.01 (GraphPad, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Veriler unpaired t-test uygulanarak analiz edilmiş olup anlamlılık dereceleri P 0,05 *, P ≤ 0,01 **, P ≤ 0,001 ***, P ≤ 0,0001 **** olarak belirtilmiştir. Sonuçlar ortalama (Mean) ± standart hata (SEM-standard error of the mean) olarak ifade sunulmuştur. Deneyle her biri en az dört teknik replikeden oluşmak üzere en az iki kez tekrarlanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Modifiye Tapyoka Nişastası ve Yağsız Süt Tozunun *Lactobacillus plantarum* Büyüme Dinamikleri Üzerindeki Etkisi

Glikoz içermeyen ancak SM (Lp-SM) ve TMS (Lp-TMS) ile tek başına veya kombinasyon halinde (Lp-TMS+SM) MRS besiyeri içerisinde 72 saat boyunca inkübe edilen *L. plantarum*'un büyümesi, 600 nm'de optik yoğunluklar ölçülerek belirlenmiştir (Şekil 4.1a). İnkübasyon boyunca, her 2 saatte bir bakteri kültürlerinin pH'sı ölçülerek büyüme ortamının pH'sındaki değişiklikler de belirlenmiştir (Şekil 4.1b). Önceki raporlara göre (Minato ve Suto, 1979: 82; Crittenden vd, 2001: 3472), optik yoğunluklar ve CFU sayıları arasındaki tutarsızlık, probiyotik bakterilerin nişastaya yapıştığını gösterir. Belirli bakterilerin nişasta granüllerine bağlanabildiği ve bu bağlanma yeteneğinin popülasyonun optik yoğunluğunun azalmasına neden olduğu bilindiğinden (Minato & Suto, 1979: 82), *L. plantarum*'un büyüme modeli, her büyüme koşulu için CFU sayımları yapılarak da incelenmiştir (Tablo 4.1). CFU sayıları, glikoz içermeyen büyüme ortamına SM eklenmesinin *L. plantarum* büyümesini arttırdığını ve yağsız süt tozu içeren ortama ayrıca tapyoka nişastasının eklenmesinin (TMS+SM) probiyotik bakterilerin büyümesini teşvik ettiğini göstermektedir. Ayrıca bakteri üremesinin bir göstergesi olarak, SM veya SM+TMS ile büyütülen *L. plantarum* için başta laktik asit olmak üzere organik asitlerin üretiminden kaynaklanmak üzere fermantasyon ortamının pH'sında bir düşüş de gözlenmiştir (Ummadi ve Curic-Bawden, 2010: 110): Lp ve Lp-TMS grupları için büyüme ortamının pH'sı, bakteri büyümesi durağan faza ulaşmadan önce pH 5.5'i gösterirken, Lp-SM ve Lp-TMS+SM grupları için ortamın pH seviyesi 5.0 civarına düşmüştür (Şekil 4.1b). Büyüme eğrilerine dayanarak elde edilen bir diğer sonuç, durağan fazın başlangıcının inokülasyonu takiben yaklaşık 14 saat sonra olmasıdır (Şekil 4.1a). Önceki çalışmalarda *L. plantarum* tarafından üretilen antimikrobiyal biyomoleküllerin konsantrasyonunun, büyümenin durağan fazının başlangıcında maksimuma ulaştığı rapor edildiğinden (Messi ve diğerleri, 2001: 195), probiyotik süpernatantlar, bundan sonra gerçekleştirilecek olan biyofonksiyonellik deneylerinde kullanılmak üzere 14 saatlik inkübasyondan sonra toplanmıştır.



Şekil 4 1. Modifiye Tapyoka Nişastası ve Yağsız Süt Tozu Varlığında Büyütülen *Lactobacillus plantarum*'un Büyüme Dinamikleri

72 saat boyunca, a) *L. plantarum*'un büyümesi 600 nm'de optik yoğunlukları ölçülerek belirlenmiş ve b) büyüme ortamının pH'sı 2 saatte bir ölçülmüştür. Büyüme ve pH eğrileri zamanın fonksiyonu olarak çizilmiştir. Üç bağımsız tekrara ait sonuçlar ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur. Lp: *Lactobacillus plantarum*; SM: Yağsız süt; TMS: Modifiye tapyoka nişastası; G: Glikoz.

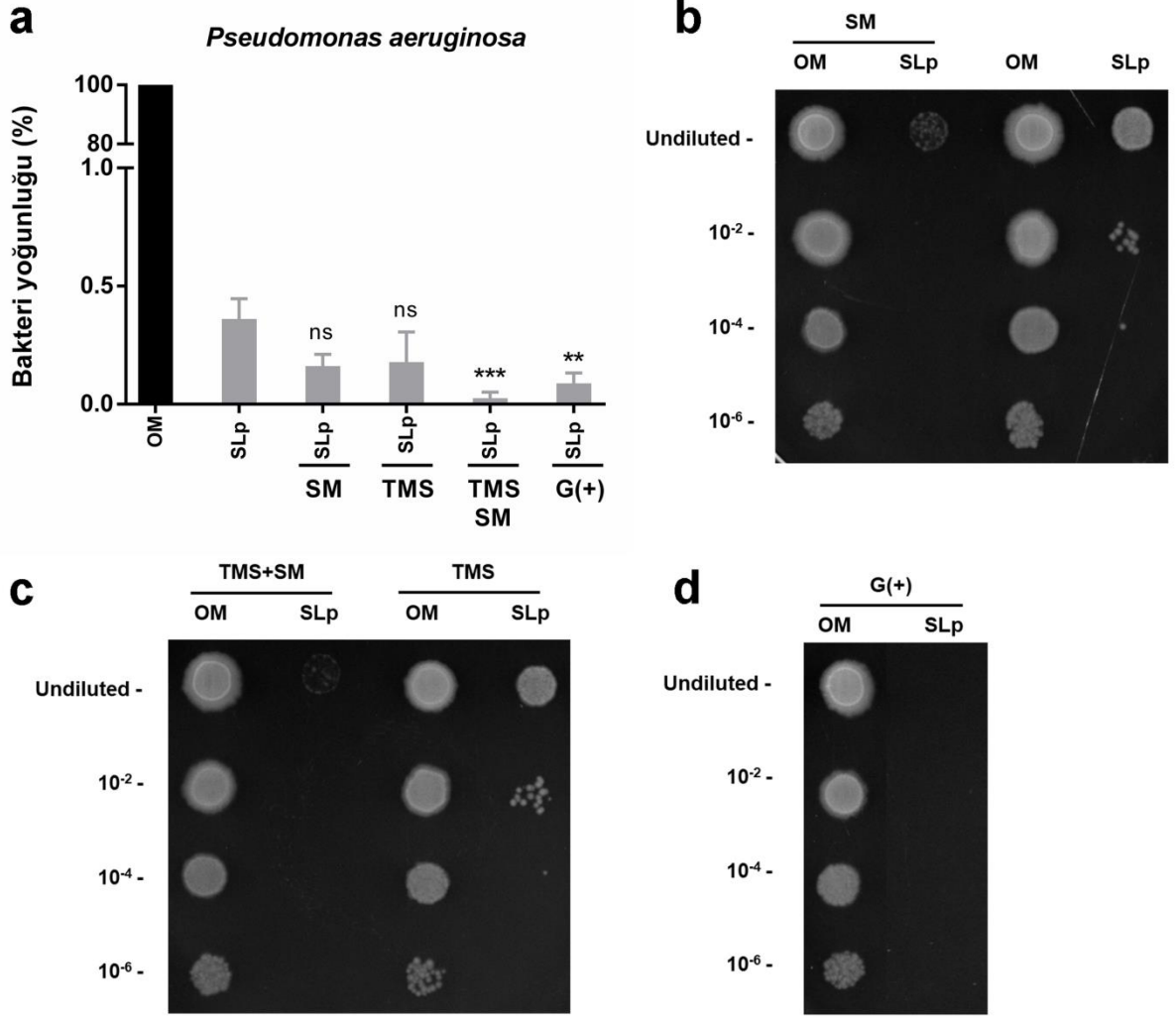
Tablo 4. 1. Yağsız Süt Tozu Ve Modifiye Tapyoka Nişastası Varlığında Büyütülen *Lactobacillus plantarum*'un Koloni Oluşturan Birimleri (CFU'lar)

Her saat için belirlenen hücre sayıları CFU/mL olarak ifade edilmiştir. Üç bağımsız tekrara ait sonuçlar ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur. İstatistiksel anlamlılık, Lp gruplarına göre t-test kullanılarak belirlenmiştir ($P \leq 0.01$ **, $P \leq 0.001$ ***, $P \leq 0.0001$ ****, ns=non-significant).

DeneySEL Gruplar	CFU/mL			
	10 s	14 s	34 s	72 s
Lp	8.833x10 ⁷ \pm 1.764x10 ⁶	2.557x10 ⁸ \pm 1.417 x10 ⁷	1.850x10 ⁸ \pm 1.732x10 ⁶	9.400 x 10 ⁷ \pm 3.055x10 ⁶
Lp-SM	1.747x10 ⁸ \pm 1.525x10 ⁷ (**)	1.043x10 ⁹ \pm 1.202x10 ⁷ (****)	1.337x10 ⁹ \pm 4.485x10 ⁷ (****)	1.000x10 ⁷ \pm 0.0 (***)
Lp-TMS	8.967x10 ⁷ \pm 1.041x10 ⁷ (ns)	2.745x10 ⁸ \pm 4.550x10 ⁷ (ns)	2.677x10 ⁸ \pm 3.528x10 ⁶ (****)	1.807x10 ⁸ \pm 1.719x10 ⁷ (**)
Lp-TMS+SM	1.565x10 ⁸ \pm 2.500x10 ⁶ (***)	2.235x10 ⁹ \pm 1.350x10 ⁸ (***)	6.850x10 ⁸ \pm 5.500x10 ⁷ (**)	2.000x10 ⁷ \pm 0.0 (***)

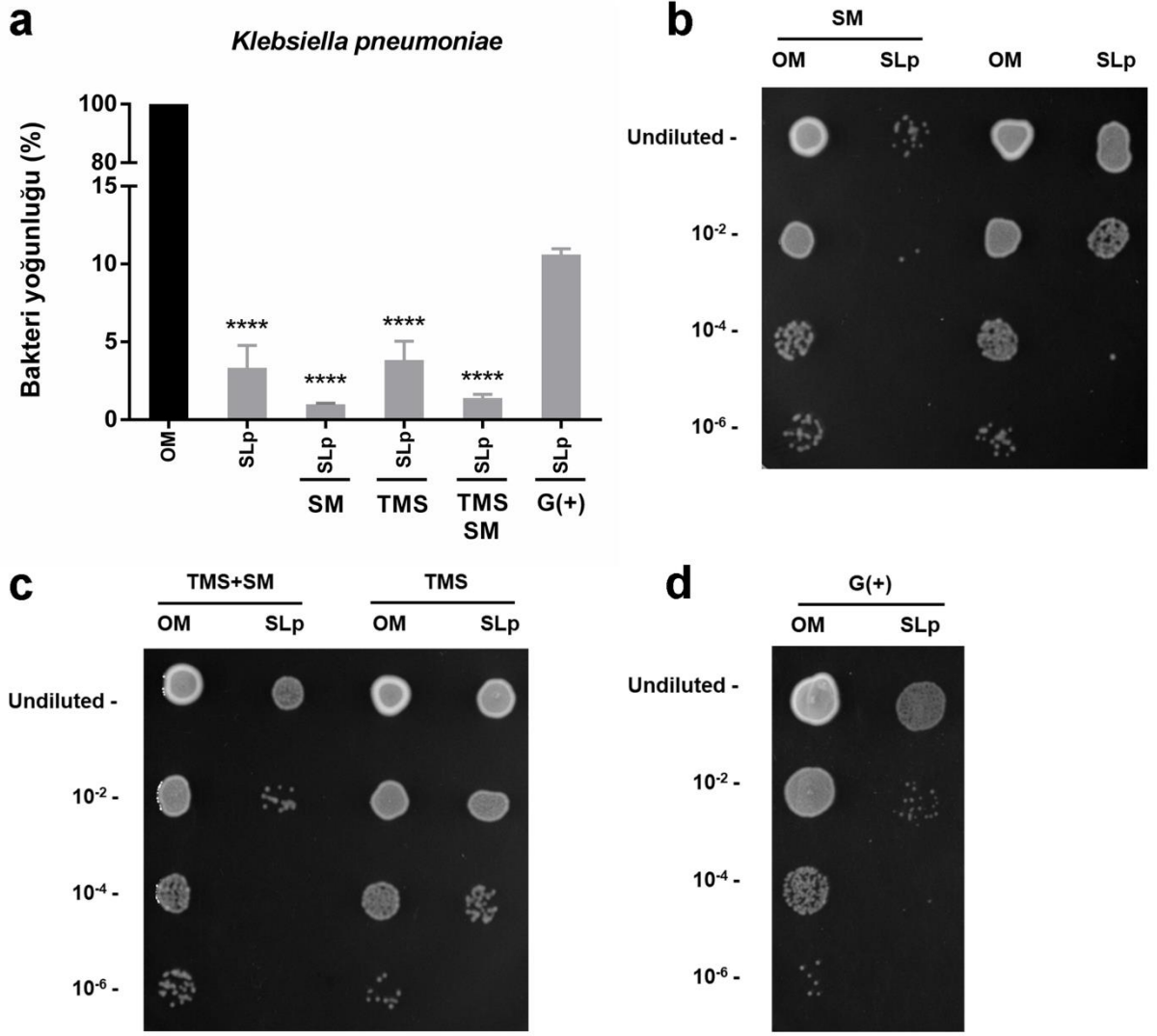
4.2. *Lactobacillus plantarum* Hüresiz Post-fermantasyon Ortamının *Pseudomonas aeruginosa* ve *Klebsiella pneumoniae* Patojenlerine Karşı Antibakteriyel Etkisi

Farklı deney gruplarından toplanan ve SLP, SLP-SM, SLP-TMS, SLP-TMS+SM ve SLP-G(+) olarak adlandırılan hüresiz post-fermantasyon ortamlarının (toplam hacimin % 50'si olarak uygulanmak üzere), *P. aeruginosa* (Şekil 4.2) ve *K. pneumoniae* (Şekil 4.3) patojenlerine karşı antibakteriyel etkisi test edilmiştir. Pozitif kontrol olarak SLP-G(+) kullanılmış ve her deneysel koşulun OM'si de test edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonrasında, probiyotik süpernatantların patojenleri büyümesi üzerindeki etkisi, patojen kültürlerinin 600 nm'de optik yoğunlukları ölçülerek ve sonrasında agar spot plaka testi kullanılarak analiz edilmiştir. Hem *P. aeruginosa* hem de *K. pneumoniae* için, *L. plantarum*'un tüm deney grupları patojenlerin hücre canlılığını azaltmış; bununla birlikte en belirgin inhibisyonlar, SLP-SM ve SLP-TMS+SM gruplarında elde edilmiştir. Dikkat çekici bir şekilde, SLP-SM ve SLP-TMS+SM grupları, pozitif kontrol olarak kullanılan SLP-G(+) grubuyla benzer şekilde, *K. pneumoniae* üzerinde daha kuvvetli bir inhibe edici aktivite göstermiştir.



Şekil 4 2. *Lactobacillus plantarum* Hücresiz Post-Fermentasyon Ortamının *Pseudomonas aeruginosa* Üzerindeki Antibakteriyel Etkisinin Araştırılması

a) 24 saat boyunca % 50 (v/v) oranında *L. plantarum* post-fermentasyon besi yeri veya sadece besi yeri (OM) ile inkübe edilen *P. aeruginosa*'nın üremesi, her bir deney grubuna ait OM'ye göre normalize edilerek yüzde olarak verilmiştir. b-d) Hücre büyümesinin görselleştirilmesi için hücresiz post-fermentasyon ortamı veya kontrol ortamı (OM) ile inkübasyonun ardından agar spot plaka deneyleri yapılmıştır. Deneyler, her biri dört teknik kopya içeren üç biyolojik replike olarak tekrarlanmış ve sonuçlar ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur. SLP-SM, SLP-TMS, SLP-TMS+SM ve SLP-G(+) gruplarını SLP grubu ile karşılaştırmak için t-testi kullanılmıştır ($P \leq 0.01$ **, $P \leq 0.001$ ***, $P \leq 0.0001$ ****, ns: non-significant). SLP: *L. plantarum* süpernatantı; SLP-SM: Yağsız süt tozu varlığında büyütülen *L. plantarum* süpernatantı; SLP-TMS: Modifiye tapyoka nişastası varlığında büyütülen *L. plantarum* süpernatantı; SLP-G(+): Glikoz varlığında büyütülen *L. plantarum* süpernatantı.

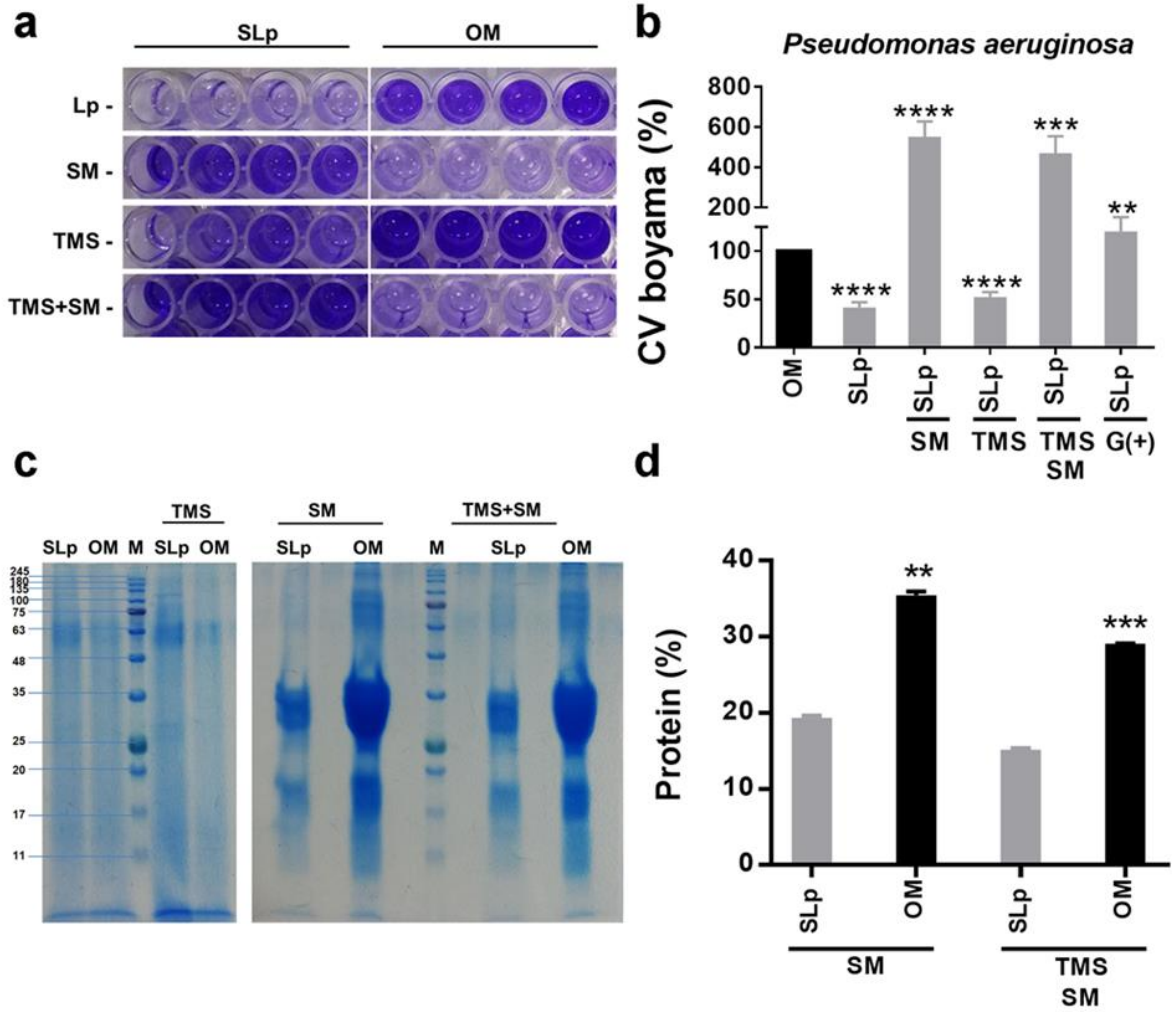


Şekil 4 3. *Lactobacillus plantarum* Hüresiz Post-Fermantasyon Ortamının *Klebsiella pneumoniae* Üzerindeki Antibakteriyel Etkisinin Araştırılması.

a) 24 saat boyunca % 50 (v/v) oranında *L. plantarum* post-fermantasyon ortamı veya sadece besi yeri (OM) ile inkübe edilen *K. pneumoniae*'nin üremesi, her bir deney grubuna ait OM'ye göre normalize edilerek yüzde olarak verilmiştir. b-d) Hücre büyümesinin görselleştirilmesi için hüresiz post-fermantasyon ortamı veya kontrol ortamı (OM) ile inkübasyonun ardından agar spot plaka deneyleri yapılmıştır. Deneyler, her biri dört teknik kopyadan oluşmak üzere üç kez tekrarlanmış ve sonuçlar ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur. SLp, SLp-SM, SLp-TMS ve SLp-TMS+SM gruplarını SLp-G(+) grubu ile karşılaştırmak için t-testi kullanılmıştır ($P \leq 0.01$ **, $P \leq 0.001$ ***, $P \leq 0.0001$ ****, ns: non-significant). SLp: *L. plantarum* süpernatantı; SLp-SM: Yağsız süt tozu varlığında büyütülen *L. plantarum* süpernatantı; SLp-TMS: Modifiye tapyoka nişastası varlığında büyütülen *L. plantarum* süpernatantı; SLp-G(+): Glikoz varlığında büyütülen *L. plantarum* süpernatantı.

4.3. *Lactobacillus plantarum* Hücresiz Post-fermantasyon Ortamının *Pseudomonas aeruginosa* Patojeninin Önceden Oluşturulmuş Biyofilmine Karşı Dağıtıcı Etkisinin Belirlenmesi

L. plantarum hücresiz post-fermantasyon ortamının *P. aeruginosa* tarafından üretilen biyofilm üzerindeki etkisinin belirlenmesinde CV boyama yöntemi kullanılmıştır. Her bir probiyotik süpernatant grubunun kontrolüne (OM) kıyasla probiyotik post-fermantasyon hücresiz besi yerinin önceden oluşturulmuş biyofilm üzerine etkisi, Şekil 4.4a 'da gösterildiği gibi yüzde (%) olarak verilmiştir. Şekil 4.4b'de yapılan CV boyamalarından birine ait olmak üzere temsili plaka görüntüsü yer almaktadır. Şekil 4.4a-b'de görüldüğü üzere OM'ye göre karşılaştırıldığında, SLP ve SLP-TMS gruplarının, önceden oluşturulmuş *P. aeruginosa* biyofilmlerini dağıttığı belirlenmiştir. Ancak yağsız süt tozu (SM) içeren gruplar için CV boyaması sonucu elde edilen absorbans değerlerinin, OM gruplarında düşük, süpernatant (SLP-SM ve SLP-TMS+SM) gruplarında yüksek olduğu görülmektedir. Oldukça ilginç olan bu sonuçlardan yola çıkılarak, probiyotik hücresiz süpernatantlarında bulunan proteinler çöktürülmüş ve SDS-PAGE ile analiz edilmiştir. Şekil 4.4c'de yer alan SDS-PAGE görüntüsünde görüldüğü gibi SLP ve SLP+TMS gruplarında çöken protein miktarı, karşılık gelen OM gruplarından fazla iken, SLP-SM ve SLP-TMS+SM gruplarında çöken protein miktarı, karşılık gelen OM gruplarının çöktürülmesi ile elde edilen protein miktarına kıyasla düşüktür. Şekil 4.4d'de bu azalmayı ortaya koyan kantitatif analiz grafiği yer almaktadır. Elde edilen bu sonuç, yağsız süt tozu varlığıyla ilişkili görünmektedir ve mevcut sonuçlar, SM içeren post-fermantasyon ortamının biyofilme karşı etkili olmadığını, ancak karşılık gelen OM (kontrol ortamı) gruplarının biyofilm dağıtıcı bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Elde edilen bu ilginç sonuç, tezin "Tartışma ve Sonuç" bölümünde irdelenmiştir.



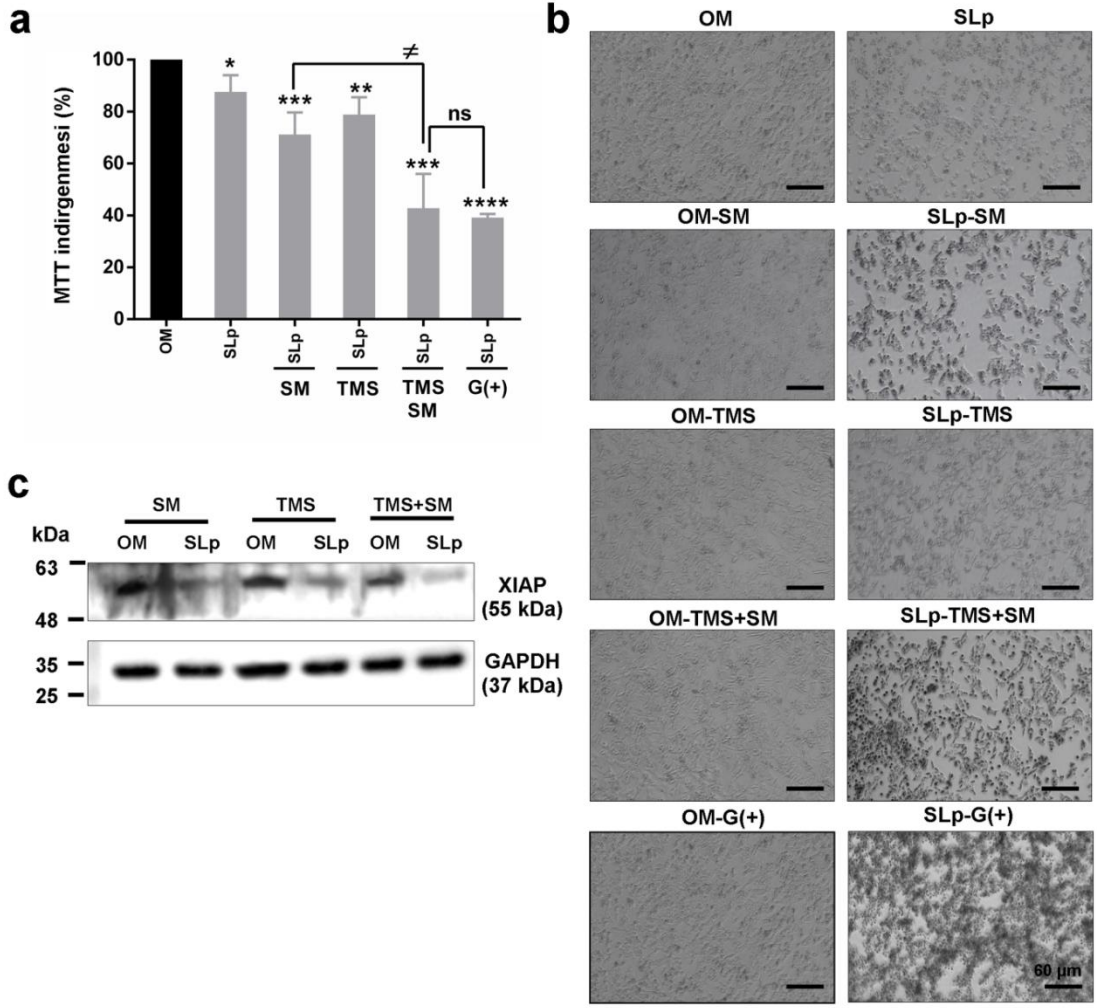
Şekil 4 4. *Lactobacillus plantarum* Hücresiz Post-Fermentasyon Ortamının *Pseudomonas aeruginosa* Biyofilmi Üzerindeki Dağıtıcı Etkisi.

P. aeruginosa tarafından önceden oluşturulmuş biyofilm yapısı, farklı gruplardan elde edilen *L. plantarum* hücresiz post-fermentasyon ortamı ile 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda biyofilmlerin varlığı a) Kristal viole (CV) boyama deneyi ile belirlenmiştir. b) % CV boyama farklı post-fermentasyon ortamların *P. aeruginosa* biyofilmi üzerindeki etkisini göstermektedir. Boyanan her kuyunun optik yoğunlukları OD₅₅₀ nm'de ölçülmüştür. CV boyama seviyeleri her bir grup için kontrol ortamına (OM) göre normalize edilmiş ve yüzde (%) değişim olarak verilmiştir. *L. plantarum* hücresiz post-fermentasyon ortamından TCA-Aseton yöntemi ile çöktürülen proteinlerin c) SDS-PAGE profili ve d) ve SDS-PAGE'de görülen proteinlerin ImageJ programı kullanılarak yapılan analizlere göre miktarları gösterilmektedir. Deneyler, her biri dört teknik kopyadan oluşmak üzere üç biyolojik replike olarak tekrarlanmış ve sonuçlar ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur. SDS-PAGE görüntüsü temsildir. SLp, SLp-SM, SLp-TMS ve SLp-TMS+SM gruplarını OM grubuna göre karşılaştırmak için t-test kullanılmıştır (P 0.01 **, P \leq 0.001 ***, P \leq 0.0001 ****). M: Marker; SLp: *L. plantarum* süpernatantı; SLp-SM: Yağsız süt tozu varlığında büyütülen *L. plantarum* süpernatantı; SLp-TMS: Modifiye tapyoka nişastası varlığında büyütülen *L. plantarum* süpernatantı.

4.4. *Lactobacillus plantarum* Hücresiz Post-fermantasyon Ortamının Kolon Kanseri Hücreleri Üzerindeki Anti-kanser Etkisinin Belirlenmesi

Besi yeri ilave içerikleri olarak yağsız süt tozu ve tapyoka nişastasının *L. plantarum*'un anti-kanser aktivitesini etkileyip etkilemediğini değerlendirmek için, HCT-116 kolon kanseri hücreleri, SLP, SLP-SM, SLP-TMS, SLP-TMS+SM ve SLP-G(+) hücresiz post-fermantasyon ortamları ile 24 saat inkübe edilmiştir. Daha önce belirtildiği gibi pozitif kontrol olarak glikoz içeren MRS ortamı (SLP-G+), karşılaştırma için ise glikozsuz MRS ortamında inkübe edilen *L. plantarum* hücresiz post-fermantasyon ortamı (SLP) kullanılmıştır (Yılmaz ve Şimşek, 2020: 3293). İnkübasyon sonunda hücre canlılığı, proliferasyon ve sitotoksitenin bir göstergesi olarak hücre metabolik aktiviteyi ölçmek üzere MTT deneyi ile belirlenmiştir (Karaçam ve Tunçer, 2021: 12). Şekil 4.5a'da gösterildiği gibi, glikoz içeren SLP-G(+) muamelesi, önceki çalışmalarla uyumlu bir şekilde, HCT-116 kolon kanseri hücreleri üzerinde önemli derecede büyüme inhibe edici etki göstermiştir (Chuah vd, 2019: 9). Benzer inhibitör aktivite SLP-TMS+SM grubunda da görülmüştür. Farklı post-fermantasyon ortamları ile inkübe edilen hücreler ayrıca ışık mikroskobu altında gözlenmiş ve fotoğraflanmıştır (Şekil 4.5b). Hücre görüntüleri, *L. plantarum* post-fermantasyon ortamlarının, özellikle SLP-TMS+SM grubunun, HCT-116 hücrelerini morfolojik olarak nasıl etkilediğini ortaya koymaktadır.

Bu tez çalışmasında ayrıca SM ve TMS'nin tek başlarına ya da kombine uygulaması ile elde edilen *L. plantarum* hücresiz post-fermantasyon ortamının, HCT-116 kolon kanseri hücreleri üzerinde apoptozis indükleyici aktivitesi de araştırılmıştır. Şekil 4.5c'de gösterildiği gibi, SM, TMS veya SM+TMS varlığında büyütülen *L. plantarum*'dan elde edilen hücresiz post-fermantasyon ortamı, anti-apoptotik bir protein olarak XIAP'nin ekspresyonunu azaltarak, apoptozisi indüklemiştir.



Şekil 4 5. *Lactobacillus plantarum* Hüresiz Post-Fermentasyon Ortamının Anti-Kanser Potansiyeli.

HCT-116 kolon kanseri hücreleri, SLp, SLp-SM, SLp-TMS, SLp-TMS+SM ve SLp-G(+) hüresiz post-fermentasyon ortamları ile 24 saat inkübe edilmiştir. a) Metabolik canlılığın bir değerlendirmesi olarak MTT indirgenme seviyeleri, post-fermentasyon ortamın büyüme inhibe edici aktivitelerini göstermektedir. Her grup için MTT'nin indirgenme seviyeleri, kontrol ortamı (OM) ile muamele edilmiş hücrelere göre normalize edilerek yüzde (%) değişim olarak verilmiştir. Karşılaştırmalar için SLp veya SLp-G(+) grupları kullanılmıştır. Deneyler, her biri altı teknik replike içermek üzere iki biyolojik replike olarak tekrarlanmış ve sonuçlar ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur. İstatistiksel analiz için t-test kullanılmıştır. ($P \leq 0.05$ *, $P \leq 0.01$ **, $P \leq 0.001$ ***, $P \leq 0.0001$ ****, $\neq P \leq 0.05$, ns: non-significant). b) Post-fermentasyon ortam muamelesi sonunda HCT-116 hücrelerinin mikroskop görüntüleri, 4X objektif kullanılarak ışık mikroskobu ile elde edilmiştir. c) Western blot görüntüsü, kontrol ortamı (OM) veya *L. plantarum* post-fermentasyon ortamı ile inkübe edilmiş HCT-116 hücrelerindeki XIAP ekspresyon seviyelerini göstermektedir. GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. SLp: *L. plantarum* süpernatantı; SLp-SM: Yağsız süt tozu varlığında büyütülen *L. plantarum* süpernatantı; SLp-TMS: Modifiye tapyoka nişastası varlığında büyütülen *L. plantarum* süpernatantı; SLp-G(+): Glikoz varlığında büyütülen *L. plantarum* süpernatantı.

4.5. *Lactobacillus plantarum* Hücresiz Post-fermantasyon Ortamının ATR-FTIR Spektroskopisi ile Tanımlanması

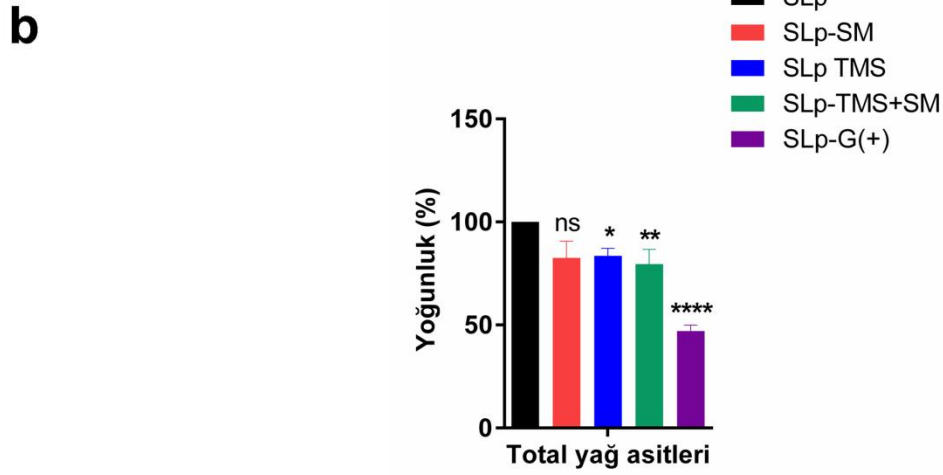
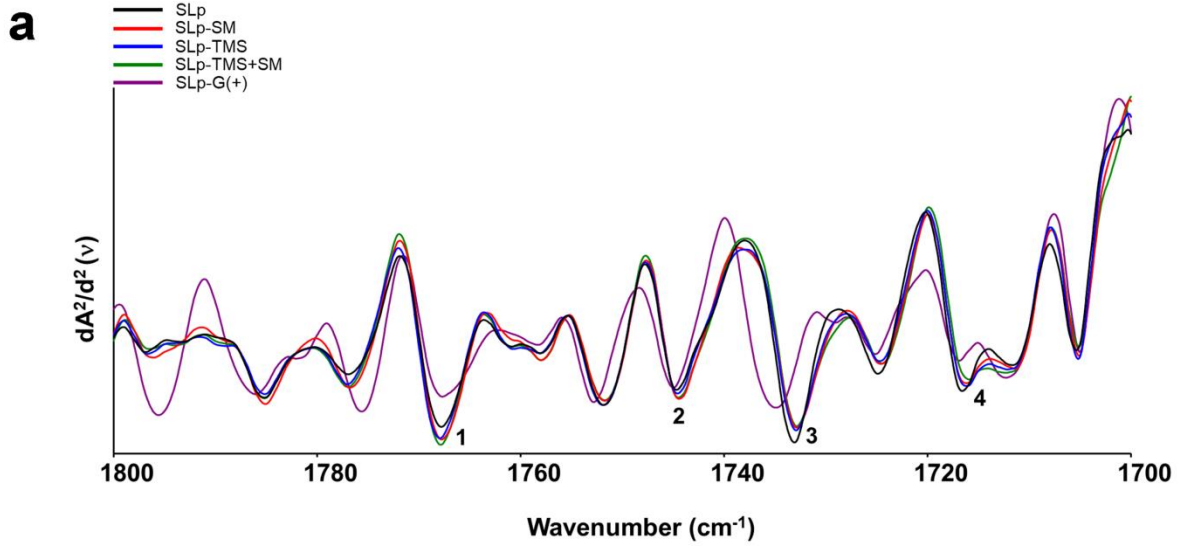
FTIR spektroskopisinden elde edilen spektrumlar, bir bileşiğin yapısındaki bağ türleri, fonksiyonel gruplar ve dolayısıyla ortamdaki mevcut moleküllerin belirlenmesini sağlar ve ayrıca bu moleküllerin konsantrasyonu ile yapı ve fonksiyonu hakkında önemli bilgiler verir (Garip vd., 2009: 1304; Ozek Simsek vd., 2010: 45). Tez çalışmasında *L. plantarum* hücresiz post-fermantasyon ortamında bulunan bileşenlerinin analizi için ATR-FTIR spektroskopisi kullanılmıştır. Spektral değişimlerin detaylı analizleri, parmak izi bölgesi (fingerprint) olarak bilinen 1800-650 cm^{-1} dalga sayısı aralığında gerçekleştirilmiştir. 1800-650 cm^{-1} spektral bölgesi, çeşitli hücresel moleküllerin farklı fonksiyonel gruplarından ortaya çıkan moleküler titreşimleri temsil etmektedir. Bu moleküler titreşimlerdeki modülasyonlar, kilit taşı biyomoleküllerin yapısını ve işlevselliğini etkilemektedir (Gurbanov vd., 2021: 200). Elde edilen spektral veriler, *L. plantarum* hücresiz post-fermantasyon ortamının lipit, yağ asidi, trigliserit, kolesterol, protein, protein ikincil yapıları gibi farklı moleküllerin fonksiyonel gruplarından kaynaklanan pek çok spektral bant içerdiğini göstermiştir. Bu nedenle spektral bantlar, alt bölgelere ayrılarak incelenmiş (Şekil 4.6-9a) ve kantitatif analizler için gruplar arası değişim gösteren bantlar seçilerek, mutlak yoğunlukları belirlenmiştir (Şekil 4.6-9b). Elde edilen tüm spektral verilerin bant ve detaylı tanımlamaları Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4. 2. *Lactobacillus plantarum* Hücresiz Post-Fermantasyon Ortamına Ait Başlıca Spektal Bant Bölgeleri ve Bantların Tanımları

Kızılötesi Bölge	Bant No	Dalga Boyu (cm ⁻¹)	Bant Tanımı	Kaynak
1800-1700 cm ⁻¹	1	1767	β-laktam C=O Gerilmeleri	Ragnoni vd., 2021
	2	1744	Ester C=O (Trigliseridler, Kolesterol Esterleri)	Candoğan vd., 2021
	3	1733	Ester C=O Gerilmeleri (Lipitler, Yağ Asitleri)	Vodnar vd., 2010
	4	1715	Ester C=O Gerilmeleri (Yağ Asitleri)	Lasch ve Naumann, 2006
1700-1500 cm ⁻¹	5	1695	Antiparalel Uzamış β-Tabaka (Proteinler)	Gurbanov ve Unal, 2018
	6	1681	β-turn yapısı (Proteinler)	Gurbanov ve Yıldız, 2017
	7	1674	β-turn yapısı (Proteinler)	Quintelas vd., 2018
	8	1667	Hidrojeni Olmayan C=O Grubuna Sahip Rastgele Yumak Kısımları (Proteinler)	Perisic vd., 2011
	9	1660	α-Helix Yapısı (Proteinler)	Gurbanov ve Yıldız, 2017
	10	1652	α-Helix Yapısı (Proteinler)	Gurbanov ve Yıldız, 2017
	11	1644	Rasgele Yumak Kısımları (Proteinler)	Haris ve Severcan, 1999
	12	1630	β-Tabaka Yapısı (Proteinler)	Perisic vd., 2011
	13	1618	β-Tabaka Yapısı (Proteinler)	Haris ve Severcan, 1999
	14	1611	Tirozin Amino Asit Yan Zincirleri Titreşimleri (Proteinler)	Gurbanov ve Unal, 2018
	15	1577	Amid II (Proteinler)	Talari vd., 2017
	16	1561	Amid II (α-Helix Yapıları)	Naseer vd., 2021
	17	1551	Amid II (Proteinler)	Talari vd., 2017
	18	1537	C=N, C=C Gerilmeleri (Proteinler)	Talari vd., 2017
	19	1527	C=N, C=C Gerilmeleri (Proteinler)	Talari vd., 2017
	20	1509	C=C Gerilmeleri (Aromatik Halka Bağları)	Doblies vd., 2019
1500-1300 cm ⁻¹	21	1494	Düzlem içi C-H Bükülmeleri (Lipitler)	Talari vd., 2017
	22	1468	CH ₂ Makaslama (Lipitler)	Gurbanov vd., 2015
	23	1457	CH ₃ Bükülmeleri (Lipitler ve Proteinler)	Talari vd., 2017
	24	1416	CH ₃ Gerilmeleri (Lipitler)	Hands vd., 2014
	25	1339	CH ₂ Yan Zincir Titreşimleri (Kolajen)	Talari vd., 2017
800-650 cm ⁻¹	26	723	CH ₂ 'nin C-H Sallanması (Lipitler)	Lasch ve Naumann, 2006
	27	705	?-Tanımlanmamış	
	28	673	C-H (Aromatik)	Yadav vd., 2013 Boudjelal vd., 2011
	29	664	Düzlem dışı OH Bükülmeleri (Selüloz)	Liu vd., 2017; Abidi vd., 2014
	30	658	C-Br Gerilmeleri	Yadav vd., 2013

4.5.1. 1800-1700 cm⁻¹ Spektral Bölgesinin Analizi

1800-1700 cm⁻¹ spektral aralığında görülen C=O gerilme bandı, trigliserit ve kolesterol esterlerinden kaynaklanır. *L. plantarum* hücresiz post-fermantasyon ortamının yağ asidi bölgesine ait spektrumlar incelendiğinde 1767 cm⁻¹, 1744 cm⁻¹, 1733 cm⁻¹ ve 1715 cm⁻¹ bantları tanımlanmış olup (Tablo 4.2), bu bantların detaylı spektral veri analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.6a). Ester C=O gerilmelerinden kaynaklanan 1744 cm⁻¹, 1733 cm⁻¹ ve 1715 cm⁻¹ bantlarının ortalama yoğunlukları, toplamı yağ asitlerini bütünsel olarak ifade etmek üzere Şekil 4.6b'de verilmiştir. Buna göre, SLp-TMS, SLp-TMS+SM ve SLp-G(+) gruplarının yağ asidi menşeli biyomolekül içeriği, SLp grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde azalmıştır.



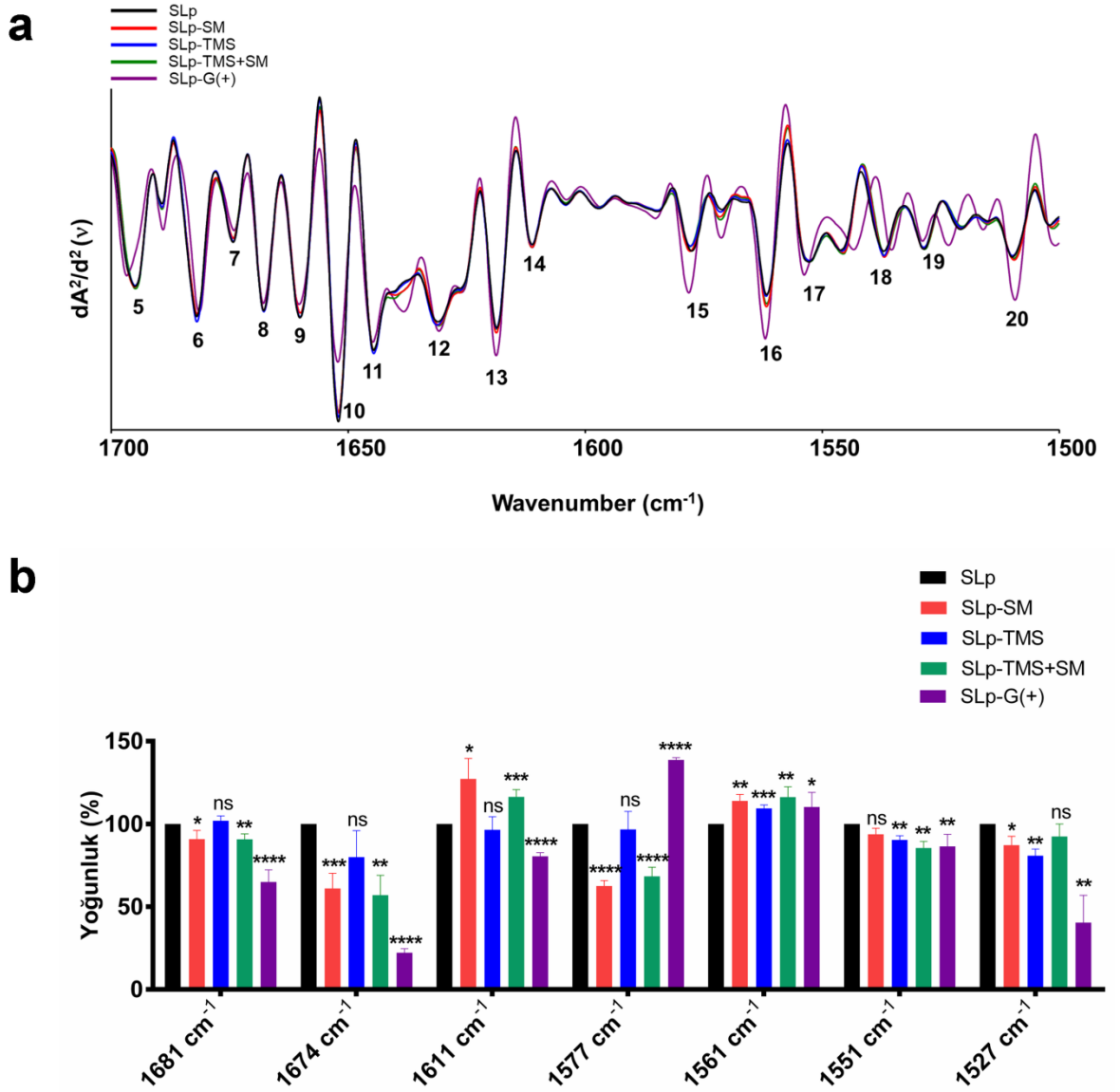
Şekil 4 6. *Lactobacillus plantarum* Hücresiz Post-Fermentasyon Ortamına Ait 1800-1700 Cm^{-1} Bölgesinin A) İkincil Türevi Alınmış ve Vektör-Normalize Edilmiş Ortalama Spektrumları ve B) Spektral Bantların Mutlak Yoğunlukları.

Her grup için mutlak yoğunluk, SLp grubuna göre normalize edilmiş ve yüzde (%) olarak hesaplanmıştır. Deneyle, her biri iki teknik replikeden oluşmak üzere üç kez tekrarlanmış ve sonuçlar ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur. SLp-SM, SLp-TMS, SLp-TMS+SM ve SLp-G(+) gruplarını SLp grubu ile karşılaştırmak için t-test kullanılmıştır ($P \leq 0.05$ *, $P \leq 0.01$ **, $P \leq 0.0001$ ****, ns: non-significant). SLp: *L. plantarum* süpernatantı; SLp-SM: Yağsız süt tozu varlığında büyütülen *L. plantarum* süpernatantı; SLp-TMS: Modifiye tapyoka nişastası varlığında büyütülen *L. plantarum* süpernatantı; SLp-G(+): Glikoz varlığında büyütülen *L. plantarum* süpernatantı.

4.5.2. 1700-1500 cm⁻¹ Spektral Bölgesinin Analizi

1700-1500 cm⁻¹ spektral bölgesindeki amid I ve amid II bandlarına ait titreşimler protein ikincil yapılarındaki olası değişimler hakkında bilgi verir (Haris ve Severcan, 1999: 210). *L. plantarum* hücresiz post-fermantasyon ortamının protein bölgesine ait spektrumları incelendiğinde 1695 cm⁻¹, 1681 cm⁻¹, 1674 cm⁻¹, 1667 cm⁻¹, 1660 cm⁻¹, 1652 cm⁻¹, 1644 cm⁻¹, 1630 cm⁻¹, 1618 cm⁻¹, 1611 cm⁻¹, 1577 cm⁻¹, 1561 cm⁻¹, 1551 cm⁻¹, 1537 cm⁻¹, 1527 cm⁻¹ ve 1509 cm⁻¹ bantları tanımlanmış olup (Tablo 4.2), bu bantların detaylı spektral veri analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.7a).

Şekil 4.7b’de verilen protein ikincil yapılarına ait band yoğunlukları, SLp grubuna göre normalize edilerek karşılaştırılmıştır. Proteinlerin, β -turn yapısı (1681 cm⁻¹ ve 1674 cm⁻¹), SLp-SM, SLp-TMS+SM, SLp-G(+) gruplarında, Amid II (1577 cm⁻¹) yapıları ise SLp-SM ve SLp-TMS+SM gruplarında azalırken, SLp-TMS gruplarında değişim görülmemiştir. Bununla birlikte SLp-G(+) grubunda proteinlerin Amid II (1577 cm⁻¹) yapısında artış görülmüştür. Tirozin amino asit yan zincirleri yapısı (1611 cm⁻¹) SLp-SM ve SLp-TMS+SM gruplarında artarken, SLp-G(+) grubunda azalmış ve SLp-TMS grubunda ise değişim gözlenmemiştir. Amid II (α -helix) yapısı (1561 cm⁻¹) ise SLp-SM, SLp-TMS, SLp-TMS+SM ve SLp-G(+) gruplarının tümünde artmıştır. Amid II yapısı (1551 cm⁻¹) SLp-TMS, SLp-TMS+SM ve SLp-G(+) gruplarında azalırken, SLp-SM grubunda değişim gözlenmemiştir. Proteinlerin C=N, C=C gerilmesini göstermek üzere 1527 cm⁻¹ bandının yoğunluğu ise SLp-SM, SLp-TMS ve SLp-G(+) gruplarında anlamlı bir şekilde azalırken, SLp-TMS+SM grubunda değişmemiştir. 1695 cm⁻¹, 1667 cm⁻¹, 1660 cm⁻¹, 1652 cm⁻¹, 1644 cm⁻¹, 1618 cm⁻¹, 1537 cm⁻¹ ve 1509 cm⁻¹ konumundaki bantlara ait yoğunluklara bakıldığında ise, SLp-SM, SLp-TMS ve SLp-TMS+SM gruplarında değişim gözlenmemiş, ancak SLp-G(+) grubunda 1509 cm⁻¹ bant yoğunluğu artarken ($P \leq 0.01$), diğer tüm bantlar için yoğunluklar azalmıştır ($P < 0,0001$).



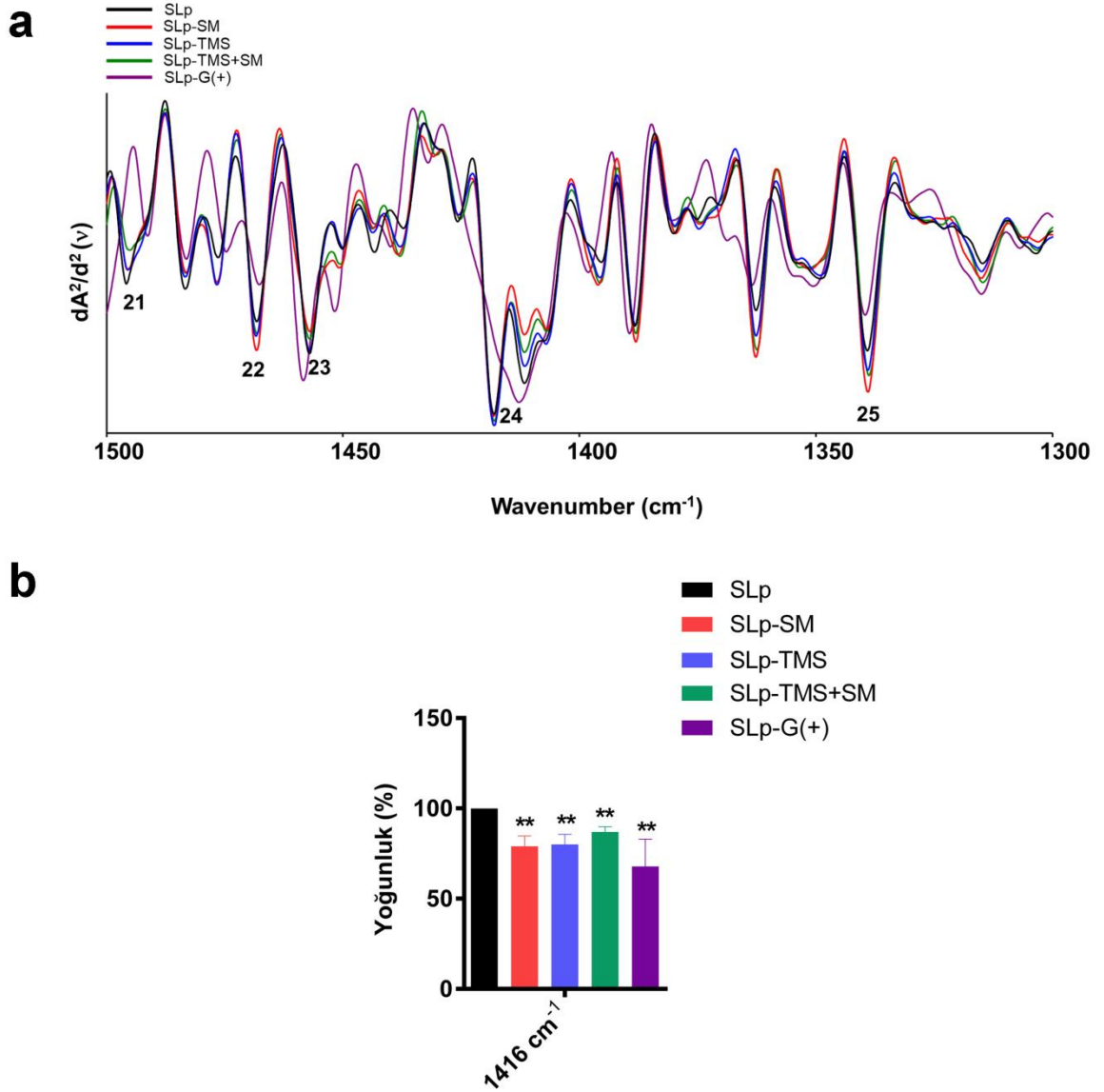
Şekil 4 7. *Lactobacillus plantarum* Hücresiz Post-Fermentasyon Ortamına Ait 1700-1500 Cm⁻¹ Bölgesinin A) İkincil Türevi Alınmış ve Vektör-Normalize Edilmiş Ortalama Spektrumları ve B) Spektral Bantların Mutlak Yoğunlukları.

Her grup için mutlak yoğunluk, SLP grubuna göre normalize edilmiş ve yüzde (%) olarak hesaplanmıştır. Deneyler, her biri iki teknik replikeden oluşmak üzere üç kez tekrarlanmış ve sonuçlar ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur. SLP-SM, SLP-TMS, SLP-TMS+SM ve SLP-G(+) gruplarını SLP grubu ile karşılaştırmak için t-testi kullanılmıştır ($P \leq 0.05$ *, $P \leq 0.01$ **, $P \leq 0.001$ ***, $P \leq 0.0001$ ****, ns: non-significant). SLP: *L. plantarum* süpernatantı; SLP-SM: Yağsız süt tozu varlığında büyütülen *L. plantarum* süpernatantı; SLP-TMS: Modifiye tapyoka nişastası varlığında büyütülen *L. plantarum* süpernatantı; SLP-G(+): Glikoz varlığında büyütülen *L. plantarum* süpernatantı.

4.5.3. 1500-1300 cm⁻¹ Spektral Bölgesinin Analizi

1500-1300 cm⁻¹ spektral bölgesinde ağırlıklı olarak hem lipid ve hemde proteinlerin CH₂ ve CH₃ bükülme titreşimlerinden kaynaklanan absorpsiyon profilleri birlikte gözlemlendiğinden bu bölge, “karmaşık spektral bölge” olarak bilinmektedir (Lasch ve Naumann, 2006: 6). *L. plantarum* hücresiz post-fermantasyon ortamının 1500-1300 cm⁻¹ spektral bölgesine ait spektrumları incelendiğinde 1494 cm⁻¹, 1468 cm⁻¹, 1457 cm⁻¹, 1416 cm⁻¹ ve 1339 cm⁻¹ bantları tanımlanmış olup (Tablo 4.2), bu bantların detaylı spektral veri analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.8a).

Şekil 4.8b’de lipitlerin CH₃ gerilmelerinden kaynaklanan 1416 cm⁻¹ bandının ortalama yoğunlukları sunulmuştur; buna göre SLP grubuna kıyasla SLP-SM, SLP-TMS, SLP-TMS+SM ve SLP-G(+) gruplarında bant yoğunluğunun anlamlı bir şekilde azalması söz konusudur. 1494 cm⁻¹ spektral bandı sadece SLP ve SLP-SM gruplarında elde edilmiş ve SLP grubuna göre incelendiğinde, bandın yoğunluğu anlamlı bir şekilde ($P \leq 0.05$) azalmıştır. 1457 cm⁻¹ bandı ise sadece SLP, SLP-SM ve SLP-G(+) gruplarında elde edilmiş ve SLP-SM grubu ($P \leq 0.01$) anlamlı bir şekilde azalırken SLP-G(+) grubunda değişim görülmemiştir. 1468 cm⁻¹ spektral bandı sadece SLP-SM, SLP-TMS+SM ve SLP-G(+) gruplarında, 1339 cm⁻¹ spektral bandı ise sadece SLP-SM, SLP-TMS, SLP-TMS+SM ve SLP-G(+) gruplarında elde edilmiş olup her iki bandın yoğunlukları sadece SLP-G(+) grubunda değişim (azalma) göstermiştir.



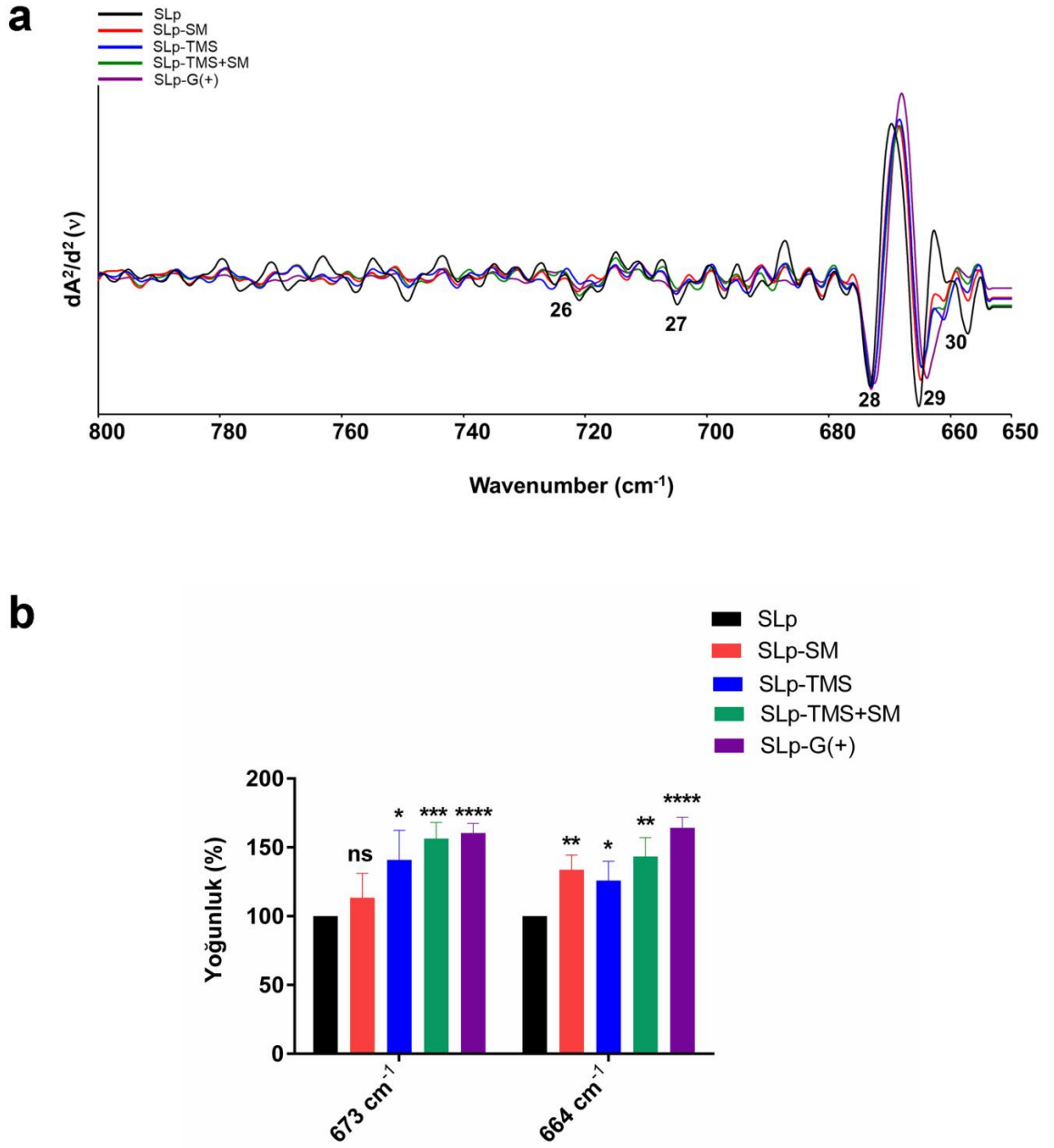
Şekil 4 8. *Lactobacillus plantarum* Hücresiz Post-Fermentasyon Ortamına Ait 1500-1300 Cm^{-1} Bölgesinin A) İkincil Türevi Alınmış ve Vektör-Normalize Edilmiş Ortalama Spektrumları ve B) 1416 Cm^{-1} bandının Mutlak Yoğunlukları.

Her grup için mutlak yoğunluk, SLP grubuna göre normalize edilmiş ve yüzde (%) olarak hesaplanmıştır. Deneyle, her biri iki teknik replike içermek üzere üç kez tekrarlanmış ve sonuçlar ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur. SLP-SM, SLP-TMS, SLP-TMS+SM ve SLP-G(+) gruplarını SLP grubu ile karşılaştırmak için t-test kullanılmıştır ($P \leq 0.01$ **). SLP: *L. plantarum* süpernatantı; SLP-SM: Yağsız süt tozu varlığında büyütülen *L. plantarum* süpernatantı; SLP-TMS: Modifiye tapyoka nişastası varlığında büyütülen *L. plantarum* süpernatantı ; SLP-G(+): Glikoz varlığında büyütülen *L. plantarum* süpernatantı.

4.5.4. 800-650 cm⁻¹ Spektral Bölgesinin Analizi

800-650 cm⁻¹ spektral bölgesi son derece karakteristik özellikler sergiler. Bu bölge, fenilalanin, tirozin, triptofan ve çeşitli nükleotidlerin aromatik halka titreşimlerinden kaynaklanan düşük yoğunluklu bantları içerebilir. Bu nedenle, bu spektral alan “gerçek parmak izi bölgesi” olarak adlandırılmıştır (Lasch ve Naumann, 2006: 6). *L. plantarum* hücresiz post-fermantasyon ortamının 800-650 cm⁻¹ spektral bölgesine ait spektrumlar incelendiğinde 723 cm⁻¹, 705 cm⁻¹, 673 cm⁻¹, 664 cm⁻¹ ve 658 cm⁻¹ bantları tanımlanmış olup (Tablo 4.2), bu bantların detaylı spektral veri analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.9a).

C-H aromatik bağ yapısını yansıtan 673 cm⁻¹ bandının yoğunluğu incelendiğinde, band yoğunluğunun SLP grubuna göre, SLP-TMS, SLP-TMS+SM ve SLP-G(+) gruplarında anlamlı bir şekilde arttığı görülmüş, SLP-SM grubunda ise değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.9b). Selüloz yapısının düzlem dışı OH bükülmelerini yansıtan 664 cm⁻¹ bandı için ise bant yoğunluğunun, SLP grubuna kıyasla SLP-SM, SLP-TMS, SLP-TMS+SM ve SLP-G(+) gruplarının tümünde anlamlı bir şekilde artışı söz konusudur. Lipit CH₂'deki C-H sallanmasını yansıtan 723 cm⁻¹ konumundaki bant sadece SLP, SLP-SM, SLP-TMS+SM ve SLP-G(+) gruplarında elde edilmiş ve bandın yoğunluğu SLP grubuna kıyasla SLP-SM, SLP-TMS+SM ve SLP-G(+) gruplarında değişmemiştir. Tanımlanmamış 705 cm⁻¹ konumundaki bandın gruplar arası yoğunlukları incelendiğinde, band yoğunluğunun SLP grubuna göre, SLP-SM (P ≤ 0.05) ve SLP-TMS+SM (P ≤ 0.05) gruplarında anlamlı bir şekilde azalırken, SLP-TMS grubunda (P ≤ 0.05) anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir. SLP-G(+) grubunda ise değişim söz konusu değildir. 658 cm⁻¹ spektral bandı ise sadece SLP ve SLP-SM gruplarında elde edilmiştir ve bandın mutlak yoğunluğu iki grup arasında fark göstermemiştir.



Şekil 4 9. *Lactobacillus plantarum* Hücresiz Post-Fermentasyon Ortamına Ait 800-650 Cm⁻¹ Bölgesinin A) İkincil Türevi Alınmış ve Vektör-Normalize Edilmiş Ortalama Spektrumları ve B) Spektral Bantların Mutlak Yoğunlukları.

Her grup için mutlak yoğunluk, SLP grubuna göre normalize edilmiş ve yüzde (%) olarak hesaplanmıştır. Deneyle, her biri iki teknik replike içermek üzere üç kez tekrarlanmış ve sonuçlar ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur. SLP-SM, SLP-TMS, SLP-TMS+SM ve SLP-G(+) gruplarını SLP grubu ile karşılaştırmak için t-testi kullanılmıştır ($P \leq 0.05$ *, $P \leq 0.01$ **, $P \leq 0.001$ ***, $P \leq 0.0001$ ****, ns: non-significant). SLP: *L. plantarum* süpernatantı; SLP-SM: Yağsız süt tozu varlığında büyütülen *L. plantarum* süpernatantı; SLP-TMS: Modifiye tapyoka nişastası varlığında büyütülen *L. plantarum* süpernatantı; SLP-G(+): Glikoz varlığında büyütülen *L. plantarum* süpernatantı.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bağırsak mikroorganizmaları, çoğunlukla bakteriler olmak üzere, sindirim, metabolizma ve bağışıklık tepkileri gibi konağın fizyolojik fonksiyonlarını modüle ederek sağlık üzerinde farklı işlevlere ve etkilere sahiptir (Sekirov vd., 2010: 863). Bu nedenle, bağırsak florası, belirli bakterilerin kolonizasyonuna bağlı olarak bir bireyin sağlık durumu üzerinde yararlı veya zararlı etkilere sahip olabilir (O'Connor vd., 2017: 12). Floradaki faydalı/zararlı bakteri oranı azaldığında “mikrobiyal disbiyozis” adı verilen patolojik bir süreç başlar. Son çalışmalar, anormal veya değiştirilmiş bağırsak mikrobiyomunun (disbiyozis) çeşitli hastalıklarla ilişkili olduğunu göstermiştir (Nagpal vd., 2018: 3). Diyet alışkanlıkları bağırsak mikrobiyal çeşitliliğini etkileyebileceğinden, prebiyotik ve/veya probiyotik diyet müdahalesi, bağırsak mikrobiyotasının bileşimini ve metabolik aktivitesini modüle edebilir (Matijašić vd., 2016: 578). Prebiyotikler, genellikle sindirilemeyen karbonhidratlardan oluşan gıda bileşenleridir. Spesifik olarak, bağırsaktaki zararlı bakterilere göre *Lactobacillus* gibi probiyotik bakterilerin büyümesini ve metabolik aktivitesini seçici olarak uyarabilirler (LeBlanc vd., 2017: 5). Bu çalışmada, enzimatik olarak modifiye edilmiş, ticari olarak temin edilebilen gıda sınıfı tapyoka nişastasınının (TMS), insan bağırsaklarını kolonize etme yeteneği bilinen bir probiyotik olan *L. plantarum* üzerinde büyüme kinetiğine ve söz konusu probiyotiğin anti-mikrobiyal ve anti-kanser aktivitelerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Prebiyotiklerle diyet müdahaleleri bağlamında, doğal dirençli nişasta (DN) kaynakları olarak diyet liflerinin tüketimi özel bir ilgi alanıdır (Slavin, 2013: 1420). DN, ince bağırsakta sindirilemeyen ancak kalın bağırsakta fermente edilen ve insan sağlığına fayda sağlayan diyet nişasta ürünüdür (Gurbanov ve Tunçer, 2021: 24). Prebiyotik olarak işlev gören DN'nin probiyotik bakteri türlerinin büyümesini teşvik ettiği ve özellikle DN'nin fermente edildiği kalın bağırsakta, bağırsak sağlığına fayda sağladığı bildirilmiştir. Sekonder safra asitleri, amonyak ve fenol içeriğinin konsantrasyonunu azaltarak, SCFA'ların üretimini artırarak, çinko, kalsiyum ve magnezyum iyonlarının emilimini teşvik ederek ve bağırsak pH'sını düşürerek DN, konakçıya bir dizi fizyolojik fayda sağlamanın yanı sıra sindirim rahatlığı da sağlayabilir (Gurbanov ve Tunçer, 2021: 24). Ayrıca tapyoka nişastasının DN içeriğinin prebiyotik özellikler sergilediği ve laktobasiller için bir fermantasyon substratı olarak kullanıldığı rapor edilmiştir (Kaulpiboon vd., 2015: 129; Arshad vd., 2018: 953). Benzer şekilde, grubumuz tarafından yakın zamanda tapyoka nişastasının farklı hücresel süreçleri modüle ederek oral mikrobiyota LAB üyeleri *Streptococcus salivarius* K12 ve *S. salivarius* M18'in probiyotik potansiyelini arttırdığı da gösterilmiştir (Gurbanov vd., 2021: 204).

Süt ürünleri imalatında süt mayasını zenginleştirmek için yağsız süt tozu kullanımı oldukça yaygındır (İsleten ve Karagül-Yüceer, 2006: 2868). Vitamin ve minerallere ek olarak nispeten yüksek bir protein konsantrasyonu içerdiğinden yağsız süt tozu, LAB'nin büyümesi için erişilebilir bir protein kaynağıdır ve bu nedenle probiyotik içecekler ve probiyotik yoğurtların üretiminde kullanılır (Pato vd., 2019: 15). Zhang ve arkadaşları, farklı karbon kaynakları (glikoz, laktoz, galaktoz ve fruktoz) ile yağsız süt takviyesinin *L. fermentum* F6'nın bakteri sayıları ve ekzopolisakkarit (EPS) üretimi üzerindeki etkisini incelemiş ve yağsız süte şeker ilavesinin bakterilerin büyümesini ve EPS biyosentezini arttırdığını göstermiştir (Zhang vd., 2011: 2085). Bu tez çalışmasında ise modifiye tapyoka nişastası (TMS) ile yağsız süt tozu (SM) kombinasyonunun canlı bakteri sayısını arttırdığını ve bu nedenle probiyotik *L. plantarum* B-1846 suşunun büyümesini desteklemek için kullanılabileceği gösterilmiştir.

LAB, hücresiz fermantasyon sonrası ortamda bulunan metabolitlerin çeşitliliği ve miktarları nedeniyle potansiyel doğal antimikrobiyal ajan kaynaklarından biridir (Wang vd., 2020: 32). Literatürdeki çalışmalar LAB'den elde edilen fermantasyon ortamlarının *Listeria monocytogens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium difficile*, *Helicobacter pylori*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi birçok insan patojenini inhibe ettiğini göstermiştir (Strus vd., 2001: 138; Abedi vd., 2013: 260; Muhammad vd., 2019: 71; El-Mokhtar vd., 2020: 543; Tunçer ve Karaçam, 2020: 2829; Kostelac vd., 2021: 104828). Sonuçlarımız, *L. plantarum*'un hücresiz post-fermantasyon ortamının (SLp), *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*'nın büyümesini yüksek oranda inhibe ettiğini göstermektedir; bununla birlikte, probiyotik büyüme ortamının SM ve TMS+SM ile desteklenmesi ile, post-fermantasyon ortamın patojen büyümesini inhibe edici aktivitesinin arttığı da belirlenmiştir. Patojenik bakterilerin inhibisyonu, LAB tarafından üretilen ve fermantasyon ortamına salınan postbiyotiklere atfedilmiş olup (Yazgan vd, 2021: e15085), postbiyotiklerin üretimlerinin, büyüme ortamının bileşiminden büyük ölçüde etkilendiği bilinmektedir (Nataraj vd., 2020: 15). Bu nedenle mevcut sonuçlarımızdan yola çıkılarak, SM ve TMS+SM takviyesinin postbiyotik metabolitlerin kompozisyonunu değiştirebileceği ve bu nedenle post-fermantasyon ortamının patojenik bakteriler üzerindeki büyüme inhibitör etkinliğini modüle edebileceği önerilebilir.

K. pneumoniae ve *P. aeruginosa*, özellikle bağışıklığı zayıflamış kişilerde bakteremi, pnömoni, idrar yolu enfeksiyonları ve yumuşak doku enfeksiyonları gibi ciddi nozokomiyal enfeksiyonlara neden olabilen Gram-negatif fırsatçı patojenlerdir (Chung, 2016: 219). Birden fazla antibiyotiğe karşı gösterdikleri direnç nedeniyle bu patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi, son derece zordur (Elgandy vd., 2018: 972). Antibiyotiklere alternatif olarak önerilen postbiyotikler, hücresel sitoplazmanın asitlenmesi, enerji üretiminin ve düzenlenmesinin önlenmesi, hedef hücre zarlarında gözenek oluşumu yoluyla patojenik büyümenin baskılanması ve ayrıca hücresel bileşenlerin oksidasyonun tetiklenmesi yoluyla antimikrobiyal etki gösterirler (Rad vd., 2021: 14532). Öte yandan Gram-negatif bakteriler, yapılarındaki dış zar nedeniyle LAB tarafından üretilen antimikrobiyallerin geçişine ve bağlanmasına fiziksel bir engel oluşturarak direnç gösterirler (Pehrson vd., 2015: 139). Bununla birlikte, dış zar destabilizasyonunun Gram-negatif bakterileri bakteriyosinlere duyarlı hale getirebileceği bildirilmiştir. Bu açıdan laktik asit, Gram-negatif bakterilerin dış zarından lipopolisakkaritleri (LPS) uzaklaştırır ve ozmotik bir molekül olarak hareket ederek Gram-negatif bakterilerin dış zar bütünlüğünü bozar (Alakomi vd., 2000: 2003). Çoğu bakteriyosin, sitoplazmik zarı da geçirgenliği ve gözenek oluşumunu indükleyerek veya temel enzimlerle etkileşimler yoluyla duyarlı bakterileri öldürür (Wen vd., 2016: 432). Bakteriyosinler, proteinler gibi hücresel bileşenlerin morfolojik ve fonksiyonel değişikliklerini indükleyerek hasarı daha da artırabilir ve bu nedenle hedefin hasarlı dış zarından geçtikten sonra hücre içi biyomoleküllerin aktivitesini de inhibe edebilirler (Helander vd., 2001: 236). *L. plantarum* suşu tarafından üretilen bakteriyosinler plantarisinler olarak adlandırılır (Yusuf, 2013: 46). Plantarisinlerin klinik olarak bazı patojen bakteriler için yüksek özgüllüğe sahip olduğu ve çoklu antibiyotiğe dirençli suşlara karşı aktif olduğu bildirilmiştir (Perez vd., 2014: 8). Dolayısıyla mevcut literatür verileri, bu tez çalışmasında elde edilen veriler ile bir arada değerlendirildiğinde asidik post-fermantasyon ortamının antibakteriyel aktivitesinin organik asitler, bakteriyosinler ve diğer postbiyotik bileşiklerin varlığından kaynaklanabileceği öne sürülebilir.

Biyofilm oluşumu, patojen bakterilerin artmış antibiyotik direnci özelliği ile ilişkili önemli bir faktör olarak kabul edilmektedir (Zamani vd., 2017: 41). Biyofilm matriksindeki bakteriler, farklı antimikrobiyallere dirençlidir ve bu nedenle biyofilm, patogenezin ve terapötik başarısızlığın en önemli nedenlerinden biri olarak görülür (Nataraj vd., 2020: 12). Biyofilm, ekstra polimerik maddelerden, polisakkaritlerden, proteinlerden ve DNA'dan oluşur (Rana vd., 2020: 104105). Biyofilmlerle başa çıkmak için iki strateji vardır: biyofilm oluşumunun önlenmesi veya gelişen biyofilmin ortadan kaldırılması. Önceden oluşturulmuş biyofilmin engellenmesi veya bozulması, patojen bakteri topluluğunun konakçıdaki kolonizasyonunu zayıflatmaya yardımcı olabilir (Rana vd., 2020: 104105). Post-fermantasyon ortamının anti-biyofilm ajan olarak kullanımına yönelik çalışmalar artmaktadır. Zamani ve ark (2017) tarafından yapılan bir çalışmada *L. plantarum* izolatlarından elde edilen post-fermantasyon ortamının, *P. aeruginosa* tarafından önceden oluşturulmuş biyofilm yapısını bozduğu gösterilmiş, ayrıca koruyucu ve terapötik yaklaşımlar için kullanılacak maddelerin üretilmesinde *L. plantarum* spp.'nin uygun bir tür olduğu bildirilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada *L. acidophilus*'dan elde edilen post-fermantasyon ortamının *P. aeruginosa* tarafından önceden oluşturulmuş biyofilm yapısını bozduğu ve bu anti-biyofilm etkinin ortamda bulunan biosürfaktan ve ekzopolisakkaritlerden kaynaklandığı belirtilmiştir (El-Mokhtar vd., 2020: 543). Postbiyotiklerin antibiyofilm etkileri belirli bir bileşenle (bakteriyosin veya organik asitler gibi) sınırlı değildir; postbiyotik moleküller olarak bakteriyosinler, organik asitler, hidrojen peroksit, biyo yüzey aktif maddeler (Biosürfaktanlar-BS'ler) ve EPS gibi metabolitlerin de antibiyofilm aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte birden çok postbiyotik bileşen sinerjik olarak etki göstererek antibiyofilm aktiviteden sorumlu olabilir (Moradi vd., 2020: 3398). Bu tez çalışmasında, farklı gruplardan elde edilen *L. plantarum* post-fermantasyon ortamının *P. aeruginosa* tarafından önceden oluşturulmuş biyofilmleri dağıtıcı etkisi araştırılmıştır. SLP ve SLP+TMS gruplarının biyofilm dağıtıcı etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak, ilginç şekilde, bakteri ile inoküle edilmeyen ve SM ile desteklenen kontrol besi yeri gruplarının (OM-SM ve OM-SM+TMS) biyofilmi dağıttığı görülürken benzer etki probiyotik post-fermantasyon besi yeri için (SLP+SM ve SLP+TMS+SM) söz konusu değildir. SM içeren besi yerinde büyütülen *L. plantarum*'dan elde edilen post-fermantasyon ortamının (SLP+SM ve SLP+TMS+SM) protein miktarının, SM içeren OM (OM-SM ve OM-TMS+SM) gruplarından düşük olduğu belirlenmiştir.

Sütte bulunan proteinlerin yaklaşık % 80'ini kazeinler, % 20'sini ise "whey proteinleri" (serum proteinleri) oluşturmaktadır. Whey proteinleri globüler yapıda olup, β -laktoglobulin (%50), α -laktalbümin (%20), serum albümin (%10), immünoglobulinler (%10) ve proteoz-peptonlar (%10) ile diğer minör protein fraksiyonları (laktoferrin vb.) içermektedir (Gür vd., 2010: 24). Laktoferrin, α -laktalbümin ve kazein gibi süt proteinlerinin, oral mikroorganizmaların yapışma ve biyofilm oluşturma kabiliyetlerini inhibe ettiği bilinmektedir (Schlafer vd., 2012: e41534). Sütün en önemli bileşenlerinden biri olan laktoferrinin (LF) (Sharbafi vd., 2016: 19) yüksek miktarlarda demir bağlama kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir (Adlerova vd., 2008: 459). Demir, bakteriler için temel bir besin maddesi olmakla birlikte biyokimyasal, hücrel ve metabolik fonksiyonların düzenleyicisidir. Demir, biyofilm gelişimi ve büyümesi için gereklidir (Ammons ve Copié, 2013: 446). Yapılan bir çalışmada, sığır LF'nin *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *L. innocua* ve *L. monocytogenes* tarafından oluşturulan biyofilmleri doza bağımlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (Shahidi vd., 2020: 280). Mikroorganizmaların demire erişiminin sınırlandırılması onları hareket etmeye zorlayarak böylece yüzeylere tutunma-yapışma kabiliyetlerini azalttığından (Jahani vd., 2015: e27954), LF'nin demir bağlama kapasitesinin biyofilm üzerindeki inhibitör etki göstermesinin bir nedeni olarak öne sürülebilir. Wakabayashi ve ark. yaptıkları bir çalışmada, *Porphyromonas gingivalis* ve *Prevotella intermedia* tarafından önceden oluşturulan biyofilmi demir bağlı insan ve sığır kaynaklı LF ile 5 saat süreyle inkübe ederek, biyofilm yapısının azaldığını göstermişlerdir (Wakabayashi vd., 2009: 3310). Bozulmamış bir LF yapısının, biyofilm oluşumu üzerindeki inhibitör etkisi için önemli olabileceği varsayılmaktadır (Wakabayashi vd., 2009: 3310). *P. aeruginosa*'nın kullanıldığı *in vitro* çalışmalar, laktoferrinin biyofilm oluşumunu engellediğini ve mevcut biyofilmleri bozduğunu göstermiştir (Singh vd., 2002: 553; Lesman-Movshovich vd., 2003: 232). Başka bir çalışmada ise LF'nin klinik *P. aeruginosa* izolatlarının biyofilm oluşumunu inhibe ettiği ve aynı zamanda önceden oluşturulmuş biyofilmler üzerinde dağıtıcı etkisi olduğu gösterilmiştir (Kamiya vd., 2012: 49). LF'nin katepsin proteazları tarafından parçalanması sonucu, *P. aeruginosa* biyofilm oluşumu üzerindeki inhibitör aktivitesini yitirmesine neden olduğu bildirilmiştir (Rogan vd., 2004: 1246). Sığır sütünün toplam protein içeriğinin %80'ini oluşturan kazeinler ise, 4:1:4:1 oranlarında α S1-, α S2-, β - ve κ -kazeinden meydana gelmektedir (Kazimierska ve Kalinowska-Lis, 2021: 3253). Hidrolize κ -kazein'in bakterilerin yüzeye tutunma yeteneğini engelleyerek biyofilm oluşumunu inhibe ettiği belirtilmiştir (Duanis-Assaf vd., 2020: 221).

Ancak Varhimo ve ark tarafından yapılan bir çalışmada, kazein α ve β 'nin *Streptococcus uberis* biyofilm oluşumunu desteklediği, serin proteaz aktivitesine bağlı olarak kazein degradasyonun ise biyofilm üretimini en üst düzeye çıkardığı gösterilmiştir (Varhimo vd., 2011: 385). LAB, süt proteinlerini hidrolize edebilecek karmaşık proteolitik sistemlere sahiptir: proteaz aktivitesi sonucu polipeptidler ve oligopeptidler ve takiben daha küçük peptidler ve serbest amino asit grupları oluşur ki bu serbest amino asitler bakteriyel proliferasyon için gereklidir (Li vd., 2019: 3699). Amino asitler, mikrobiyal metabolizma ve mikrobiyal büyümeyi desteklemenin yanı sıra mikrobiyal biyofilm oluşumunda da önemli rol oynar. Ancak D-enantiyomerler veya D-amino asitlerin mikrobiyal biyofilmleri inhibe etme ve dağıtma yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (Idrees vd., 2020: 330). Yağsız süt, D-amino asitlere kıyasla oldukça yüksek miktarda amino asitlerin L formunu içermektedir (Gobbetti vd., 1993: 2502). Dolayısıyla *L. plantarum* proteolitik aktivitesine bağlı olarak ortaya çıkan serbest amino asitler, biyofilm gelişimini desteklemiş olabilir. Özetle, literatürdeki sonuçlar bazı süt proteinlerinin biyofilm oluşumunu inhibe ettiğini ve mevcut biyofilmler üzerinde dağıtıcı bir etkiye sahip olduğunu, ancak hidrolize durumda biyofilm destekleyici etki gösterebileceğini ortaya koymaktadır. *L. plantarum* da dahil olmak üzere birçok LAB, proteolitik aktiviteye sahip olduğundan fermantasyon sırasında kazein de dahil olmak üzere süt proteinlerini hidrolize edebilir (Edebalı vd., 2021: 270; Li vd., 2019: 3699). SLp gruplarında azalan protein profili de süt proteinlerinin *L. plantarum* tarafından metabolize edildiğini göstermektedir.

Antipatojenik ve önceden oluşturulan biyofilmi dağıtma özelliklere ek olarak, *L. plantarum* post-fermantasyon ortamınının kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri olduğu da bildirilmiştir (Chuah vd., 2019: 10). Glikoz içeren MRS'de büyütülen farklı *L. plantarum* suşlarından elde edilen post-fermantasyon ortamının HT-29 ve HCT-116 kolon kanseri hücrelerinde apoptozisi indüklediği *in vitro* çalışmalarla belirlenmiştir (Nami vd., 2014: 496; An ve Ha, 2016: 1492). Bu tez çalışmasında ise yalnızca SM veya TMS ile inkübe edilen *L. plantarum*'dan elde edilen post-fermantasyon ortamına kıyasla, SM ve TMS'yi bir arada içeren besi yerinde büyütülen probiyotikten elde edilen hücresiz besi yerinin, kolon kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin artmış olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, tek başına kullanıldıklarında hem SM hem de TMS, apoptozis teşvikinin bir göstergesi olarak XIAP ifadesinde azalmaya neden olmuştur. Anti-patojen aktivite analizinden elde edilen sonuçlara benzer şekilde bu sonuçlar, *L. plantarum* postbiyotiklerinin anti-kanser aktivitesinin de besi yeri içeriğinin değiştirilmesi yolu ile modüle edilebileceğini vurgulamaktadır.

Bu tez çalışmasında antibakteriyel, anti-biyofilm ve anti-kanser aktivitesi gösterilen *L. plantarum* post-fermantasyon ortamının metabolit içeriği FTIR spektroskopisi ile incelenmiştir. Belirli metabolik olayların kapsamlı bir şekilde detaylandırılmasında protein, yağ asitleri ve polisakkarit moleküllerindeki belirgin değişikliklerin nicel bir şekilde vurgulandığı ikincil türev spektrumları son derece faydalıdır (Gurbanov vd., 2021: 198). Proteinlerin üç boyutlu yapılarında meydana gelen değişiklikler (α -helix ve β -turn geçişleri), bakteri fizyolojisini şekillendiren çok çeşitli genetik mekanizmalar ile ilişkilendirilebilir (Gurbanov vd., 2021: 15). Bu çalışmada elde ettiğimiz bulgular, protein β -turn yapılarının azalırken α -helix yapılarındaki artışı göstermektedir. Antimikrobiyal Peptit Veritabanında (<https://aps.unmc.edu/>), bilinen AMP'lerin % 59,87'si bilinmeyen üç boyutlu yapılar olarak sunulur. β -konformasyonlu (% 2,67) ve birleşik helix/beta paketli yapılar (% 3,53) sahip AMP'ler gösterilmiş olsa da, AMP'lerin çoğu (% 14,22) helix peptitler olarak ortaya çıkar (APD, 2020a). Probiyotik *L. plantarum* suşlarının bilinen plantarisinleri (Plantarisin A, EF, JK) α -helix yapısındadır (APD, 2020b). Prebiyotiklerin varlığında, probiyotikler tarafından sentezlenen AMP üretiminin arttığı bilinmektedir (Gurbanov vd., 2021: 198). α -helix yapılarındaki artış probiyotik *L. plantarum* tarafından salınan plantarisinlerin bilinen protein konformasyonları ile uyumlu olduğundan, SM, TMS ve SM+TMS takviyesinin plantarisin üretimini teşvik edebileceği önerilebilir. Grubumuz tarafından yapılan önceki çalışmada tapyoka nişastası takviyesinin *S. salivarius* K12/M18 suşlarının α -helix protein yapısında artışa neden olduğu gösterilmiş olup, bu artış salivarisinler ile ilişkilendirilmiştir (Gurbanov vd., 2021: 199). Ayrıca, enzimatik işleme tabii tutulan yağsız süt proteinlerinin β -turn yapılarında azalma ve bununla birlikte α -helix yapılarında artış olduğu da bilinmektedir (Grewal vd., 2018: 162). *L. plantarum* tarafından süt proteinlerinin hidroliz edildiğini gösteren bir diğer sonuç, tirozin amino asit yan zincirlerinin (1611 cm^{-1}) SLP-SM ve SLP-TMS+SM gruplarında SLP grubuna kıyasla daha yüksek oranda bulunması, SLP-TMS grubunda ise değişim gözlenmemesidir. Tirozin, esansiyel olmayan bir aminoasittir ve bir süt proteini olan kazeinde yüksek miktarda bulunur (Kapalka, 2010: 90). Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar, daha önce bahsedildiği üzere *L. plantarum* proteolitik aktivitesine bağlı olarak serbest tirozin amino asitinde bir artışa işaret etmektedir. Çeşitli hormonlar ve epinefrin, norepinefrin ve dopamin gibi nörotransmitterler ile melanin sentezi için bir prekürsör olan tirozinin (Slominski vd., 2012: 19), *L. plantarum* probiyotik aktivitesinin bir sonucu olarak artış göstermesi, dikkat çekici bir bulgudur. Ek olarak plantarisinlerin aromatik amino asitler içerdiği ve aromatik amino asit kaybının aktivitede bir azalmaya neden olacağı bildirilmiştir (Syaputri ve Iwahashi, 2020: 128).

Bu bağlamda, tirozin aminoasit yan zincir titreşimleri ve C-H aromatik bağlarının yoğunluklarındaki artış göz önüne alındığında, SM ve TMS+SM prebiyotik takviyesinin, plantarisinlerin aktivitesini destekleyebileceği düşünülmektedir.

FTIR analizleri, SLp, SLp-TMS, SLp-TMS+SM ve SLp-G(+) gruplarının yağ asidi içeriğinin, SLp grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde azaldığını göstermektedir. Çoğu antimikrobiyal ajan genellikle yağ asitleri de dahil olmak üzere bakteri hücre zarlarının anahtar moleküllerini hedefler (Wang vd., 2018: 485). Çeşitli bakteri türleri, membran özelliklerinin modülasyonu ve antimikrobiallarla temasın en aza indirilmesi için yağ asidi bileşimlerini benzersiz bir şekilde değiştirir; belirli bakteriler için benzersiz olan yağ asitlerinin doğasına, türüne ve konsantrasyonuna göre yağ asidi bileşiminin modifikasyonu söz konusudur (Wang vd., 2018: 486; Zhu vd., 2014: 4090). Tapyoka nişastası ile zenginleştirilmiş ortamda yağ asitlerinin azalması, *de novo* lipid biyosentezinin inhibisyonu veya farklı metabolik aktiviteler için mevcut hücresel lipidlerin kullanımı ile ilişkilendirilebilir (Gurbanov vd., 2021: 197). Bununla birlikte, trigliserit ve kolesterol gibi daha büyük moleküllerin küçük doymuş yağ asitlerine (örneğin; SCFA'lar) parçalanması hücrenin metabolik önceliğine bağlı olarak gerçekleşir. Prebiyotik nişastaların, fonksiyonel SCFA'lar üretmek için probiyotik bakteriler tarafından kolonda fermente edildiği de bilinmektedir (Lockyer ve Nugent, 2017: 36; Zeng vd., 2017: 9220). SCFA'ların üretimi, probiyotik kapasitenin artırılması için önemli bir olay olabilir.

Bu tez çalışmasında post-fermentasyon ortamının spektral yöntemle analizi sonucu elde edilen bir diğer bulgu, selüloz yapısının düzlem dışı OH bükülmelerini yansıtan 664 cm^{-1} bandı bant yoğunluğunun, SLp grubuna kıyasla SLp-SM, SLp-TMS, SLp-TMS+SM ve SLp-G(+) gruplarının tümünde anlamlı bir şekilde artmış olmasıdır. Bakteriye selüloz (BS), bazı bakteriler tarafından üretilen hücre dışı bir polisakkarittir (Rajwade vd, 2015: 2496). BS, bitkilerden elde edilen selüloza kıyasla, yapısında hemiselüloz ve lignin barındırmadığından yüksek saflığa sahiptir ve basit üretim ve saflaştırma süreci nedeniyle son derece ilgi çekmektedir (Reiniati vd., 2017: 515). Selüloz gibi insan vücudunda sindirilemeyen, trigliserid ve toplam kolesterol seviyesini azaltabilen BS, geleneksel olarak Güney Doğu Asya'da üretilen bazı yerel gıdalarda kullanılmaktadır. BS'lar, gıda endüstrisi dışında, yem üretimi, kozmetik, ağaç ürünleri, kağıt, selüloz türevleri, sürdürülebilir yakıt üretimi ve tekstil alanlarında faydalı yeni ürünlerin geliştirilmesinde kullanılabilir (Tunçer, 2021: 99). BS üretimi genellikle asetik asit bakterilerine atfedilmektedir ancak Adetunji ve Adegoke tarafından yapılan bir çalışmada LAB'nin (*L. plantarum* dahil) de BS üreticisi olduğu gösterilmiştir (Adetunji ve Adegoke, 2007: 2617).

LAB'nin BS üretim potansiyelinin araştırıldığı bir tez çalışmasında ise *Lactobacillus rhamnosus*'un yüksek verimde BS ürettiği gösterilmiştir (Gürsoy, 2016). BS üretimi taksonlar arasında farklılıklar gösterebilir ve hatta organizmanın büyüme koşullarına bağlı olarak değişebilir (Tunçer, 2021: 98). Glikozun, BS üretimi için en iyi karbon kaynağı olduğu rapor edilmiştir (Castro vd., 2012: 1035). Ancak ekonomik maliyetinden dolayı araştırmacılar BS üretimi için yeni karbon kaynağı arayışı içindedirler (Supian vd., 2021: 012048). Bu çalışmada elde edilen bulgular, *L. plantarum* post-fermantasyon ortamının artmış selüloz miktarlarını göstermektedir. Pozitif kontrol olarak kullanılan glikoz ortamı ile karşılaştırıldığında, düşük maliyetli dirençli tapyoka nişastası, BS üretimi için bir karbon kaynağı olarak kullanılabilir.

DN, tüketicilere, özellikle aşırı kilolu veya obez olan diyabetliler için, açlık glikozunu ve açlık insülinini düzenlemek, insülin direncini azaltmak ve duyarlılığını arttırmak gibi sağlık yararları sunar (Wang vd, 2019b: 9). Doğal kaynaklı bir gıda bileşeni olarak daha kremi ve daha yoğun duyumlar sağlamak için gıda endüstrisinde stabilizatör olarak da kullanılabilir (Lobato-Calleros vd., 2014: 112; Morell vd., 2015: 69). Yağsız süt tozu ile hazırlanan yağı azaltılmış yoğurtlara DN ilavesinin, yağsız süt jellerindeki nişasta granüllerinin suyu emerek şişmesi sırasında süt protein konsantrasyonunu artırabileceğini öne süren önceki raporlara uygun olarak (Lobato-Calleros vd., 2014: 112) DN'nin büyük boyutlu kazein yumakları oluşturarak sinerezi azalttığı da gösterilmiştir (Zuo vd., 2008: 1570; Singh ve Byars, 2009: 108). Bu nedenle, tapyoka nişastası ve yağsız süt, süt ürünlerinin reolojik, yapısal ve duyusal özelliklerini geliştirmenin yanı sıra, tüketicilere sağlık yararları sunmak için fonksiyonel gıdaların ve probiyotik süt ürünlerinin üretiminde bir üretim stratejisi olarak uygulanabilir. Mevcut literatür, postbiyotiklerin, canlı probiyotiklerin kullanımına yönelik risklerden de kaçınmak üzere, mikrobiyal bozulmayı önlemek ve fonksiyonel gıdalar geliştirmek için gıda pratiğinde umut verici araçlar olarak uygulanabileceğini göstermektedir (Moradi vd., 2020: 3398). Bu çalışmanın bulguları, yağsız süt tozu ve tapyoka nişastasının birlikte kullanımının bir probiyotik olarak *L. plantarum*'un anti-bakteriyel ve anti-kanser özelliklerini desteklediğine işaret etmektedir; başka bir deyişle, bu kombinasyon *L. plantarum*'un probiyotik potansiyelini arttırmaktadır. Düşük maliyetli, kolay erişilebilir, doğal ve “temiz etiketli (clean label)” gıda bileşenleri olarak nişasta bazlı prebiyotik tapyoka ve yağsız süt yoluyla *L. plantarum* postbiyotiklerinin biyofonksiyonelliğinin modülasyonunu göstermek açısından önemli olan bu tez çalışması, diyetin mikrobiyotayı ve aktivitesini etkileyebileceğine işaret etmesi açısından da önemlidir ve yeni araştırma konularına kapı açacak sonuçlar sunmaktadır.

KAYNAKÇA

- Abdulhussain Kareem, R., & Razavi, S. H.** (2020). Plantaricin bacteriocins: As safe alternative antimicrobial peptides in food preservation—A review. *Journal of Food Safety*, 40(1), e12735.
- Abedi, D., Feizizadeh, S., Akbari, V., & Jafarian-Dehkordi, A.** (2013). In vitro anti-bacterial and anti-adherence effects of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* on *Escherichia coli*. *Research in pharmaceutical sciences*, 8(4), 260.
- Abenavoli, L., Scarpellini, E., Colica, C., Boccuto, L., Salehi, B., Sharifi-Rad, J., ... & Capasso, R.** (2019). Gut microbiota and obesity: a role for probiotics. *Nutrients*, 11(11), 2690.
- Abidi, N.; Cabrales, L.; Haigler, C.H.** (2014). Changes in the cell wall and cellulose content of developing cottonfibers investigated by FTIR spectroscopy. *Carbohydr. Polym.*, 100, 9–16
- Adetunji, V. O., & Adegoke, G. O.** (2007). Bacteriocin and cellulose production by lactic acid bacteria isolated from West African soft cheese. *African Journal of Biotechnology*, 6(22), 2616-2619.
- Adlerova, L., Bartoskova, A., & Faldyna, M. J. V. M.** (2008). Lactoferrin: a review. *Veterinarni Medicina*, 53(9), 457-468.
- Aguilar-Toalá, J. E., Garcia-Varela, R., Garcia, H. S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., & Hernández-Mendoza, A.** (2018). Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 105-114.
- Alakomi, H. L., Skytta, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., & Helander, I. M.** (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and environmental microbiology*, 66(5), 2001-2005.
- Ammons, M. C., & Copié, V.** (2013). Mini-review: Lactoferrin: a bioinspired, anti-biofilm therapeutic. *Biofouling*, 29(4), 443-455.
- An, J., & Ha, E. M.** (2016). Combination therapy of *Lactobacillus plantarum* supernatant and 5-fluouracil increases chemosensitivity in colorectal cancer cells. *Journal of microbiology and biotechnology*, 26(8), 1490-1503.
- Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., Ilavenil, S., Choi, K. C., & Srigopalram, S.** (2016). In vitro importance of probiotic *Lactobacillus plantarum* related to medical field. *Saudi journal of biological sciences*, 23(1), S6-S10.

- Arias, A. B., de la Luz Reyes, M., Navarro, M. L., Solis, Y. B., Márquez, M., Sanchez, G., ... & Zuñiga, R.** (2013). Antagonistic effect of probiotic strains against two pathogens: Salmonella Typhimurium and E. coli O157: H7 resistant to antibiotics. *e-Gnosis*, 11, 1-16.
- Arshad, N. H., Zaman, S. A., Rawi, M. H., & Sarbini, S. R.** (2018). Resistant starch evaluation and in vitro fermentation of lemantak (native sago starch), for prebiotic assessment. *International Food Research Journal*, 25(3), 951-957.
- Ashenafi, M., & Busse, M.** (1991). Growth potential of Salmonella infantis and Escherichia coli in fermenting tempeh made from horsebean, pea and chickpea and their inhibition by Lactobacillus plantarum. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 55(4), 607-615.
- Ashwar, B. A., Gani, A., Shah, A., Wani, I. A., & Masoodi, F. A.** (2016). Preparation, health benefits and applications of resistant starch—A review. *Starch-Stärke*, 68(3-4), 287-301.
- Baindara, P., Korpole, S., & Grover, V.** (2018). Bacteriocins: perspective for the development of novel anticancer drugs. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(24), 10393-10408.
- Barros, C. P., Guimarães, J. T., Esmerino, E. A., Duarte, M. C. K., Silva, M. C., Silva, R., ... & Cruz, A. G.** (2020). Paraprobiotics and postbiotics: concepts and potential applications in dairy products. *Current Opinion in Food Science*, 32, 1-8.
- Behera, S. S., Ray, R. C., & Zdolec, N.** (2018). Lactobacillus plantarum with functional properties: an approach to increase safety and shelf-life of fermented foods. *BioMed Research International*, 1-18.
- Bello-Perez, L. A., Flores-Silva, P. C., Agama-Acevedo, E., & Tovar, J.** (2020). Starch digestibility: past, present, and future. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(14), 5009-5016.
- Berer, K., Gerdes, L. A., Cekanaviciute, E., Jia, X., Xiao, L., Xia, Z., ... & Wekerle, H.** (2017). Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(40), 10719-10724.
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorrente, C., & Gil, A.** (2012). Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61(2), 160-174.
- Bindels, L. B., Munoz, R. R. S., Gomes-Neto, J. C., Mutemberezi, V., Martínez, I., Salazar, N., ... & Ramer-Tait, A. E.** (2017). Resistant starch can improve insulin sensitivity independently of the gut microbiota. *Microbiome*, 5(1), 1-16.

- Blacher, E., Levy, M., Tatirovsky, E., & Elinav, E.** (2017). Microbiome-modulated metabolites at the interface of host immunity. *The Journal of Immunology*, 198(2), 572-580.
- Bohan, R., Tianyu, X., Tiantian, Z., Ruonan, F., Hongtao, H., Qiong, W., & Chao, S.** (2019). Gut microbiota: a potential manipulator for host adipose tissue and energy metabolism. *The journal of nutritional biochemistry*, 64, 206-217.
- Boudjelal, F., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., & Sabaou, N.** (2011). Taxonomic study and partial characterization of antimicrobial compounds from a moderately halophilic strain of the genus *Actinoalloteichus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(3), 835-845.
- Buntin, N., & Hongpattarakere, T.** (2014). Antimicrobial activity and plantaricin (pln) encoding genes of *Lactobacillus plantarum* isolated from various sources. *Journal of Biotechnology*, (185), S74.
- Candoğan, K., Altuntas, E. G., & İğci, N.** (2021). Authentication and Quality Assessment of Meat Products by Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. *Food Engineering Reviews*, 13(1), 66-91.
- Canfora, E. E., Jocken, J. W., & Blaak, E. E.** (2015). Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nature Reviews Endocrinology*, 11(10), 577.
- Cani, P. D.** (2018). Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut*, 67(9), 1716-1725.
- Cani, P. D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Knauf, C., Burcelin, R. G., Tuohy, K. M., ... & Delzenne, N. M.** (2007). Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*, 50(11), 2374-2383..
- Cani, P. D., Van Hul, M., Lefort, C., Depommier, C., Rastelli, M., & Everard, A.** (2019). Microbial regulation of organismal energy homeostasis. *Nature metabolism*, 1(1), 34-46.
- Cánovas, A., & Alvarez, J. Á. P.** (2006). La fibra dietética: Un ingrediente para el desarrollo de alimentos funcionales. *Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos*, (376), 87-91.
- Carding, S., Verbeke, K., Vipond, D. T., Corfe, B. M., & Owen, L. J.** (2015). Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microbial ecology in health and disease*, 26(1), 26191.
- Castro, C., Zuluaga, R., Álvarez, C., Putaux, J. L., Caro, G., Rojas, O. J., ... & Gañán, P.** (2012). Bacterial cellulose produced by a new acid-resistant strain of *Gluconacetobacter* genus. *Carbohydrate polymers*, 89(4), 1033-1037.
- Charoenthai, N., Sanga-ngam, T., & Puttipipatkachorn, S.** (2018). Use of modified tapioca starches as pharmaceutical excipients. *Pharm Sci Asia*, 45, 195-204.

- Chiara, M. M., Franco, S., Marco, P., Antonio, G., & Donato, M. G. A.** (2020). Nutrition, IBD and Gut Microbiota: A Review. *Nutrients*, 12(4), 944.
- Chuah, L. O., Foo, H. L., Loh, T. C., Alitheen, N. B. M., Yeap, S. K., Mutalib, N. E. A., ... & Yusoff, K.** (2019). Postbiotic metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* strains exert selective cytotoxicity effects on cancer cells. *BMC complementary and alternative medicine*, 19(1), 1-12.
- Chung, P. Y.** (2016). The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. *FEMS microbiology letters*, 363(20), fnw219.
- Cintas, L. M., Casaus, M. P., Herranz, C., Nes, I. F., & Hernández, P. E.** (2001). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Science and Technology International*, 7(4), 281-305.
- Conte, M. P., Schippa, S., Zamboni, I., Penta, M., Chiarini, F., Seganti, L., ... & Cucchiara, S.** (2006). Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, 55(12), 1760-1767.
- Corrêa-Oliveira, R., Fachi, J. L., Vieira, A., Sato, F. T., & Vinolo, M. A. R.** (2016). Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clinical & translational immunology*, 5(4), e73.
- Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C.** (2013). Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics?. *Nature Reviews Microbiology*, 11(2), 95-105.
- Crittenden, R., Laitila, A., Forssell, P., Matto, J., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., & Myllarinen, P.** (2001). Adhesion of bifidobacteria to granular starch and its implications in probiotic technologies. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3469-3475.
- Danilova, T. A., Danilina, G. A., Adzhieva, A. A., Minko, A. G., Nikolaeva, T. N., Zhukhovitskii, V. G., & Pronin, A. V.** (2017). Effects of miramistin and phosprenil on microbial biofilms. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 163(4), 439-442.
- Danilova, T. A., Adzhieva, A. A., Danilina, G. A., Polyakov, N. B., Soloviev, A. I., & Zhukhovitsky, V. G.** (2019). Antimicrobial activity of supernatant of *Lactobacillus plantarum* against pathogenic microorganisms. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 167(6), 751-754.
- De Giani, A., Bovio, F., Forcella, M., Fusi, P., Sello, G., & Di Gennaro, P.** (2019). Identification of a bacteriocin-like compound from *Lactobacillus plantarum* with antimicrobial activity and effects on normal and cancerogenic human intestinal cells. *AMB Express*, 9(1), 1-11.

- De Palma, G., Lynch, M. D., Lu, J., Dang, V. T., Deng, Y., Jury, J., ... & Bercik, P.** (2017). Transplantation of fecal microbiota from patients with irritable bowel syndrome alters gut function and behavior in recipient mice. *Science translational medicine*, 9(379).
- de Souza, C. B., Roeselers, G., Troost, F., Jonkers, D., Koenen, M. E., & Venema, K.** (2014). Prebiotic effects of cassava bagasse in TNO's in vitro model of the colon in lean versus obese microbiota. *Journal of functional foods*, 11, 210-220.
- De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., Goncalves, D., Vinera, J., Zitoun, C., Duchampt, A., ... & Mithieux, G.** (2014). Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell*, 156(1-2), 84-96.
- De Vries, M. C., Vaughan, E. E., Kleerebezem, M., & de Vos, W. M.** (2006). *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, 16(9), 1018-1028.
- Dept of Pathology & Microbiology; University of Nebraska Medical Center** (2020a) The Antimicrobial Peptide Database (APD). http://aps.unmc.edu/AP/statistic/statistic_structure.php.
- Dept of Pathology & Microbiology; University of Nebraska Medical Center** (2020b) The Antimicrobial Peptide Database (APD). http://aps.unmc.edu/AP/database/query_input.php.
- Devi, S. M., & Halami, P. M.** (2019). Genetic variation of pln loci among probiotic *Lactobacillus plantarum* group strains with antioxidant and cholesterol-lowering ability. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11(1), 11-22.
- Dinev, T., Beev, G., Tzanova, M., Denev, S., Dermendzhieva, D., & Stoyanova, A.** (2018). Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* against pathogenic and food spoilage microorganisms: a review. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 21(3).
- Doblies, A., Boll, B., & Fiedler, B.** (2019). Prediction of thermal exposure and mechanical behavior of epoxy resin using artificial neural networks and Fourier transform infrared spectroscopy. *Polymers*, 11(2), 363.
- Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R.** (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(26), 11971-11975.
- Duanis-Assaf, D., Kenan, E., Sionov, R., Steinberg, D., & Shemesh, M.** (2020). Proteolytic activity of *Bacillus subtilis* upon κ -casein undermines its “caries-safe” effect. *Microorganisms*, 8(2), 221.

- Duar, R. M., Lin, X. B., Zheng, J., Martino, M. E., Grenier, T., Pérez-Muñoz, M. E., ... & Walter, J.** (2017). Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(Supp_1), S27-S48.
- Dumas, M. E., Barton, R. H., Toye, A., Cloarec, O., Blancher, C., Rothwell, A., ... & Nicholson, J. K.** (2006). Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proceedings of the national academy of sciences*, 103(33), 12511-12516.
- Dunkley, K. D., Callaway, T. R., Chalova, V. I., McReynolds, J. L., Hume, M. E., Dunkley, C. S., ... & Ricke, S. C.** (2009). Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. *Anaerobe*, 15(1-2), 26-35.
- Edebali, E., Özdemir, S., & Özdemir, C.** (2021). Süt ve Süt Ürünlerinde Bulunan Biyoaktif Peptitler ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 11(1), 268-280.
- Elgendy, S. G., Hameed, M. R. A., & El-Mokhtar, M. A.** (2018). Tigecycline resistance among *Klebsiella pneumoniae* isolated from febrile neutropenic patients. *Journal of medical microbiology*, 67(7), 972.
- Eliasson, A. C. (Ed.).** (2004). Starch in food: Structure, function and applications. *CRC press*.
- Emoto, T., Yamashita, T., Sasaki, N., Hirota, Y., Hayashi, T., So, A., ... & Hirata, K. I.** (2016). Analysis of gut microbiota in coronary artery disease patients: a possible link between gut microbiota and coronary artery disease. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 32672.
- Enan, G., El-Essawy, A. A., Uyttendaele, M., & Debevere, J.** (1996). Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UG1 isolated from dry sausage: characterization, production and bactericidal action of plantaricin UG1. *International journal of food microbiology*, 30(3), 189-215.
- Erickson, J. M., Carlson, J. L., Stewart, M. L., & Slavin, J. L.** (2018). Fermentability of novel type-4 resistant starches in in vitro system. *Foods*, 7(2), 18.
- Faith, J. J., Guruge, J. L., Charbonneau, M., Subramanian, S., Seedorf, H., Goodman, A. L., ... & Gordon, J. I.** (2013). The long-term stability of the human gut microbiota. *Science*, 341(6141), 44-52.
- Fan, Y., & Pedersen, O.** (2020). Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 1-17.
- Feng, W., Ao, H., & Peng, C.** (2018). Gut microbiota, short-chain fatty acids, and herbal medicines. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1354.

- Flint, H. J., Scott, K. P., Louis, P., & Duncan, S. H.** (2012). The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 9(10), 577.
- Foo, H. L., Loh, T. C., Law, F. L., Lim, Y. Z., Kufli, C. N., & Rusul, G.** (2003). Effects of feeding *Lactobacillus plantarum* I-UL4 isolated from Malaysian Tempeh on growth performance, faecal flora and lactic acid bacteria and plasma cholesterol concentrations in postweaning rats. *Food Science and Biotechnology*, 12(4), 403-408.
- Frank, D. N., Amand, A. L. S., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N., & Pace, N. R.** (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(34), 13780-13785.
- Frank, D. N., Robertson, C. E., Hamm, C. M., Kpadeh, Z., Zhang, T., Chen, H., ... & Li, E.** (2011). Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases*, 17(1), 179-184.
- Frost, G., Sleeth, M. L., Sahuri-Arisoylu, M., Lizarbe, B., Cerdan, S., Brody, L., ... & Bell, J. D.** (2014). The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nature communications*, 5(1), 1-11.
- Fuentes-Zaragoza, E., Sánchez-Zapata, E., Sendra, E., Sayas, E., Navarro, C., Fernández-López, J., & Pérez-Alvarez, J. A.** (2011). Resistant starch as prebiotic: A review. *Starch-Stärke*, 63(7), 406-415.
- Gao, X., Liu, X., Xu, J., Xue, C., Xue, Y., & Wang, Y.** (2014). Dietary trimethylamine N-oxide exacerbates impaired glucose tolerance in mice fed a high fat diet. *Journal of bioscience and bioengineering*, 118(4), 476-481.
- Garcha, S.** (2018). Control of food spoilage molds using *Lactobacillus* bacteriocins. *J Pure Appl Microbiol*, 12(3), 624.
- Garip, S., Gozen, A. C., & Severcan, F.** (2009). Use of Fourier transform infrared spectroscopy for rapid comparative analysis of *Bacillus* and *Micrococcus* isolates. *Food Chemistry*, 113(4), 1301-1307.
- Gaudana, S. B., Dhanani, A. S., & Bagchi, T.** (2010). Probiotic attributes of *Lactobacillus* strains isolated from food and of human origin. *British Journal of Nutrition*, 103(11), 1620-1628.
- Gevers, D., Kugathasan, S., Denson, L. A., Vázquez-Baeza, Y., Van Treuren, W., Ren, B., ... & Xavier, R. J.** (2014). The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell host & microbe*, 15(3), 382-392.

- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., ... & 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.
- Gibson, G. R., Scott, K. P., Rastall, R. A., Tuohy, K. M., Hotchkiss, A., Dubert-Ferrandon, A., ... & Buddington, R.** (2010). Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Sci Technol Bull Funct Foods*, 7(1), 1-19.
- Gobbetti, M., Magnarini, C., Rossi, J., Cossignani, L., & Damiani, P.** (1993). Free D-and L-amino acids from hydrolyzed milk proteins by *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948. *Journal of dairy science*, 76(9), 2500-2506.
- Golowczyc, M. A., Mobili, P., Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L.** (2007). Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *International journal of food microbiology*, 118(3), 264-273.
- Gong, H. S., Meng, X. C., & Wang, H.** (2010). Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1. 0391 isolated from “Jiaoke”, a traditional fermented cream from China. *Food control*, 21(1), 89-96.
- Gresse, R., Chaucheyras-Durand, F., Fleury, M. A., Van de Wiele, T., Forano, E., & Blanquet-Diot, S.** (2017). Gut microbiota dysbiosis in postweaning piglets: understanding the keys to health. *Trends in microbiology*, 25(10), 851-873.
- Grewal, M. K., Huppertz, T., & Vasiljevic, T.** (2018). FTIR fingerprinting of structural changes of milk proteins induced by heat treatment, deamidation and dephosphorylation. *Food Hydrocolloids*, 80, 160-167.
- Gubert, C., Kong, G., Renoir, T., & Hannan, A. J.** (2020). Exercise, diet and stress as modulators of gut microbiota: Implications for neurodegenerative diseases. *Neurobiology of disease*, 134, 104621.
- Gurbanov, R.** (2020). Otizm Spektrum Bozukluğuna Moleküler Bakış: Genetik ve İmmünolojik Etmenler ile Bağırsak Mikrobiyotası üzerine Bulgular. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 29(1), 8-23.
- Gurbanov, R., & Tunçer, S.** (2021). The Use of Fourier-Transform Infrared Spectroscopy to Determine Potential Starch-based Prebiotics. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 24(1), 22-30.
- Gurbanov, R., & Unal, D.** (2018). The biomolecular alterations in *cladonia convoluta* in response to lead exposure. *Spectroscopy Letters*, 51(10), 563-570.

- Gurbanov, R., & Yıldız, F.** (2017). Molecular profile of oral probiotic bacteria to be used with functional foods. *Food and Health*, 3(3), 117-131.
- Gurbanov, R., Karadağ, H., Karaçam, S., & Samgane, G.** (2021). Tapioca starch modulates cellular events in oral probiotic *Streptococcus salivarius* strains. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 13(1), 195-207.
- Gurbanov, R., Simsek Ozek, N., Gozen, A. G., & Severcan, F.** (2015). Quick discrimination of heavy metal resistant bacterial populations using infrared spectroscopy coupled with chemometrics. *Analytical chemistry*, 87(19), 9653-9661.
- Gür, F., Güzel, M., Öncül, N., Yıldırım, Z., & Yıldırım, M.** (2010). Süt serum proteinleri ve türevlerinin biyolojik ve fizyolojik aktiviteleri. *Akademik Gıda*, 8(1), 23-31.
- Gürsoy, C.** (2016). Laktik Asit Bakterilerinin Bakteriyel Selüloz Üretim Potansiyelinin Araştırılması Ve Optimizasyon Çalışmasının Yapılması (Yüksek Lisans Tezi). Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Hands, J. R., Dorling, K. M., Abel, P., Ashton, K. M., Brodbelt, A., Davis, C., ... & Baker, M. J.** (2014). Attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectral discrimination of brain tumour severity from serum samples. *Journal of biophotonics*, 7(3-4), 189-199.
- Hanny, E. L. L., Mustopa, A. Z., Budiarti, S., Darusman, H. S., & Ningrum, R. A.** (2019). Efficacy, toxicity study and antioxidant properties of plantaricin E and F recombinants against enteropathogenic *Escherichia coli* K1. 1 (EPEC K1. 1). *Molecular biology reports*, 46(6), 6501-6512.
- Haris, P. I., & Severcan, F.** (1999). FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 7(1-4), 207-221.
- Hata, T., Tanaka, R., & Ohmomo, S.** (2010). Isolation and characterization of plantaricin ASM1: a new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* A-1. *International journal of food microbiology*, 137(1), 94-99.
- Heeney, D. D., Yarov-Yarovoy, V., & Marco, M. L.** (2019). Sensitivity to the two peptide bacteriocin plantaricin EF is dependent on CorC, a membrane-bound, magnesium/cobalt efflux protein. *Microbiologyopen*, 8(11), e827.
- Heianza, Y., Sun, D., Li, X., DiDonato, J. A., Bray, G. A., Sacks, F. M., & Qi, L.** (2018). Gut Microbiota Metabolites. Amino Acid Metabolites and Improvements in Insulin Sensitivity and Glucose Metabolism: The POUNDS Lost Trial. *Gut*, 67.

- Helander, I. M., Nurmiäho-Lassila, E. L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., & Roller, S.** (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International journal of food microbiology*, 71(2-3), 235-244.
- Higgins, J. A., & Brown, I. L.** (2013). Resistant starch: a promising dietary agent for the prevention/treatment of inflammatory bowel disease and bowel cancer. *Current opinion in gastroenterology*, 29(2), 190-194.
- Hollister, E. B., Gao, C., & Versalovic, J.** (2014). Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. *Gastroenterology*, 146(6), 1449-1458.
- Hsiao, E. Y., McBride, S. W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E. R., McCue, T., ... & Mazmanian, S. K.** (2013). Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*, 155(7), 1451-1463.
- Hsien-Chih, H. W., & Sarko, A.** (1978). The double-helical molecular structure of crystalline A-amylose. *Carbohydrate Research*, 61(1), 27-40.
- Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J. H., Chinwalla, A. T., ... & McCarrison, J. M.** (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *nature*, 486(7402), 207.
- Idrees, M., Mohammad, A. R., Karodia, N., & Rahman, A.** (2020). Multimodal role of amino acids in microbial control and drug development. *Antibiotics*, 9(6), 330.
- Ilhan, N.** (2018). Gut microbiota and metabolism. *Int. J. Med. Biochem*, 1, 115-128.
- Isleten, M., & Karagul-Yuceer, Y. O. N. C. A.** (2006). Effects of dried dairy ingredients on physical and sensory properties of nonfat yogurt. *Journal of dairy science*, 89(8), 2865-2872.
- Jahani, S., Shakiba, A., & Jahani, L.** (2015). The Antimicrobial effect of lactoferrin on Gram-negative and Gram-positive bacteria. *International Journal of Infection*, 2(3). e27954.
- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., & Reddy, D. N.** (2015). Role of the normal gut microbiota. *World journal of gastroenterology: WJG*, 21(29), 8787.
- Jiang, H., Jane, J. L., Acevedo, D., Green, A., Shinn, G., Schrenker, D., ... & Wu, Y.** (2010). Variations in starch physicochemical properties from a generation-means analysis study using amylomaize V and VII parents. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(9), 5633-5639.

- Johansson, M. L., Molin, G., Jeppsson, B., Nobaek, S., Ahrne, S., & Bengmark, S.** (1993). Administration of different Lactobacillus strains in fermented oatmeal soup: in vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. *Applied and environmental microbiology*, 59(1), 15-20.
- Johansson, M. L., Nobaek, S., Berggren, A., Nyman, M., Björck, I., Ahrne, S., ... & Molin, G.** (1998). Survival of Lactobacillus plantarum DSM 9843 (299v), and effect on the short-chain fatty acid content of faeces after ingestion of a rose-hip drink with fermented oats. *International journal of food microbiology*, 42(1-2), 29-38.
- Kamiya, H., Ehara, T., & Matsumoto, T.** (2012). Inhibitory effects of lactoferrin on biofilm formation in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 18(1), 47-52.
- Kapalka, G. M.** (2010). Substances involved in neurotransmission. *Nutritional and herbal therapies for children and adolescents*, 71-99.
- Karaçam, S., & Tunçer, S.** (2021). Exploiting the Acidic Extracellular pH: Evaluation of Streptococcus salivarius M18 Postbiotics to Target Cancer Cells. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-17.
- Kareem, K. Y., Ling, F. H., Chwen, L. T., Foong, O. M., & Asmara, S. A.** (2014). Inhibitory activity of postbiotic produced by strains of Lactobacillus plantarum using reconstituted media supplemented with inulin. *Gut pathogens*, 6(1), 1-7.
- Kasote, D. M., Oak, M. D., Nilegaonkar, S. S., & Agte, V. V.** (2018). Effect of soaking and autoclaving treatments on structure, properties and resistant starch (RS3) content of edible tapioca pearls. *International Food Research Journal*, 25(1).
- Kaulpiboon, J., Rudeekulthamrong, P., Watanasatitarpa, S., Ito, K., & Pongsawasdi, P.** (2015). Synthesis of long-chain isomaltooligosaccharides from tapioca starch and an in vitro investigation of their prebiotic properties. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 120, 127-135.
- Kazimierska, K., & Kalinowska-Lis, U.** (2021). Milk Proteins—Their Biological Activities and Use in Cosmetics and Dermatology. *Molecules*, 26(11), 3253.
- Kelly, J. R., Borre, Y., O'Brien, C., Patterson, E., El Aidy, S., Deane, J., ... & Dinan, T. G.** (2016). Transferring the blues: depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. *Journal of psychiatric research*, 82, 109-118.
- Koeth, R. A., Levison, B. S., Culley, M. K., Buffa, J. A., Wang, Z., Gregory, J. C., ... & Hazen, S. L.** (2014). γ -Butyrobetaine is a proatherogenic intermediate in gut microbial metabolism of L-carnitine to TMAO. *Cell metabolism*, 20(5), 799-812.

- Koohestani, M., Moradi, M., Tajik, H., & Badali, A.** (2018). Effects of cell-free supernatant of *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Lactobacillus casei* 431 against planktonic form and biofilm of *Staphylococcus aureus*. *In Veterinary Research Forum* (Vol. 9, No. 4, p. 301). Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
- Kostelac, D., Gerić, M., Gajski, G., Markov, K., Domijan, A. M., Čanak, I., ... & Frece, J.** (2021). Lactic acid bacteria isolated from equid milk and their extracellular metabolites show great probiotic properties and anti-inflammatory potential. *International Dairy Journal*, 112, 104828.
- Kuete, V., Karaosmanoğlu, O., & Sivas, H.** (2017). Anticancer activities of African medicinal spices and vegetables. *In Medicinal spices and vegetables from Africa* (pp. 271-297). Academic Press.
- Lasch, P., & Naumann, D.** (2006). Infrared spectroscopy in microbiology. *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*, 1-32.
- LeBlanc, J. G., Chain, F., Martín, R., Bermúdez-Humarán, L. G., Courau, S., & Langella, P.** (2017). Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria. *Microbial cell factories*, 16(1), 1-10.
- Lepage, P., Leclerc, M. C., Joossens, M., Mondot, S., Blottière, H. M., Raes, J., ... & Doré, J.** (2013). A metagenomic insight into our gut's microbiome. *Gut*, 62(1), 146-158.
- Lesman-Movshovich, E., Lerrer, B., & Gilboa-Garber, N.** (2003). Blocking of *Pseudomonas aeruginosa* lectins by human milk glycans. *Canadian journal of microbiology*, 49(3), 230-235.
- Ley, R. E., Peterson, D. A., & Gordon, J. I.** (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 124(4), 837-848.
- Li, J., Butcher, J., Mack, D., & Stintzi, A.** (2015). Functional impacts of the intestinal microbiome in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*, 21(1), 139-153.
- Li, S., Tang, S., He, Q., Hu, J., & Zheng, J.** (2019). Changes in proteolysis in fermented milk produced by *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus plantarum* or *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* during refrigerated storage. *Molecules*, 24(20), 3699.
- Link, A. J., & LaBaer, J.** (2011). Trichloroacetic acid (TCA) precipitation of proteins. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011(8), 992-994 pdb-prot5651.

- Liu, H., Zhang, L., Yi, H., Han, X., & Chi, C.** (2016). Identification and characterization of plantaricin Q7, a novel plantaricin produced by *Lactobacillus plantarum* Q7. *LWT-Food Science and Technology*, 71, 386-390.
- Liu, Y., & Kim, H. J.** (2017). Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and simple algorithm analysis for rapid and non-destructive assessment of developmental cotton fibers. *Sensors*, 17(7), 1469.
- Lobato-Calleros, C., Ramírez-Santiago, C., Vernon-Carter, E. J., & Alvarez-Ramirez, J.** (2014). Impact of native and chemically modified starches addition as fat replacers in the viscoelasticity of reduced-fat stirred yogurt. *Journal of Food Engineering*, 131, 110-115.
- Lockyer, S., & Nugent, A. P.** (2017). Health effects of resistant starch. *Nutrition bulletin*, 42(1), 10-41.
- Long, S. L., Gahan, C. G., & Joyce, S. A.** (2017). Interactions between gut bacteria and bile in health and disease. *Molecular aspects of medicine*, 56, 54-65.
- Lupp, C., Robertson, M. L., Wickham, M. E., Sekirov, I., Champion, O. L., Gaynor, E. C., & Finlay, B. B.** (2007). Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell host & microbe*, 2(2), 119-129.
- Macfarlane, G. T., & Macfarlane, S.** (2012). Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. *Journal of AOAC International*, 95(1), 50-60.
- Machiels, K., Joossens, M., Sabino, J., De Preter, V., Arijis, I., Eeckhaut, V., ... & Vermeire, S.** (2014). A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut*, 63(8), 1275-1283.
- Macia, L., Tan, J., Vieira, A. T., Leach, K., Stanley, D., Luong, S., ... & Mackay, C. R.** (2015). Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. *Nature communications*, 6(1), 1-15.
- Maggioni, G. M., Kocevská, S., Rousseau, R. W., & Grover, M. A.** (2019, November). Blind Source Separation in Raman and ATR-FTIR Spectroscopy: A Processing Case Study. *In 2019 AIChE Annual Meeting*. AIChE.
- Makki, K., Deehan, E. C., Walter, J., & Bäckhed, F.** (2018). The impact of dietary fiber on gut microbiota in host health and disease. *Cell host & microbe*, 23(6), 705-715.
- Markowiak, P., & Śliżewska, K.** (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9), 1021.

- Martinez, R. C. R., Wachsman, M., Torres, N. I., LeBlanc, J. G., Todorov, S. D., & de Melo Franco, B. D. G.** (2013). Biochemical, antimicrobial and molecular characterization of a noncytotoxic bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST71KS. *Food microbiology*, 34(2), 376-381.
- Matijašić, M., Meštrović, T., Perić, M., Čipčić Paljetak, H., Panek, M., Vranešić Bender, D., ... & Verbanac, D.** (2016). Modulating composition and metabolic activity of the gut microbiota in IBD patients. *International journal of molecular sciences*, 17(4), 578.
- Mazidi, M., Rezaie, P., Kengne, A. P., Mobarhan, M. G., & Ferns, G. A.** (2016). Gut microbiome and metabolic syndrome. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 10(2), S150-S157.
- Meade, E., Slattery, M. A., & Garvey, M.** (2020). Bacteriocins, potent antimicrobial peptides and the fight against multi drug resistant species: resistance is futile?. *Antibiotics*, 9(1), 32.
- Messi, P., Bondi, M., Sabia, C., Battini, R., & Manicardi, G.** (2001). Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. *International Journal of Food Microbiology*, 64(1-2), 193-198.
- Mnato, H., & Suto, T.** (1979). Technique for fractionation of bacteria in rumen microbial ecosystem. III. Attachment of bacteria isolated from bovine rumen to starch granules in vitro and elution of bacteria attached therefrom. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 25(2), 71-93.
- Millette, M., Cornut, G., Dupont, C., Shareck, F., Archambault, D., & Lacroix, M.** (2008). Capacity of human nisin-and pediocin-producing lactic acid bacteria to reduce intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci. *Applied and environmental microbiology*, 74(7), 1997-2003.
- Minter, M. R., Zhang, C., Leone, V., Ringus, D. L., Zhang, X., Oyler-Castrillo, P., ... & Sisodia, S. S.** (2016). Antibiotic-induced perturbations in gut microbial diversity influences neuro-inflammation and amyloidosis in a murine model of Alzheimer's disease. *Scientific reports*, 6(1), 1-12.
- Mokoena, M. P.** (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules*, 22(8), 1255.
- Mokhtar, M. A., Hassanein, K. M., Ahmed, A. S., Gad, G. F., Amin, M. M., & Hassanein, O. F.** (2020). Antagonistic activities of cell-free supernatants of lactobacilli against extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and drug resistance*, 13, 543.

- Moradi, M., Kousheh, S. A., Almasi, H., Alizadeh, A., Guimarães, J. T., Yilmaz, N., & Lotfi, A.** (2020). Postbiotics produced by lactic acid bacteria: The next frontier in food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 3390-3415.
- Mora-Villalobos, J. A., Montero-Zamora, J., Barboza, N., Rojas-Garbanzo, C., Usaga, J., Redondo-Solano, M., ... & Lopez-Gomez, J. P.** (2020). Multi-product lactic acid bacteria fermentations: A review. *Fermentation*, 6(1), 23.
- Morell, P., Hernando, I., Llorca, E., & Fiszman, S.** (2015). Yogurts with an increased protein content and physically modified starch: Rheological, structural, oral digestion and sensory properties related to enhanced satiating capacity. *Food Research International*, 70, 64-73.
- Morgan, X. C., Tickle, T. L., Sokol, H., Gevers, D., Devaney, K. L., Ward, D. V., ... & Huttenhower, C.** (2012). Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome biology*, 13(9), 1-18.
- Mosmann, T.** (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- Muhammad, Z., Ramzan, R., Abdelazez, A., Amjad, A., Afzaal, M., Zhang, S., & Pan, S.** (2019). Assessment of the antimicrobial potentiality and functionality of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from the conventional inner Mongolian fermented cheese against foodborne pathogens. *Pathogens*, 8(2), 71.
- Nagpal, R., Wang, S., Ahmadi, S., Hayes, J., Gagliano, J., Subashchandrabose, S., ... & Yadav, H.** (2018). Human-origin probiotic cocktail increases short-chain fatty acid production via modulation of mice and human gut microbiome. *Scientific reports*, 8(1), 1-15.
- Nami, Y., Abdullah, N., Haghshenas, B., Radiah, D., Rosli, R., & Khosroushahi, A. Y.** (2014). Assessment of probiotic potential and anticancer activity of newly isolated vaginal bacterium *Lactobacillus plantarum* 5BL. *Microbiology and Immunology*, 58(9), 492-502.
- Naseer, K., Ali, S., & Qazi, J.** (2021). ATR-FTIR spectroscopy as the future of diagnostics: a systematic review of the approach using bio-fluids. *Applied Spectroscopy Reviews*, 56(2), 85-97.
- Nataraj, B. H., Ali, S. A., Behare, P. V., & Yadav, H.** (2020). Postbiotics-parabiotics: the new horizons in microbial biotherapy and functional foods. *Microbial cell factories*, 19(1), 1-22.
- Neish, A. S.** (2009). Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*, 136(1), 65-80.

- Nicholson, J. K., & Wilson, I. D.** (2003). Understanding 'global' systems biology: metabolomics and the continuum of metabolism. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(8), 668-676.
- Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., & Pettersson, S.** (2012). Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*, 336(6086), 1262-1267.
- O'Connor, S., Chouinard-Castonguay, S., Gagnon, C., & Rudkowska, I.** (2017). Prebiotics in the management of components of the metabolic syndrome. *Maturitas*, 104, 11-18.
- Oelschlaeger, T. A.** (2010). Mechanisms of probiotic actions—a review. *International journal of medical microbiology*, 300(1), 57-62.
- O'Hara, A. M., & Shanahan, F.** (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*, 7(7), 688-693.
- Onat, B., Tunçer, S., Uluşan, S., Banerjee, S., & Erel-Göktepe, I.** (2019). Biodegradable polymer promotes osteogenic differentiation in immortalized and primary osteoblast-like cells. *Biomedical Materials*, 14(4), 1-36.
- Org, E., Blum, Y., Kasela, S., Mehrabian, M., Kuusisto, J., Kangas, A. J., ... & Lusić, A. J.** (2017). Relationships between gut microbiota, plasma metabolites, and metabolic syndrome traits in the METSIM cohort. *Genome biology*, 18(1), 1-14.
- O'Sullivan, A., Farver, M., & Smilowitz, J. T.** (2015). Article Commentary: The influence of early infant-feeding practices on the intestinal microbiome and body composition in infants. *Nutrition and metabolic insights*, 8, 1-9.
- Ott, S. J., Musfeldt, M., Wenderoth, D. F., Hampe, J., Brant, O., Fölsch, U. R., ... & Schreiber, S.** (2004). Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut*, 53(5), 685-693.
- Ozek Simsek, N., Sara, Y., Onur, R., & Severcan, F.** (2010). Low dose simvastatin induces compositional, structural and dynamic changes in rat skeletal extensor digitorum longus muscle tissue. *Bioscience reports*, 30(1), 41-50.
- Pato, U., Yusuf, Y., Panggabean, I. P., Handayani, N. P., Adawiyah, N., & Kusuma, A. N.** (2019). Influence Of Skim Milk And Sucrose On The Viability Of Lactic Acid Bacteria And Quality Of Probiotic Cocoghurt Produced Using Starters. *Pakistan Journal of Biotechnology*, 16(1), 13-20.
- Pehrson, M. E. S. F., Mancilha, I. M., & Pereira, C.** (2015). Antimicrobial activity of probiotic *Lactobacillus* strains towards gram-negative enteropathogens. *Eur. Inte. J. Sci. Technol*, 4, 136-149.

- Perez, R. H., Zendo, T., & Sonomoto, K.** (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial cell factories*, 13(1), 1-13.
- Perisic, N., Afseth, N. K., Ofstad, R., & Kohler, A.** (2011). Monitoring protein structural changes and hydration in bovine meat tissue due to salt substitutes by Fourier transform infrared (FTIR) microspectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(18), 10052-10061.
- Pozuelo, M., Panda, S., Santiago, A., Mendez, S., Accarino, A., Santos, J., ... & Manichanh, C.** (2015). Reduction of butyrate-and methane-producing microorganisms in patients with Irritable Bowel Syndrome. *Scientific reports*, 5(1), 1-12.
- Quintelas, C., Ferreira, E. C., Lopes, J. A., & Sousa, C.** (2018). An overview of the evolution of infrared spectroscopy applied to bacterial typing. *Biotechnology journal*, 13(1), 1700449.
- Rad, A. H., Aghebati-Maleki, L., Kafil, H. S., Gilani, N., Abbasi, A., & Khani, N.** (2021). Postbiotics, as dynamic biomolecules, and their promising role in promoting food safety. *Biointerface Res Appl Chem*. 11, 14529–14544.
- Ragnoni, E., Catalini, S., Becucci, M., Lapini, A., & Foggi, P.** (2021). Linear and Non-Linear Middle Infrared Spectra of Penicillin G in the CO Stretching Mode Region. *Symmetry*, 13(1), 106.
- Rajwade, J. M., Paknikar, K. M., & Kumbhar, J. V.** (2015). Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(6), 2491-2511.
- Rana, S., Bhawal, S., Kumari, A., Kapila, S., & Kapila, R.** (2020). pH-dependent inhibition of AHL-mediated quorum sensing by cell-free supernatant of lactic acid bacteria in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbial pathogenesis*, 142, 104105.
- Rautava, S., Luoto, R., Salminen, S., & Isolauri, E.** (2012). Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 9(10), 565.
- Rehman, H., Vahjen, W., Kohl-Parisini, A., Ijaz, A., & Zentek, J.** (2009). Influence of fermentable carbohydrates on the intestinal bacteria and enteropathogens in broilers. *World's poultry science journal*, 65(1), 75-90.
- Reiniati, I., Hrymak, A. N., & Margaritis, A.** (2017). Recent developments in the production and applications of bacterial cellulose fibers and nanocrystals. *Critical reviews in biotechnology*, 37(4), 510-524.

- Remesy, C., Levrat, M. A., Gamet, L., & Demigné, C.** (1993). Cecal fermentations in rats fed oligosaccharides (inulin) are modulated by dietary calcium level. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 264(5), G855-G862.
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G. A. D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C.** (2019). What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*, 7(1), 14.
- Rogan, M. P., Taggart, C. C., Greene, C. M., Murphy, P. G., O'Neill, S. J., & McElvaney, N. G.** (2004). Loss of microbicidal activity and increased formation of biofilm due to decreased lactoferrin activity in patients with cystic fibrosis. *The Journal of infectious diseases*, 190(7), 1245-1253.
- Ruiz Rodríguez, L. G., Mohamed, F., Bleckwedel, J., Medina, R., De Vuyst, L., Hebert, E. M., & Mozzi, F.** (2019). Diversity and functional properties of lactic acid bacteria isolated from wild fruits and flowers present in Northern Argentina. *Frontiers in microbiology*, 10, 1091.
- Ryan, B. M., Wolff, R. K., Valeri, N., Khan, M., Robinson, D., Paone, A., ... & Harris, C. C.** (2014). An analysis of genetic factors related to risk of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Cancer epidemiology*, 38(5), 583-590.
- Sampson, T. R., Debelius, J. W., Thron, T., Janssen, S., Shastri, G. G., Ilhan, Z. E., ... & Mazmanian, S. K.** (2016). Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease. *Cell*, 167(6), 1469-1480.
- Sanders, M. E., Goh, Y. J., & Klaenhammer, T. R.** (2019). Probiotics and Prebiotics. *Food Microbiology: Fundamentals And Frontiers*, 831-854.
- Savadogo, A., Ouattara, A. C., Bassole, H. I., & Traore, S. A.** (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria-a minireview. *African journal of biotechnology*, 5(9).
- Schlafer, S., Raarup, M. K., Wejse, P. L., Nyvad, B., Städler, B. M., Sutherland, D. S., ... & Meyer, R. L.** (2012). Osteopontin reduces biofilm formation in a multi-species model of dental biofilm. *PLoS One*. 7, e41534.
- Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M., & Finlay, B. B.** (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*, 90(3), 859-904.
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R.** (2016). Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. *Cell*, 164(3), 337-340.

- Shahidi, F., Roshanak, S., Javadmanesh, A., Yazdi, F. T., Pirkhezranian, Z., & Azghandi, M.** (2020). Evaluation of antimicrobial properties of bovine lactoferrin against foodborne pathogenic microorganisms in planktonic and biofilm forms (in vitro). *Journal of Consumer protection and Food safety*, 15(3), 277-283.
- Sharbafi, R., Moradian, F., & Rafeie, A.** (2016). Evaluation of antimicrobial activity of lactoferrin against *P. Aeruginosa* and *E. coli* growth. 19-23.
- Siedler, S., Balti, R., & Neves, A. R.** (2019). Bioprotective mechanisms of lactic acid bacteria against fungal spoilage of food. *Current opinion in biotechnology*, 56, 138-146.
- Silvi, S., Rumney, C. J., Cresci, A., & Rowland, I. R.** (1999). Resistant starch modifies gut microflora and microbial metabolism in human flora-associated rats inoculated with faeces from Italian and UK donors. *Journal of applied microbiology*, 86(3), 521-530.
- Singh, M., & Byars, J. A.** (2009). Starch-lipid composites in plain set yogurt. *International journal of food science & technology*, 44(1), 106-110.
- Singh, N., Gurav, A., Sivaprakasam, S., Brady, E., Padia, R., Shi, H., ... & Ganapathy, V.** (2014). Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity*, 40(1), 128-139.
- Singh, P. K., Parsek, M. R., Greenberg, E. P., & Welsh, M. J.** (2002). A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*, 417(6888), 552-555.
- Slavin, J.** (2013). Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients*, 5(4), 1417-1435.
- Smaoui, S., Elleuch, L., Bejar, W., Karray-Rebai, I., Ayadi, I., Jaouadi, B., ... & Mellouli, L.** (2010). Inhibition of fungi and gram-negative bacteria by bacteriocin BacTN635 produced by *Lactobacillus plantarum* sp. TN635. *Applied biochemistry and biotechnology*, 162(4), 1132-1146.
- Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly-y, M., ... & Garrett, W. S.** (2013). The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*, 341(6145), 569-573.
- Sobhani, I., Amiot, A., Le Baieur, Y., Levy, M., Auriault, M. L., Van Nhieu, J. T., & Delchier, J. C.** (2013). Microbial dysbiosis and colon carcinogenesis: could colon cancer be considered a bacteria-related disease?. *Therapeutic advances in gastroenterology*, 6(3), 215-229.
- Steliou, K., Boosalis, M. S., & Perrine, S. P.** (2012). Butyrate histone deacetylase inhibitors. *Biores Open Access*, 1, 192-8.

- Strandwitz, P.** (2018). Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain research*, 1693, 128-133.
- Strus, M., Pakosz, K., Gościński, H., Przondo-Mordarska, A., Rozynek, E., Pituch, H., ... & Heczko, P. B.** (2001). Antagonistic activity of Lactobacillus bacteria strains against anaerobic gastrointestinal tract pathogens (*Helicobacter pylori*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*). *Medycyna doświadczalna i mikrobiologia*, 53(2), 133-142.
- Sun, M., Wu, W., Liu, Z., & Cong, Y.** (2017). Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. *Journal of gastroenterology*, 52(1), 1-8.
- Sun, Y., & O'Riordan, M. X.** (2013). Regulation of bacterial pathogenesis by intestinal short-chain fatty acids. *Advances in applied microbiology*, 85, 93-118.
- Supian, N. N. I., Zakaria, J., Amin, K. N. M., Mohamad, S., & Mohamad, S. F. S.** (2021, March). Effect of fermentation period on bacterial cellulose production from oil palm frond (OPF) juice. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 1092, No. 1, p. 012048). IOP Publishing.
- Slominski, A., Zmijewski, M. A., & Pawelek, J.** (2012). L-tyrosine and L-dihydroxyphenylalanine as hormone-like regulators of melanocyte functions. *Pigment cell & melanoma research*, 25(1), 14-27.
- Syaputri, Y., & Iwahashi, H.** (2020). Characteristics of Heterologous Plantaricin from *Lactobacillus plantarum* and its Future in Food Preservation. *Reviews in Agricultural Science*, 8, 124-137.
- Talari, A. C. S., Martinez, M. A. G., Movasaghi, Z., Rehman, S., & Rehman, I. U.** (2017). Advances in Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 52(5), 456-506.
- Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T.** (2005). *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(2-3), 318-326.
- Todorov, S. D., de Paula, O. A., Camargo, A. C., Lopes, D. A., & Nero, L. A.** (2018). Combined effect of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST8SH and vancomycin, propolis or EDTA for controlling biofilm development by *Listeria monocytogenes*. *Revista Argentina de microbiologia*, 50(1), 48-55.
- Todorov, S. D., Nyati, H., Meincken, M., & Dicks, L. M. T.** (2007). Partial characterization of bacteriocin AMA-K, produced by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from naturally fermented milk from Zimbabwe. *Food control*, 18(6), 656-664.

- Tomasello, G., Tralongo, P., Damiani, P., Sinagra, E., Di Trapani, B., Zeenny, M. N., ... & Leone, A.** (2014). Dismicrobism in inflammatory bowel disease and colorectal cancer: changes in response of colocytes. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(48), 18121.
- Tremaroli, V., & Bäckhed, F.** (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, 489(7415), 242-249.
- Tremlett, H., Bauer, K. C., Appel-Cresswell, S., Finlay, B. B., & Waubant, E.** (2017). The gut microbiome in human neurological disease: a review. *Annals of neurology*, 81(3), 369-382.
- Tunçer, S.** (2021). Biopolysaccharides: Properties and Applications. *Polysaccharides: Properties and Applications*, 95-134.
- Tunçer, S., & Karaçam, S.** (2020). Cell-free supernatant of Streptococcus salivarius M18 impairs the pathogenic properties of Pseudomonas aeruginosa and Klebsiella pneumonia. *Archives of Microbiology*, 202(10), 2825-2840.
- Tunçer, S., Solel, E., & Banerjee, S.** (2020). Extensive unfolded protein response stimulation in colon cancer cells enhances VEGF expression and secretion. *Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 7(100. Yıl Özel Sayı), 329-343.
- Ummadi, M. S., & Curic-Bawden, M.** (2008). Use of protein hydrolysates in industrial starter culture fermentations. In *Protein hydrolysates in biotechnology* (pp. 91-114). Springer, Dordrecht.
- Valdes, A. M., Walter, J., Segal, E., & Spector, T. D.** (2018). Role of the gut microbiota in nutrition and health. *Bmj*, 361, 36-44.
- Varhimo, E., Varmanen, P., Fallarero, A., Skogman, M., Pyörälä, S., Iivanainen, A., ... & Savijoki, K.** (2011). Alpha- and β -casein components of host milk induce biofilm formation in the mastitis bacterium Streptococcus uberis. *Veterinary microbiology*, 149(3-4), 381-389.
- Vodnar, D. C., Paucean, A., DULF, F. V., & Socaciu, C.** (2010). HPLC characterization of lactic acid formation and FTIR fingerprint of probiotic bacteria during fermentation processes. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(2), 109-113.
- Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Kobayashi, T., Yaeshima, T., Iwatsuki, K., & Yoshie, H.** (2009). Inhibitory effects of lactoferrin on growth and biofilm formation of Porphyromonas gingivalis and Prevotella intermedia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(8), 3308-3316.

- Wan, L. Y. M., Chen, Z. J., Shah, N. P., & El-Nezami, H.** (2016). Modulation of intestinal epithelial defense responses by probiotic bacteria. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(16), 2628-2641.
- Wang, C., Chuprom, J., Wang, Y., & Fu, L.** (2020). Beneficial bacteria for aquaculture: nutrition, bacteriostasis and immunoregulation. *Journal of Applied Microbiology*, 128(1), 28-40.
- Wang, L. H., Zeng, X. A., Wang, M. S., Brennan, C. S., & Gong, D.** (2018). Modification of membrane properties and fatty acids biosynthesis-related genes in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: Implications for the antibacterial mechanism of naringenin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1860(2), 481-490.
- Wang, T., Cai, G., Qiu, Y., Fei, N., Zhang, M., Pang, X., ... & Zhao, L.** (2012). Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *The ISME journal*, 6(2), 320-329.
- Wang, T., Roest, D. I., Smidt, H., & Zoetendal, E. G.** (2019a). "We are what we eat": How diet impacts the gut microbiota in adulthood. In *How Fermented Foods Feed a Healthy Gut Microbiota* (pp. 259-283). Springer, Cham.
- Wang, X., Wang, B. R., Zhang, X. J., Xu, Z., Ding, Y. Q., & Ju, G.** (2002). Evidences for vagus nerve in maintenance of immune balance and transmission of immune information from gut to brain in STM-infected rats. *World journal of gastroenterology*, 8(3), 540.
- Wang, Y., Chen, J., Song, Y. H., Zhao, R., Xia, L., Chen, Y., ... & Wu, X. T.** (2019b). Effects of the resistant starch on glucose, insulin, insulin resistance, and lipid parameters in overweight or obese adults: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition & diabetes*, 9(1), 1-11.
- Wegh, C. A., Geerlings, S. Y., Knol, J., Roeselers, G., & Belzer, C.** (2019). Postbiotics and their potential applications in early life nutrition and beyond. *International journal of molecular sciences*, 20(19), 4673.
- Weiss, G.** (2013). Intestinal irony: how probiotic bacteria outcompete bad bugs. *Cell host & microbe*, 14(1), 3-4.
- Wen, L. S., Philip, K., & Ajam, N.** (2016). Purification, characterization and mode of action of plantaricin K25 produced by *Lactobacillus plantarum*. *Food Control*, 60, 430-439.
- Westfall, S., Lomis, N., Kahouli, I., Dia, S. Y., Singh, S. P., & Prakash, S.** (2017). Microbiome, probiotics and neurodegenerative diseases: deciphering the gut brain axis. *Cellular and molecular life sciences*, 74(20), 3769-3787.

- Woo, J. Y., Gu, W., Kim, K. A., Jang, S. E., Han, M. J., & Kim, D. H.** (2014). Lactobacillus pentosus var. plantarum C29 ameliorates memory impairment and inflammaging in a D-galactose-induced accelerated aging mouse model. *Anaerobe*, 27, 22-26.
- Wopereis, H., Oozeer, R., Knipping, K., Belzer, C., & Knol, J.** (2014). The first thousand days—intestinal microbiology of early life: establishing a symbiosis. *Pediatric Allergy and Immunology*, 25(5), 428-438.
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y. Y., Keilbaugh, S. A., ... & Lewis, J. D.** (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, 334(6052), 105-108.
- Wu, N., Yang, X., Zhang, R., Li, J., Xiao, X., Hu, Y., ... & Zhu, B.** (2013). Dysbiosis signature of fecal microbiota in colorectal cancer patients. *Microbial ecology*, 66(2), 462-470.
- Yadav, S., Garg, K., Prakash, A., & Rai, A.** (2013). Detection and Biochemical Characterization of Microorganisms in Milk and Cocoa powder samples by FTIR and subsequent production of Bacteriocin from Lactobacillus. *Int. J. Drug Dev. & Res*, 5(1), 310-320.
- Yano, J. M., Yu, K., Donaldson, G. P., Shastri, G. G., Ann, P., Ma, L., ... & Hsiao, E. Y.** (2015). Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell*, 161(2), 264-276.
- Yao, N., Paez, A. V., & White, P. J.** (2009). Structure and function of starch and resistant starch from corn with different doses of mutant amylose-extender and floury-1 alleles. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(5), 2040-2048.
- Yazgan, H., Kuley, E., Güven Gökmen, T., Regenstein, J. M., & Özogul, F.** (2021). The antimicrobial properties and biogenic amine production of lactic acid bacteria isolated from various fermented food products. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(1), e15085.
- Yılmaz, T., & Şimşek, Ö.** (2020). Potential health benefits of ropy exopolysaccharides produced by Lactobacillus plantarum. *Molecules*, 25(14), 3293.
- Yue, P., & Waring, S.** (1998). Resistant starch in food applications. *Cereal Foods World*, 43(9), 690-695.
- Yusuf, M. A., & Hamid, T. H.** (2013). Lactic acid bacteria: bacteriocin producer: a mini review. *IOSR J Pharm*, 3(4), 44-50.
- Zackular, J. P., Baxter, N. T., Iverson, K. D., Sadler, W. D., Petrosino, J. F., Chen, G. Y., & Schloss, P. D.** (2013). The gut microbiome modulates colon tumorigenesis. *MBio*, 4(6), e00692.

- Zamani, H., Rahbar, S., Garakoui, S. R., Afsah Sahebi, A., & Jafari, H.** (2017). Antibiofilm potential of *Lactobacillus plantarum* spp. cell free supernatant (CFS) against multidrug resistant bacterial pathogens. *Pharmaceutical and Biomedical Research*, 3(2), 39-44.
- Zeng, H., Huang, C., Lin, S., Zheng, M., Chen, C., Zheng, B., & Zhang, Y.** (2017). Lotus seed resistant starch regulates gut microbiota and increases short-chain fatty acids production and mineral absorption in mice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(42), 9217-9225.
- Zeng, H., Umar, S., Rust, B., Lazarova, D., & Bordonaro, M.** (2019). Secondary bile acids and short chain fatty acids in the colon: a focus on colonic microbiome, cell proliferation, inflammation, and cancer. *International journal of molecular sciences*, 20(5), 1214.
- Zhang, Y. U., Li, S., Zhang, C., Luo, Y., Zhang, H., & Yang, Z.** (2011). Growth and exopolysaccharide production by *Lactobacillus fermentum* F6 in skim milk. *African Journal of Biotechnology*, 10(11), 2080-2091.
- Zheng, P., Zeng, B., Zhou, C., Liu, M., Fang, Z., Xu, X., ... & Xie, P.** (2016). Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host's metabolism. *Molecular psychiatry*, 21(6), 786-796.
- Zhu, B., Xia, X., Xia, N., Zhang, S., & Guo, X.** (2014). Modification of fatty acids in membranes of bacteria: Implication for an adaptive mechanism to the toxicity of carbon nanotubes. *Environmental science & technology*, 48(7), 4086-4095.
- Zhu, X., Zhao, Y., Sun, Y., & Gu, Q.** (2014). Purification and characterisation of plantaricin ZJ008, a novel bacteriocin against *Staphylococcus* spp. from *Lactobacillus plantarum* ZJ008. *Food chemistry*, 165, 216-223.
- Zhuang, L., Chen, H., Zhang, S., Zhuang, J., Li, Q., & Feng, Z.** (2019). Intestinal microbiota in early life and its implications on childhood health. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 17(1), 13-25.
- Zuo, J. Y., Hemar, Y., Hewitt, S., & Saunders, A.** (2008). Effect of the extent of pasting on the dynamic rheological properties of acidified skim milk gels containing normal rice starch. *Food Hydrocolloids*, 22(8), 1567-1573.