ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PROBİYOTİK ÖZELLİK GÖSTEREN BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ TARAFINDAN ÜRETİLEN EKZOPOLİSAKKARİTLERİN İMMUNOMODÜLATÖR ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Kübra ALMACIOĞLU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2013

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Kübra ALMACIOĞLU tarafından hazırlanan ''**Probiyotik özellik gösteren bazı laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritlerin immünomodülatör etkilerinin belirlenmesi**'' adlı tez çalışması 29 Temmuz 2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

Jüri Üyeleri

Başkan: Doç. Dr. Mayda GÜRSEL
ODTÜ Biyolojik Bilimler Bölümü Biyoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Emine Sümer ARAS
Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU
Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof.Dr.İbrahim DEMİR

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PROBİYOTİK ÖZELLİK GÖSTEREN BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ TARAFINDAN ÜRETİLEN EKZOPOLİSAKKARİTLERİN İMMUNOMODÜLATÖR ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Kübra ALMACIOĞLU

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

Eş Danışman: Doç Dr. İhsan GÜRSEL

Çalışmanın ilk aşamasında, laktik asit bakteri grubuna ait probiyotik özellik sergileyen insan kaynaklı 3 suşun (*Pediococcus pentosaceus* OZF, *Enterococcus faecium* OZ1 ve *Lactobacillus brevis* OZ1) EPS üretim miktarları farklı yöntemler kullanılarak belirlenmiştir. Yöntem 2'nin kullanımı ile en yüksek EPS üretimine (1533mg/L) sahip olan *P. pentosaceus* OZF suşu çalışmanın diğer aşamalarında kullanılmak üzere seçilmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında *P. pentosaceus* OZF suşu tarafından üretilen ve serbest halde bulunan (eps-R) EPS ekstraksiyonuna ilaveten hücre yüzeyine bağlı (eps-B) olarak bulunan EPS ekstraksiyonu da gerçekleştirilmiş (600mg/L) ve bu iki bakteriyel polimerin immünmodülatör etkileri araştırılmıştır. *in vitro* denemelerde OZF suşu tarafından üretilen eps-R'nin kendi başına bir etkisi olmadığı, eps-B'nin ise IL-6 ve IL-12 üretimi açısından zayıf bir uyaran olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan iki EPS'nin de güçlü immomodülatör etkisiye sahip olmamasından dolayı EPS/CpC ODN komplekslerinin immunomodülatör etkinliklerine bakılmış ve CpG ODN'ler ile oluşturulan EPS komplekslerinin *in vitro* koşularda tespit edilen etkilerinin doza ve EPS tipine bağlı olarak değiştiği tespit edilmiştir. D ODN kompleksleri ile gerçekleştirilen sitimülasyon çalışmasında, her iki EPS'nin de IL-6 üretiminde belirgin bir etkisinin olmadığı ($p>0.05$), IL-6 salınımını ve yaygınlaşmasını sağladığı bilinen K ODN'nin ise yüksek dozda eps-B, düşük dozda ise eps-R tarafından etkisinin azaltıldığı, IL-12 üretiminde ise komplekslerin kullanılan düşük dozlarının baskılayıcı ya da arttırıcı bir etkisinin olmadığı, yüksek dozlarda ise CpG ODN'ler tarafından üretilen IL-12 seviyelerinin baskılandığı tespit edilmiştir. K ODN için *in vitro* koşullarda tespit edilen EPS'nin baskılayıcı özelliği *in vivo* koşularda elde edilememiştir. *in vivo* çalışmaların sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde belirli bir titrasyonda (1/7168) sadece D ODN eps-R kompleksinin IgG1 seviyesini bir miktar düşürdüğü ancak elde edilen sonucun uzun vadede etkinliğini kaybettiği belirlenmiştir. Çalışmadan elde edilen veriler literatüre katkı sağlamakla beraber OZF suşu tarafından üretilen EPS'lerin immünoterapide anlamlı sayılabilecek bir uygulama potansiyelline sahip olmadığını göstermiştir. Ayrıca farklı biyopolimerler ile kompleks oluşturulan CpG-DN'lerin bu çalışmada bakteriyel EPS ile kompleks oluşturması yeni ve farklı bir bakış açısı da sunmaktadır.

Temmuz 2013, 95 sayfa

Anahtar Kelimeler: Laktik asit bakterileri, ekzopolisakkarit, CpG oligodeoksinükleotit, immunomodülasyon

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF IMMUNOMODULATORY POTENTIALS OF EXOPOLYSACCHARIDES PRODUCED BY SOME PROBIOTIC LACTIC ACID BACTERIA

Kübra ALMACIOĞLU

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

Co-Suprervisior: Assoc. Prof. Dr. İhsan GÜRSEL

In the first step of the study, EPS production of three probiotic and human originated lactic acid bacteria strains (*Pediococcus pentosaceus* OZF, *Enterococcus faecium* OZ1 and *Lactobacillus brevis* OZ1) was determined using various methods. *Pediococcus pentosaceus* OZF was choosen for further studies with its maximum EPS production capacity (1533mg/L) as a result of the method 2. In the second step of the study, addition to release EPS (eps-R) produced by *P. pentosaceus* OZF, bonded EPS (eps-B; 600mg/L) was also extracted and immunomodulatory effects of these two bacterial polymers was investigated. It was determined by *in vitro* experiments that, eps-R produced by *P. pentosaceus* OZF had no effect with its ownself while eps-B was found as a weak stimulant. Due to the nonimmunomodulatory effect of both EPS, the immunomodulatory effect of EPS/CpC ODN complexes was also tested in this study and it was determined that the effect of EPS/CpC ODN complexes under *in vitro* conditions was found depending on the type of EPS and their doses. Each EPS, conducted with D ODN complexes were not found effective in stimulating IL-6 production significantly ($p>0.05$). The effect of K ODN, known as responsible for releasing and diffusion of IL-6, was reduced under the high dose of eps-B as well as low dose of eps-R. From the perspective of IL-12 production, any suppressing or enhancing effect of low dose of EPS was determined. In high doses of application, IL-12 production was suppressed. This effect was not observed under *in vivo* conditions. The overall resuts of *in vivo* experiments showed that, in an evident titration (1/7168), only D ODN eps-R complexes reduced IgG1 levels, slightly. However, these effectiveness has been lost in a long term period. The data obtained from this study were contributed to the literature. Nevertheless, EPSs produced by OZF strain have no potential in immunotherapy. This study was also provided a new and different perspective from the point of bacterial EPS-CpG-ODNs complexes, which was formed by using different biopolymers, before.

July 2013, 95 pages

Key Words: Lactic acid bacteria, exopolysaccharide, CpG oligodeoxynucleotides immunomodulation

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgisinden faydalandığım, yanında çalışmaktan mutluluk duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlandığım değerli danışman hocam **Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU'na**

Beni ekibine kabul ederek, araştırmamın tamamlanması için her türlü olanağı sağlayan ve laboratuvar imkanlarını sonuna kadar kullanmama izin veren, yoğun çalışma temposunda bile her zaman vakit ayırabilen ve hiçbir sorumu cevapsız bırakmayan, bilgisine hayran olduğum, bilgi ve deneyimleri ile her zaman yol göstererek bana çok şey kazandıran, değerli danışman hocam **Doç. Dr. İhsan GÜRSEL'e**

Tez savunmasında değerli tavsiye ve yönlendirmeleri ile tezime katkıda bulunan sayın hocalarım **Prof. Dr. Sümer ARAS** ve **Doç. Dr. Mayda GÜRSEL'e**

Bir aile olarak çalışmanın ve ekip olmanın ne demek olduğunu öğreten, bilgisine ve sabrına her zaman hayran kaldığım, tezimi tamalayabilmem için elinden gelen, gelmeyen bütün fırsatları sağlayan, kendinden önce her zaman bizi düşünen, hakkını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim, varlığından güç duyduğum canım hocam **Dr. Fadime KIRAN'a** ayrıca Mikrobiyal Genetik Laboratuvar'ı üyelerinden **Ar. Gör. Harun ÖNLÜ'ye**

Mikrobiyal Genetik Laboratuvar'ında bulunduğum süre boyunca birçok güzel ve eğlenceli anıyı birlikte paylaştığımız, birbirine destek olmanın ne kadar önemli olduğunu öğrendiğim, bazı zamanlarda okulu çekilir kılan, yardımlarını ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim, canım arkadaşlarım **Mohamed MOKRANİ, Zhanatgul SAKYP, Hande MADEN, Erol KARATAŞ ve Hande ORAL'a**

Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü **Biotherapeutic ODN** grup elemanlarından çalışmam sırasında çok şey öğrendiğim ve bana her zaman yardımcı olan **Fuat Cem YAĞCI'ya**, yol göstericiliği ile bana yardım eden, çalışmaktan zevk aldığım **Dr. Gizem TİNÇER'e**, tüm sorularıma sabırla cevap veren ve bana deneylerimi yaparken yardımlarıyla hep destek olan **Banu BAYYURT'a**, aynı zamanda çalışmaktan keyif aldığım **Tamer, Gözde, Mehmet, İhsan, Arda, Defne ve Begüm'e**

Son olarak; sonsuz bir sabırla hiç bir konuda desteklerini esirgemeyen, her zaman arkamda duran varlıklarıyla güç bulduğum **sevgili aileme…**

SONSUZ TEŞEKKÜRLER…

Kübra ALMACIOĞLU

Ankara, Temmuz 2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**

ABSTRACT ..... **ii**

TEŞEKKÜR ..... **iii**

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ ..... **v**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vii**

ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **vii**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ÖZETLERİ **3**

2.1 Laktik Asit Bakterileri **3**

2.1.1 Laktik asit bakterilerinin genel özellikleri **3**

2.1.2 Laktik asit bakterilerinin önemi **4**

2.2 Bakteriyel Polisakkaritler **4**

2.3 Ekzopolisakkaritler **5**

2.4 Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Ekzopolisakkaritler **6**

2.4.1 Homopolisakkaritler **7**

2.4.2 Heteropolisakkaritler **9**

2.5 Ekzopolisakkarit Üretimi **11**

2.5.1 Laktik asit bakterilerinin ekzopolisakkarit üretimini etkileyen faktörler **11**

2.5.2. Ekzopolisakkaritlerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması **12**

2.6 Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Ekzopolisakkaritlerin Kullanım Alanları ve Fonksiyonları **14**

2.6.1 Ekzopolisakkaritlerin gıdalarda kullanımı **14**

2.6.2 Ekzopolisakkaritlerin sağlık alanında kullanımı **14**

2.6.2.1 Ekzopolisakkaritlerin sindirim sistemi üzerine etkileri **14**

2.6.2.2 Ekzopolisakkaritlerin antitümör etkisi 15

2.6.2.3 Ekzopolisakkaritlerin kolesterol metabolizmasına etkileri 16

2.6.2.4 Ekzopolisakkaritlerin diyabet üzerine etkileri 16

2.6.2.5 Ekzopolisakkaritlerin probiyotiklere kazandırdığı olumlu etkiler 16

2.6.2.6 Ekzopolisakkaritlerin immünomodülatör etkileri 17

2.7 İmmün Sistem 18

2.7.1 Doğal bağışıklık 21

2.7.2 Patojen kalıplarını tanıyan reseptörler (PRRs) 22

2.7.3 Toll benzeri reseptörlerin yapısı 23

2.7.3.1 Toll benzeri reseptör ailesi üyeleri 24

2.7.3.1.1 Hücre dışında bulunan Toll benzeri reseptörler 24

2.7.3.1.2 Hücre içinde bulunan Toll benzeri reseptörler 25

2.7.3.2 Toll benzeri reseptörlerin ligandları (baglayıcıları) 26

2.7.3.3 Toll benzeri reseptör sinyal yolu 27

2.7.3.4 Toll bezeri reseptörlerin immün yanıta etkileri 27

2.7.4 TLR Ligandlarının Terapötik Potansiyelleri 28

2.7.4.1 CpG ODNs 28

2.7.4.1.1 A (D) tipi CpG ODN'ler 31

2.7.4.1.2 B (K) tipi CpD ODN'ler 32

2.7.4.1.3 C tipi CpD ODN'ler 32

3. MATERYAL VE YÖNTEM 33

3.1 Materyal 33

3.1.1 Bakteri kültürleri ve gelişme koşulları 33

3.1.2 Bakteri kültürlerinin saklanması 33

3.1.3 Çözelti ve malzemelerin sterilizasyonu 33

3.1.4 ELİZA çalışmalarında kullanılan reaktifler 34

3.1.5 Hücre kültür ortamı bileşenleri 34

3.1.6 Çalışmada kullanılan TLR ligandları ve ODN'ler 35

3.2 Yöntem 35

3.2.1 Bakterileri stok kültürlerinin aktifleştirilmesi 35

3.2.2 Ekzopolisakkarit ekstraksiyonu 35

3.2.3 Ekzopolisakkarit miktarının kantitatif tayini 36

3.2.4 Glukoz standartının hazırlanması 37

3.2.5 Maksimum ekzopolisakkarit üretiminde etkili parametrelerin belirlenmesi 37

3.2.5.1 Farklı yöntem ve kimyasalların ekzopolisakkarit ekstraksiyonu üzerine etkisi 37

3.2.5.2 Farklı karbon kaynaklarının ekzopolisakkarit üretimi üzerine etkisi 39

3.2.5.3 Farklı inkübasyon sıcaklığının ekzopolisakkarit üretimi üzerine etkisi 39

3.2.5.4 Farklı inkübasyon sürelerinin ekzopolisakkarit üretimi üzerine etkisi 39

3.2.6 *Pediococcus pentosaceus* OZF suşu tarafından üretilen ekzopolisakkaritin immunomodülatör etkisinin *in vitro* koşullarda belirlenmesi 40

3.2.6.1 Sitimülasyon çalışmalarında kullanılan komplekslerin hazırlanması 40

3.2.6.2 Hücre kültürü çalışmaları 40

3.2.6.2.1 Dalak hücre süspansiyonunun hazırlanması 40

3.2.6.2.2 Hücre sayımı 41

3.2.6.3 Hücrelerin sitimülasyonu 42

3.2.6.4 ELİZA (Sitokin) 42

3.2.7 *Pediococcus pentosaceus* OZF suşu tarafından üretilen ekzopolisakkaritin immunomodülatör etkisinin *in vivo* koşullarda belirlenmesi 44

3.2.7.1 Hayvan bakımı 44

3.2.7.2 CpG-ODN/EPS ve OVA antijeni ile gerçekleştirilen immünizasyon protokolü 44

3.2.7.3 ELİZA 46

3.2.7.3.1 ELİZA (Sitokin) 46

3.2.7.3.2 IgG anti-OVA ELİZA 46

3.2.8 İstatiksel analizler 46

4. BULGULAR 47

4.1 Ekzopolisakkarit Ekstraksiyonu İçin Uygun Yöntemin Belirlenmesi 47

4.2 Maksimum Ekzopolisakkarit Üretiminde Etkili Parametrelerin Belirlenmesi 50

4.2.2 Farklı karbon kaynaklarının ekzopolisakkarit üretimi üzerine etkisi 50

4.2.3 Farklı inkübasyon sıcaklığının Ekzopolisakkarit Üretimi Üzerine Etkisi 50

4.2.4 Farklı inkübasyon zamanlarının ekzopolisakkarit üretimi üzerine etkisi 51

4.3 *Pediococcus pentosaceus* OZF Suşu Tarafından Üretilen Ekzopolisakkaritin İmmunomodülatör Etkisinin *in vitro* Koşullarda Belirlenmesi 52

4.4 *Pediococcus pentosaceus* OZF Suşu Tarafından Üretilen Ekzopolisakkaritin 56

İmmunomodülatör Etkisinin *in vivo* Koşullarda Belirlenmesi 56

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 63

KAYNAKLAR 70

EKLER 88

EK 1 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasal Bileşenleri 89

EK 2 Çalışmada Kullanılan Tampon ve Çözeltilerin Bileşenleri 91

EK 3 Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası 93

ÖZGEÇMİŞ 94

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

˚C	Santigrat Derece
APC	Antijnen Sunan Hücre
BCR	B Hücre Reseptörü
bp	Baz Çifti
BSA	Bovine Serum Albumin
CDM	Kimyasal olarak tanımlanmış besiyeri ortamı
CpG	Metillenmemiş sitozin-fosfat-guanin motifleri
CPS	Hücre Yüzeyine Bağlanmış Kapsüler polisakkaritler
CR	Kompleman Reseptörü
Da	Dalton
DC	Dendtitik hücre
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ELİZA	Enzime bağlı immünosorbent assay
EPS	Ekzopolisakkarit
FACS	Floresans ile hücre ayırıcısı
FBS	Fetal Bovin Serumu
FDP	Fruktozdi Fosfat
FOS	Frukto Oligosakkaritler
G	Gram
GOS	Galakto Oligosakkaritler
HePS	Heteropolisakkarit
HoPS	Homopolisakkaritler
IFN	İnterferon
Ig	İmmünoglobülin
IL	İnterlökin
LAB	Laktik Asit Bakterileri
LPS	Lipopolisakkarit
MEOR	Mikrobiyal Petrol Üretimi
Mg	Miligram

MHC	Büyük doku uyuşum kompleksi
MIP	Makrofaj İnflamatuar Protein
MRS	Man Rogosa Sharpe Media
MS	Kütle Spektrometresi
MSR	Makrofaj toplayıcı reseptör
MyD-88	Myeloid farklılaşmasında birincil yanıt geni
NaOH	Sodyum Hidroksit
NDO	Sindirilemeyen Oligosakkaritler
NK	Doğal Öldürücü Hücre
NOD	Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon bölgesi
ODN	Oligodeoksinükletit
PAMP	Patojenle ilişkili moleküler kalıplar
PBMC	Periferik mononükleer kan hücreleri
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PO	Fosfodiester omurga
PRR	Patojen kalıplarını Tanıma Reseptörleri
RNA	Ribonükleik asit
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SA-AKP	Streptavidin Alkalin Fosfataz
SCFA	Kısa Zincirli Yağ Asitlerini
SDM	Semi Defined Medium
TCR	T Hücre Reseptör
TH	Yardımcı T Hücreleri
Th1	Hücresel Bağışılık
Th2	Doğal Bağışıklık
TIRAP	Toll/IL1 Reseptörü İle İlişkili Bir Proteinler
TLR	Toll benzeri reseptörler
TNF	Tümör Nekrosis Faktör
VLDL	Düşük Dansiteli Lipoproteinler

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Dallanmamış ve dallanmış formdaki homopolisakkaritler 7
Şekil 2.2 Dallanmamış ve dallanmış formdaki heteropolisakkaritler 9
Şekil 2.3 Mikrobiyal EPS'lerin ekstraksiyonu, saflaştırılması ve yapısal 13
karakterizasyonunu içeren temel adımlar..... 13
Şekil 2.4 Ekzopolisakkarit üreten laktik asit bakterileinin insan sağlığı ile ilişkisi..... 15
Şekil 2.5 Doğal ve edinsel bağışıklığın temel mekanizmaları 19
Şekil 2.6 CpG ODN'lerin bağışıklık sistemi üzerine etkisi 29
Şekil 2.7 CpG ODN'lerin terapötik potansiyelleri..... 30
Şekil 2.8 CpG ODN tipleri..... 31
Şekil 3.1. Thoma lamının genel görüntüsü 41
Şekil 3.2. Ovalbumine karşı *in vivo* aşılama için kullanılan immünizasyon planı 45
Şekil 4.1 Ekzopolisakkarit miktarını belirlemek için hazırlanan glukoz standart eğrisi47
Şekil 4.2 Farklı yöntemlerin kullanımı neticesinde elde edilen ekzopolisakkaritlerin miktarlarının karşılaştırılması (mg/L) 49
Şekil 4.3 EPS/D ODN (3, 1, 0.3, 0.1 μM) kompleksleri ile 24 saat sitimülasyon neticesinde fare dalak hücrelerinde tespit edilen IL-12 üretimi (OD)..... 53
Şekil 4.4 EPS/K ODN (1, 0.3, 0.1, 0.03 μM) kompleksleri ile 24 saat sitimülasyon neticesinde fare dalak hücrelerinde tespit edilen IL-12 üretimi (OD)..... 54
Şekil 4.5 EPS/D ODN (1, 0.3, 0.1, 0.03 μM) kompleksleri ile 24 saat sitimülasyon neticesinde fare dalak hücrelerinde tespit edilen IL-6 üretimi (OD)..... 55
Şekil 4.6 EPS/K ODN (1, 0.3, 0.1, 0.03 μM) kompleksleri ile 24 saat sitimülasyon neticesinde fare dalak hücrelerinde tespit edilen IL-6 üretimi (OD)..... 55
Şekil 4.7 2. kanatmada elde edilen serum örneklerindeki toplam IgG miktarları 57
Şekil 4.8 2. kanatmada elde edilen serum örneklerindeki toplam IgG1 miktarları 58
Şekil 4.9 3. kanatmada elde edilen serum örneklerindeki toplam IgG miktarları 59
Şekil 4.10 3. kanatmada elde edilen serum örneklerindeki toplam IgG1 miktarları 60
Şekil 4.11 2. enjeksiyonu takiben 2. ve 4. haftada gerçekleştirilen kanatma sonucund 62
gruplara göre tespit edilen toplam IgG ve IgG1seviyeleri 62

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Bakteriyel ekzopolisakkaritlerin başlıca görevleri.....6
Çizelge 2.2 Laktik asit bakterileri suşları tarafından üretilen bazı homopolisakkaritler ..8
Çizelge 2.3 Laktik asit bakterileri suşları tarafından üretilen heteropolisakkatirler 10
Çizelge 2.4 Doğal ve edinsel bağışıklığın özgünlüğü.....20
Çizelge 2.5 Sitokinlerin etkileri ve hedef hücreleri 22
Çizelge 2.6 TLR'ler, bağlayıcıları ve yerleri 26
Çizelge 3.1 ELİZA çalışmalarında kullanılan antikor ve reaktifler.....34
Çizelge 4.1 Farklı karbon kaynaklarında ekzopolsaikkarit üretim miktarları.....50
Çizelge 4.2 Farklı inkübasyon sıcaklıklarıda ekzopolisakkarit üretim miktarları 51
Çizelge 4.3 Farklı inkübasyon sürelerinde ekzopolisakkarit üretim miktarları 52

1. GİRİŞ

Probiyotikler sağlık üzerinde olumlu etkiler sergileyen mikroorganizmaları temsil etmektedirler. Son yıllarda yapılan araştırmalar sağlıklı bir yaşam sürdürmek ve vücut direncini arttırmak amacıyla probiyotik ürün tüketimini önermektedir. Tüketiciler ise probiyotikleri genel sağlık koşullarını desteklemek amacıyla kullanmaktadırlar. Özellikle immün reaksiyonlarda önemli rol oynayan yardımcı T (T_h: T helper) hücrelerini teşvik ederek birçok olumlu etki sergileyen probiyotiklerin immünomodülatör etkileri immün hücreler ve bakteri hücrelerinin interaksiyonundan ya da peptidoglikan (PGN), teikoik asit ve ekzopolisakkarit (EPS) gibi çeşitli mikrobiyal bileşenlerden kaynaklanabilmektedir. Bu grup içerisinde yer alan EPS'ler probiyotiklerin sergiledikleri sağlık üzerine olumlu etkilere katkıda bulunan doğal mikrobiyal bileşenler olup bağışıklık düzenleyici etkilerinden dolayı "biyolojik yanıt değiştiriciler" olarak tanımlanmaktadırlar. Çeşitli probiyotik suşların değişken kompozisyonlarda ve işlevsellikte farklı EPS üretim kapasitelerine sahip oldukları bilinmektedir. Bu özellik suşların probiyotik olarak endüstriyel uygulama alanlarını genişletmekte, bu bağlamda endüstriyel öneme sahip yeni mikrobiyal EPS'lerin keşfi ve geliştirilmesi ise oldukça önem kazanmaktadır.

Probiyotik bakterilerin EPS üretimini içeren çalışmalar son yıllarda artan bir hızla gelişme kaydetmektedir. Yayınlanan son araştırmalarda, çeşitli laktik asit bakteri (LAB) suşları tarafından üretilen EPS'lerin ve bunların türevleri olan oligosakkaritlerin başta gıda, ilaç ve tıp sektörü olmak üzere birçok alanda büyük potansiyele sahip oldukları belirtilmiştir. Bu çalışmada, daha önceki çalışmalarımız neticesinde insan mikrobiyotasından izole edilen 3 farklı LAB suşuna ait EPS'lerin immunomodülatör etkilerinin belirlenmesi ve endüstriyel anlamda kullanım potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışanın birinci aşamasında, uygun gelişim koşullarının EPS üretimi üzerine etkisi belirlenmiş olup ikinci aşamada immunomodülatör etki *in vitro* ve *in vivo* koşullarda değerlendirilmiştir. Yarı-saf olarak elde edilmiş olan EPS, CpG (sitozin-fosfat-guanozin) oligodeoksinükleotit (ODN) motifleri ile birlikte kullanılmış ve immunomodülatör etki ELİZA kullanılarak tespit edilmiştir. Metillenmemiş CpG motifleri içeren bakteri orijinli ya da sentetik olarak üretilebilen CpG ODN'ler klinik ve

klinik öncesi çalışmalarda aşı adjuvanı, anti-allerjen, anti-kanser ve profilaktik amaçlarla kullanılmaktadırlar. Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar bakteriyel DNA'da yer alan bu özel motiflerin bağışıklık sistemi hücrelerini uyarabildiğini ya da etkinliklerini değiştirebildiğini ortaya koymaktadır. Bu çalışmada bakteri kaynaklı EPS'nin bu etkinlik üzerine anlamlı bir etkisinin olup olmadığı araştırmak amacıyla farklı bir strateji planlanmış olup literatüre katkı sağlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Laktik Asit Bakterileri

2.1.1 Laktik asit bakterilerinin genel özellikleri

İlk kez 19. yüzyıl sonlarında süt ve süt ürünlerinde fermantasyona yol açan bakteriler; laktik asit bakterileri (LAB) olarak isimlendirilmiş ve daha sonraki yıllarda Lactobacillaceae familyası içinde sınıflandırılmışlardır. Laktik asit bakterileri morfolojik açıdan değişken özellik göstermekle birlikte Gram-pozitif, spor oluşturmayan, katalaz negatif ve fakültatif anaerobik bakterilerdir. Gram-pozitif bakteriler içerisinde en düşük düzeyde guanin-sitozin (G+C) oranına sahiptirler (Ludwing vd. 1993). *Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus* ve *Streptococcus* başta olmak üzere farklı cinslere ait bakteri suşlarını içermektedirler. Daha az bilinen cinsleri arasında ise *Aerococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Oenococcus, Teragenococcus, Vagococcus* ve *Weisella* yer almaktadır (Patel vd. 2012). Bu gruba ait üyerler bazı istisnalar hariç hareketsizdirler. *Pediococcus* cinsi dışında diğer tüm cinsler tek düzlemde bölünmektedirler (Sharpe vd. 1966). Laktik asit bakterileri doğal olarak özellikle süt ve süt ürünlerinde, fermente gıdalarda, taze veya çürümüş bitkilerde ve insan ve hayvanların bağırsak mukozasında bulunmaktadırlar.

Laktik asit bakterileri, fermentasyon esnasında glukozun parçalanması sonucu oluşan ürünlerin miktarına ve cinsine göre iki ana gruba ayrılmaktadır: Homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakterileri. Homofermentatif laktik asit bakterileri; fermentasyon sonucunda sadece laktik asit oluştururken heterofermentatif laktik asit bakterileri; laktik asitin yanında yüksek oranda etanol, asetik asit, gliserol, mannitol ve fruktoz da oluşturabilmektedir. Fermentasyon sonucunda oluşan bu farklılık, glukozun katabolizma sırasında kullandığı yolun değisik olmasından kaynaklanmaktadır. Homofermentatif laktik asit bakterilerine *Pediococcus, Lactococcus, Lactobacillus* ve *Enterococcus* cinsleri örnek verilebilir. Heterofermentatif laktik asit bakterilerine ise en iyi örenek *Leuconostoc* cinsleridir (Drinan vd. 1976).

2.1.2 Laktik asit bakterilerinin önemi

Uzun yıllardan beri çesitli fermente gıdaların üretiminde LAB suşlarının temel rol oynadığı bilinmektedir. Eşsiz laktik asit fermantasyon kapasiteleri, bu gruba dahil bakterilerin gıdaların raf ömrünü uzatmak, tat ve besin değerini arttırmak ve tekstür yapısı değiştirerek iştah açıcı bir lezzet kazandırmak amacı ile starter olarak kullanımlarını değerli kılmaktadır. Bununla beraber çeşitli LAB (*Lactobacillus, Pediococcus* vb.) suşları tarafından gerçekleştirilen laktat metabolizmasının özellikle yağ oranı düşük ürünlerde lezzet, doku, görünüm ve işlevsellik üzerinde olumlu etkileri bulunmaktadır (Banks 2004). Bu gruba dahil bazı suşların ise organik asitler dışında diğer mikroorganizmalara karşı antagonistik etki gösteren hidrojen peroksit, serbest yağ asitleri, amonyak, diasetil ve bakteriyosin gibi inhibitör maddeler ürettiği ve raf ömrünü uzatmak amacıyla tercih edildikleri belirtilmiştir (Daeschel 1989; Vandenbergh 1993). Gıdalarda bazı patojenlerin gelişimini inhibe edebilme özellikleri ise bu gruba dahil olan bakterilerin insan sağlığı açısından önemine dikkat çekmektedir (Schleifer vd. 1995).

Laktik asit bakterilerinin; fermente besinlerin üretiminde starter kültür olarak kullanılmalarının yanı sıra, probiyotik açıdan değerlendirilmeleri de bu gruba ait olan bakterileri endüstriyel olarak oldukça önemli kılmaktadır. Probiyotik terimi genellikle; fermente süt ürünleri ya da diyet katkısı olarak alınabilen, intestinal sistemde biyolojik aktivitelerini ve canlılıklarını sürdürerek yaşama kabiliyetleriyle tanımlanan *Lactobacillus, Bifidobacterium* ve *Enterococcus* gibi cinslere dahil olan seçilmiş LAB suşlarını ifade etmek için kullanılmaktadır (Rafter 2002). Gerçekleştirilen çalışmalar, çeşitli LAB suşlarının yararlı mikrobik bağırsak florasının gelişimini düzenlediklerini, ishal, alerji başta olmak üzere birçok hastalığa karşı kullanılabildiklerini, bağışıklık sisteminin uyarılmasında oldukça etkili olduklarını göstermektedir (Majamaa vd. 1995).

2.2 Bakteriyel Polisakkaritler

Farklı bakteri grupları tarafından oldukça karmaşık yapıda ve farklılıkta çeşitli polisakkaritler sentezlenmektedir. Bakteriler tarafından üretilen bu polisakkaritler

sitoplazmada depolanarak yerleşmiş olabileceği gibi, Gram-negatif veya Gram-pozitif baklerilerin hücre duvarı komponentleri olarak da bulunabilmektedirler. Bazı bakteri türleri uygun fermantasyon koşulları altında sert hücre duvarı yapıları harici, polisakkarit yapısında doğal (Glazer ve Nikoido 2007) ve yüksek molekül ağırlığına sahip (Sutherland 1977) mukoid maddelerde salgılamaktadırlar. Bu materyal hücre yüzeyine bağlanmış formda (Sutherland 1985) ya da hücreden tamamen ayrılmış halde bulunabilmektedir (Sutherland vd. 1972). Ekzopolisakkaritleride (EPS) içeren bu bakteriyel bileşenler doğal ve biyo-uyumlu olup toksik değillerdir. Özellikle tekstil, deterjan, kozmetik, farmakoloji, gıda, mikrobiyal petrol üretimi (MEOR), atıksu arıtma, mayalandırma gibi birçok sanayi sektörlerinde geniş uygulama alanına sahiptirler (Iyer vd. 2006; Martinez-Canovasark vd. 2004). Bu mikrobiyal kökenli polimerler mevcut küresel polimer pazarında sadece küçük bir pay oluşturmakta, ancak bu oran ve uygulama alanları giderek artış göstermektedir.

2.3 Ekzopolisakkaritler

Mikrobiyal hücrelerin yüzeyi karbonhidrat bulunduran moleküller açısından zengin bir kaynaktır (Alsteens vd. 2008). Ekzopolisakkaritler ilk kez Sutherland ve arkadaşları tarafından (1972) yüksek molekül ağırlıktaki karbonhidrat molekülleri olarak tanımlanmış olup günümüzde bakteri ve mikroalgler tarafından üretilen uzun zincirli polisakkaritler olarak nitelendirilmektedirler. Şeker ve şeker türevlerinin dallanmış tekrar birimlerinden oluşmaktadırlar. Bu şeker birimleri değişen oranlarda glukoz, galaktoz, mannoz, N-asetilglukozamin, N-asetilgalaktosamin ve ramnoz içermektedir. Ekzopolisakkaritler sıkı bir şekilde hücre yüzeyine bağlı değildirler, büyüme sırasında çevrelerine gevşek bir tabaka halinde salgılanmaktadırlar. Bu durum onları yapısal olarak benzer fakat sürekli hücre yüzeyine bağlı olan kapsüler polisakkaritlerden ayırmaktadır (Patel vd. 2012).

Ekzopolisakkaritler üretici suşlar tarafından katabolize edilemediklerinden enerji kaynağı olarak kullanılmamaktadırlar. Bakterinin olumsuz çevre şartlarından korunmasını sağlamanın yanı sıra çizelge 2.1'de belirtilen birçok öneme sahiptirler.

Özellikle hücre tanınmasında ve yüzeylere yapışmada önemli rol oynayan biyofilm oluşumunda yer almaktadırlar (Whitfield ve Valvano 1993, Looijesteijn vd. 2001).

Çizelge 2.1 Bakteriyel ekzopolisakkaritlerin başlıca görevleri

BAKTERİYAL EKZOPOLİSAKKARİTLERİN GÖREVLERİ
Hücrenin aşağıdaki faktörlerden korunması
Fagositoz
Faj Saldırıları
Antibiyotik
Osmotik Stres
Metal iyonları
Bakteriyosin
Diğer görevleri
Biyofilm oluşumu
Yüzeye tutunma

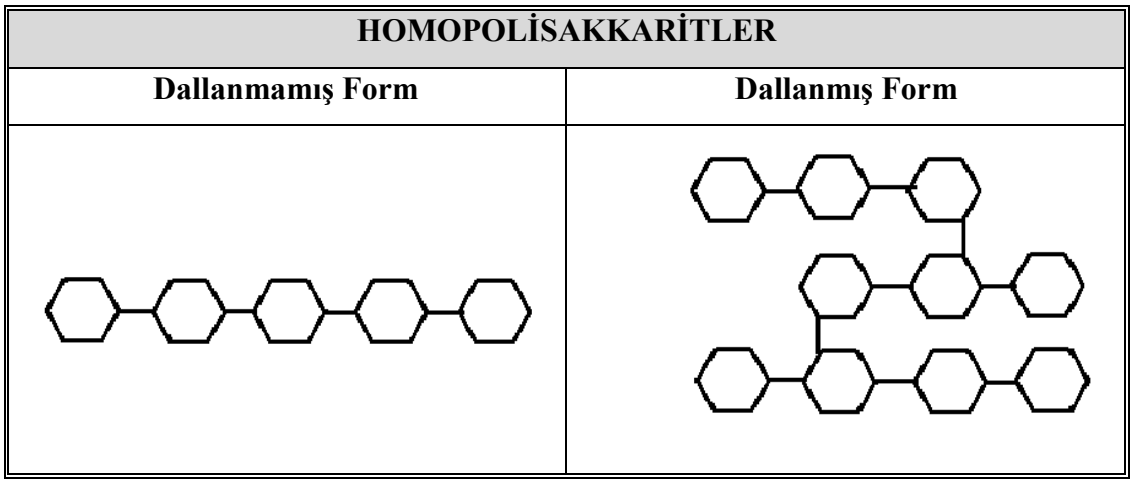
2.4 Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Ekzopolisakkaritler

Laktik asit bakterilerinin ilaç, gıda ve kimya sanayisinde geniş uygulama alanlarına sahip oldukları çok uzun zamandır bilinmektedir. Fakat son zamanlarda çeşitli LAB suşlarının EPS üretim yetenekleri ilgi uyandırmaya başlamıştır. Bu ekstrasellüler polisakkaritler veya ekzopolisakkaritler kullanışlı fiziko-kimyasal özelliklerinden dolayı büyük ticari değere sahiptirler. Özellikle çok çeşitli üretim kapasitelerine bağlı olarak değişen kompozisyonları ve işlevsellikleri, EPS'lerin endüstriyel uygulamalarını genişletmektedir. Bu gruba dahil bakteriler tarafından üretilen EPS'lerin kullanım alanları, monosakkarit kompozisyonuna, mevcut bağlantı tiplerine, dallanma derecelerine ve molekül ağırlıklarına bağlıdır (Iliev vd. 2006). Gıda ile ilişkili LAB suşları GRAS olarak kabul edilmekte ve fonksiyonel EPS üretimi için uygun adaylar olarak gösterilmektedirler (Laws vd. 2001)

Mikrobiyal kaynaklı EPS'ler monosakkarit kompozisyonları ve biyosentez yollarına göre 2 gruba ayrılmaktadırlar: Homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler.

2.4.1 Homopolisakkaritler

Homopolisakkaritler (HoPS) sadece bir çeşit monosakkarit içermektedirler. Şekil 4.1'de belirtildiği gibi dallanmamış ve dallanmış formlarda bulunabilmektedirler.



Şekil 2.1 Dallanmamış ve dallanmış formdaki homopolisakkaritler

Dekstran, mutan, alternan, reuteran, pullulan, levan ve inülin bu gruba dahil EPS'lerdir. D-glukoz veya D-fruktoz gibi aynı monosakkaritlerden oluşmaktadırlar. Glukanlar ve fruktanlar olmak üzere iki ana gruba ve α-D-glukanlar, β-D-glukanlar, fruktanlar ve poligalaktanlar olmak üzere 4 alt gruba ayrılmaktadırlar (Monsan vd. 2001).

- **α-D-glukanlar**: *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum* tarafından üreilen dekstranlar

- **β-D-glukanlar**: *Pediococcus* spp. ve S*treptococcus* spp. sınıfına ait bazı türler tarafından üretilen EPS'ler

- **Fruktanlar (Levanlar)**: D-fruktoz moleküllerinin dallanma bölgelerinde β-2,6 glikozit bağları bulunan EPS'ler

- **Poligalaktanlar:** Farklı glikozit bağlarla bağlı yapısal olarak aynı tekrarlanan ünitelerden oluşan EPS'ler

Çizelge 2.2'de çeşitli LAB suşları tarafından üretilen homopolisakkaritler detaylandırılmıştır (Ruas-Madiedo vd. 2006).

Çizelge 2.2 Laktik asit bakterileri suşları tarafından üretilen bazı homopolisakkaritler

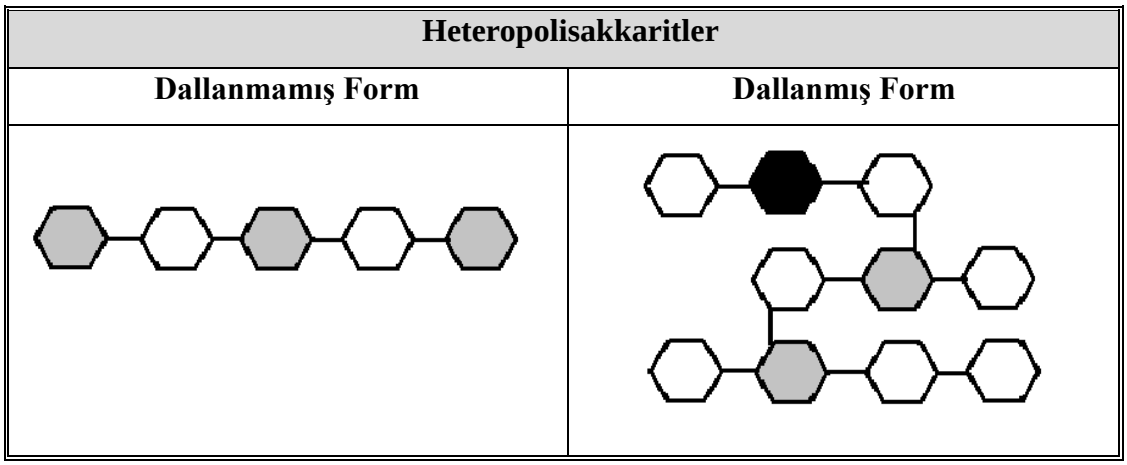
EPS	LAB SUŞLARI	BAĞLAR
α -D-glukanlar		
Dekstran	*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*	α -D-Glc*p*[b] (1→6)
Mutan	*Streptococcus mutans* *Streptococcus sobrinus*	α -D-Glc*p*[b] (1→3)
Alternan	*Leuconostoc mesenteroides*	α -D-Glc*p* (1→3)/ (1→6)
β-D-glukanlar	*Pediococcus* spp. *Streptococcus* spp.	β -D-Glc*p* (1→3)
Fruktanlar		
Levan	*Streptococcus salivarius*	β -D-Fru*p* (2→6)
Inulin-benzerleri	*Streptococcus mutan*	β -D-Fru*p* (2→1)
Poligalaktanlar	*L. lactis* subsp. *lactis*H414	α -D-Gal*p*/ β-D-Gla*p*[c]

Dekstran, glukan ve fruktan gibi HoPS'lerin üretimi için özel bir substrat olan sakkaroza ihtiyaç vardır. Homopolisakkaritlerin kimyasal bileşim ve yapılarındaki

farklılıklar da sakkarozdan hücre dışı sakkaritlerin sentezi sırasında karmaşık reaksiyonların devreye girmesinden kaynaklanmaktadır. Ortamdaki sakkaroz konsantrasyonu, bakteri besiyeri ortamı, inkübasyon süresi ile sakkarozu parçalayan enzimlerin varlığı gibi birçok etken polimer molekül ağırlığını ve yapısını belirgin şekilde etkilemektedir. Suşa bağlı farklılıklar; polisakkaritlerdeki dallanma ve farklı bağlanma noktalarından da kaynaklanabilmektedir (De Vuyst ve Degeest 1999).

2.4.2 Heteropolisakkaritler

Heteropolisakkaritler iki ya da daha fazla tip monosakkarit içeren EPS'lerdir (Das vd. 2009, Xu vd. 2009). Şekil 4.2'de belirtildiği gibi dallanmamış ve dallanmış formlarda bulunabilmektedirler.



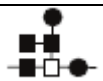
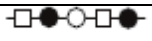
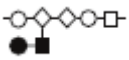
Şekil 2.2 Dallanmamış ve dallanmış formdaki heteropolisakkaritler

Tekrarlayan ünitelerin belirleyici olduğu heteropolisakkarit sentezi ve homopolisakkarit sentezi arasındaki ayrım hücre içinde oluşturulmaktadır (Cerning 1990). Tekrarlayan üniteler membran üzerinde boydan boya yerleşmiştir ve daha sonra hücre dışında polimerize olmaktadırlar (Van Kranenburg 1999).

Heteropolisakkarit (HePS) üretimini, bakteri gelişim fazı, besin ortamı bilesimi (karbon ve nitrojen kaynagı), pH ve sıcaklık etkilemektedir (De Vuyst ve Degeest 1999). Laktik asit bakterilerinin ürettigi EPS'ler degişen oranlarda galaktoz, glukoz ve ramnoz içeren

nötral heteropolisakkaritlerdir (Cerning vd. 1986, 1988). Laktik asit bakterileri tarafından üretilen polimerlerin çoğu HePS yapısındadır. Bu gruba dahil EPS'lerin monomerik yapısında en çok bulunan şekerler galaktoz ve glukoz'dur. Bu monomerlerin yanında fruktoz, ramnoz, mannoz, arabinoz gibi monomerlerde EPS yapısını oluşturabilmektedir (Gruter vd. 1993, Kimmel ve Roberts 1998). Genelikle D-glikoz, D-galaktoz ve L-ramnoz içeren tekrar gruplarından (Çizelge 2.3) meydana gelmektedirler (Ruas-Madiedo vd. 2006). Bu EPS'ler mezofilik (*Lactococcus lactis ssp. lactis, L. Lactis ssp. cremoris, L. casei, L. sake, L. rhamnosus* gibi) ve termofilik (*L. acidophilus, L. delbrueckii ssp. bulgaricus, L. helveticus ve S. thermophilus*) bakteriler tarafından sentezlenebilmektedir (De Vuyst ve Degeest 1999, De Vuyst vd. 2001) ve moleküler ağırlıkları $4{,}0x10^4$ ile $6{,}0x10^6$ Da arasında değişiklik göstermektedir. (Cerning vd. 1992, De Vuyst ve Degeest 1999).

Çizelge 2.3 Laktik asit bakterileri suşları tarafından üretilen heteropolisakkatirler

LAB SUŞLARI	**Tekrar Grupları**	**Referans**
Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* 291		Faber vd. 2001
Lactobacillus helveticus Lb161		Staaf vd. 2000
Lactobacillus helveticus K16		Yang vd. 2000
Lactobacillus rhamnosus C83		Van Haverbeke vd. 1998
Lactococcus lactis subsp. *cremoris* NIZO B39		Van Casteren vd. 2000
Lactococcus lactis subsp. *cremoris* NIZO B891		Van Casteren vd. 2000

(■) β-D-glikoz; (□) α-D- glikoz; (●) β -D-galaktoz; (○) α-D-galaktoz; (♦) β-L-ramnoz; (◊) α-L-ramnoz, (Ac) asetil.

2.5 Ekzopolisakkarit Üretimi

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS'lerin elde edilebilen konsantrasyonları diğer gruplara göre genellikle daha düşük olmakla birlikte, türe ve gelişme koşullarına bağlı olarak 20-600mg/L arasında değişkenlik göstermektedir (Shaun 2011). Bakterilerin viskoz bileşikleri üretme yeteneklerinin oldukça değişken olduğu bilinmektedir. Ancak LAB suşlarında EPS üretimini etkileyen birçok parametre tanımlanmıştır (Degeest vd. 2001).

2.5.1 Laktik asit bakterilerinin ekzopolisakkarit üretimini etkileyen faktörler

Fermentasyon sırasından ulaşılan bakteri populasyonu ile üretilen EPS'lerin kalitesi arasındaki ilişki ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Bergmaier vd. 2003; Mozzi vd. 2003; Torino vd. 2000,). Genelikle EPS üretimi bakteriyel büyüme ile ilişkilidir. Fakat fermentasyon koşulları da EPS üretimini önemli derecede etkilemektedir. EPS üretimi genellikle logaritmik fazda ya da durgun (stationary) fazda gerçekleşebilmektedir (Cheirsilp vd. 2001; Petry vd. 2003). Bununla beraber, kullanılan inkübasyon sıcaklığı EPS üretimi üzerinde oldukça etkili olmaktadır. Yapılan çalışmalarca bazı LAB suşlarının EPS üretimi için optimum sıcaklıkları tespit edilmiş olup, bu değer *L. lactis* için 25°C (Cerning vd. 1992), *S. thermophilus* ST 111 için 40°C (Van Ingelgem vd. 2004), *L. rhamnosus* içinse 20-25°C olarak belirlenmiştir (Gamar-Nourani vd. 1997). Yüksek molekül kütlesine sahip EPS'lerin düşük fermentasyon sıcaklıklarında üretildikleri tespit edilmiştir. Ortamdaki karbonhidrat mikrarının EPS üretimi üzerinde etkisi araştırıldığında, başlangıç ortamındaki yüksek karbonhidrat miktarının EPS miktarının artmasına sebep olduğu tespit edilmiştir (Prasher vd. 1997, Duboc ve Mollet 2001, Cheirsilp vd. 2003). Birçok LAB suşu EPS üretimi için amino asitlerce ve peptonlarca zengin bir ortama ihtiyaç duymaktadır (Hujanen ve Linko 1996, Gu vd. 2000, Van Ingelgem vd. 2004). Vitamin ve mineraller gibi diğer bileşenler bakteri populasyonunu ve buna bağlı olarak da EPS üretiminin artmasına yardımcı olmaktadır. Bakteri gelişimi birçok farklı besiyerinde olmaktadır: Besiyerileri ise genellikle glukoz (en yaygın olarak kullanılan), fruktoz, sakkaroz, galaktoz, laktoz gibi farklı karbon kaynaklarının kullanımı ile çeşitlendirilmektedir. Bazı bileşenlerin EPS

analizini ve ölçümünü engelleme potansiyeli olduğundan uygun EPS üretim besiyerinin seçimi büyük önem taşımaktadır (Ruas-Madiedo ve de los Reyes-Gavilan 2005).

2.5.2. Ekzopolisakkaritlerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması

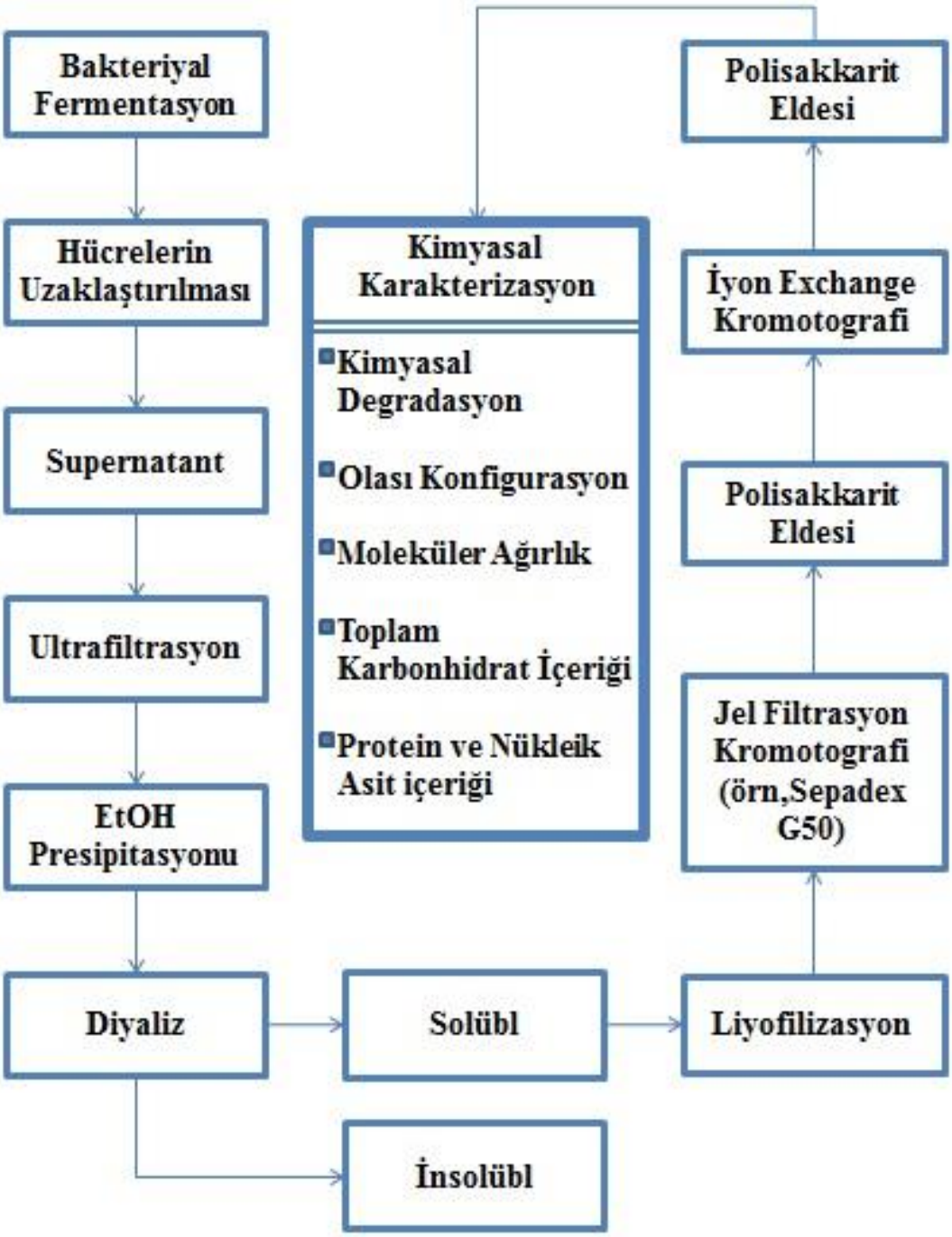
Hücre dışına salgınan ve süpernatantta bulunan mikrobiyal ekstraselüler polisakkaritlerin ektraksiyonu için yaygın olarak kullanılan birkaç protokol bulunmaktadır. Bu protokoller temel olarak şu basamakları içermektedirler.

- Santrifüj ve filtrasyon yöntemi ile hücrelerden ayırma,
- Hücrelerinden ayrılmış süpernatanta, polimerlerin çözünmediği, çöktürme ajanlarının (ör. metanol, EtOH, izopropanol veya aseton) eklenmesi ile polimer presipitasyonu (çöktürülmesi)
- Çöktürülmüş polimerlerin dondurularak kurutulması (Rosalam ve England 2006, Bajaj vd. 2007, Freitas vd. 2009, Pena vd. 2008).

Birçok protokolde, fermantasyon işleminden sonra kültür hücrelerinden ayrılmadan önce ısıtma işlemi (90–95°C) kullanılmaktadır (Bajaj vd. 2007). Bu ısıl işlemin amacı bakteriyel hücreleri cansız hale getirmek ve sonraki adımlarda polimerlerin bozulmasına neden olabilecek enzimlerin inaktivasyonunu sağlamaktır. Daha yüksek derecede saflığa sahip polisakkaritleri elde edebilmek amacıyla aşağıdaki işlemlere devam edilmektedir.

- Kimyasal deproteinizasyon (örneğin trikloroasetik asit ile protein çöktürme). (Ayala-Hernandez vd. 2008)
- Enzimatik yöntemler (örneğin proteaz kullanımı gibi) (Wang vd. 2007)
- Membran uygulamaları (örneğin ultrafiltrasyon ve diafiltrasyon) (Kumar vd. 2007, Bahl vd. 2010, Freitas vd. 2011)

Mikrobiyal EPS'lerin ekstraksiyonu, saflaştırılması ve yapısal karakterizasyonunu içeren temel adımlar şekil 5.1'de detaylandırılmıştır (Nicolaus vd. 2010).



Şekil 2.3 Mikrobiyal EPS'lerin ekstraksiyonu, saflaştırılması ve yapısal karakterizasyonunu içeren temel adımlar

2.6 Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Ekzopolisakkaritlerin Kullanım Alanları ve Fonksiyonları

2.6.1 Ekzopolisakkaritlerin gıdalarda kullanımı

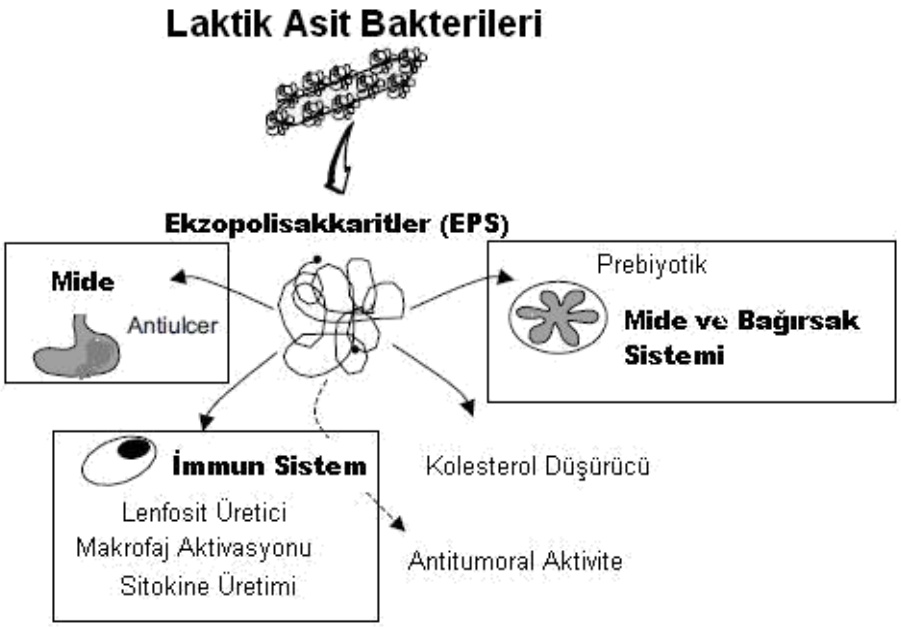
Fermente ürünlere LAB suşları tarafından istenilen bazı özelliklerin kazandırılması EPS üretim yetenekleri ile ilişkilidir. Çeşitli LAB suşları tarafından sentezlenen EPS'ler fermente süt ürünlerinde doğal stabilizörler olarak kullanılmaktadırlar (Liu 2003). Özellikle yogurt, düsük viskoziteli yoğurt, peynir, fermente krema, sütlü tatlıların üretimi için EPS üreten LAB'leri tercih edilmektedir (Bouzar vd. 1997; Cerning 1990). Bunun temel nedeni ise, EPS'nin son ürünün tekstür, ağızdaki his, tat ve stabilitesine katkıda bulunmasıdır.

2.6.2 Ekzopolisakkaritlerin sağlık alanında kullanımı

20. yüzyılın başlarından beri bazı bakterilerin insan sağlığı üzerinde yararlı ektiye sahip oldukları oldukça açıktır. Günümüzde probiyotik içeren fonksiyonel gıdaların geliştirilmesi hem sağlık hem de ekonomi alanında yararlı olmuştur. Genellikle probiyotik olarak kullanılan bakterilerin çoğu EPS üreten *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerine ait üyeler arasında yer almaktadır. Bunun temel sebebi EPS'lerin biyolojik aktiviteleri ile ilişkilidir. Ekzopolisakkaritlerin insan sağlığı ile ilişkisi şekil 2.4'te özetlenmiştir (Ruas-Madiedo vd. 2002).

2.6.2.1 Ekzopolisakkaritlerin sindirim sistemi üzerine etkileri

Ekzopolisakkaritlerin kimyasal bağları ve yapısı onları sindirim enzimlerine karşı dirençli kılmaktadır. Çoğu EPS, diğer sindirilemeyen lifler gibi hareket ederek gastrointestinal sisteminin sonuna ulaşana kadar parçalanmadan ulaşabilmektedir. Aynı zamanda kolondaki bakteriler tarafından fermente edilebilen EPS'ler konakçı için enerji kaynağı oluşturmakta ve kolon kanserine karşı koruma sağladığına inanılan kısa zincirli yağ asitlerini (SCFA) üretmektedirler (Bugaut ve Bentejac 1993).



Şekil 2.4 Ekzopolisakkarit üreten laktik asit bakterileinin insan sağlığı ile ilişkisi

2.6.2.2 Ekzopolisakkaritlerin antitümör etkisi

Bazı bakterilerin antimutajenik etkilere sahip olduğu bilinmektedir. EPS üretimi ve bunların mutajenleri bağlama yeteneği kısmen bu olguyu açıklamaktadır. Örneğin *B. longum* tarafından üretilen EPS'ler heterosiklik aminleri bağlayabilmektedirler. Kefir tohumlarından izole edilen EPS'nin, Ehrich karsinomu (%64'e kadar inhibisyon) ve sarkoma 180'in (90'a kadar inhibisyon) büyümesini engellediği fare deneylerinde tespit edilmiştir (Shiomi vd. 1982). Tümör gelişimi EPS'lerin oral yolla alımı ya da intraperitonel olarak enjeksiyonu ile inhibe olabilmektedir. Radyoaktif olarak etiketlenmiş EPS'ler kullanıldığında bazı EPS'lerin veya bunların yıkım ürünlerinin dalak ve timuslara ulaştığı gösterilmiştir ki bu da antitümör etkisinin gecikmiş tip hipersensitive sonucu olduğu hipotezini desteklemektedir (Murofushi vd.1986).

2.6.2.3 Ekzopolisakkaritlerin kolesterol metabolizmasına etkileri

Ekzopolisakkaritler diyet lifleri gibi çalışarak serumdaki kolestrol seviyesini düşürmektedirler. İntestinal mukus tabakasındaki akışkanlık EPS'lerin varlığı ile artmakta, böylece kolesterolün emilimi de azalmış olmaktadır. Ayrıca EPS'lerin kimyasal yapısına ve boşaltım sisteminin ortam şartlarına (örneğin pH) bağlı olarak kolesterol ile doğrudan kimyasal bağ oluşabilmektedirler. Oluşan bu bağlanma boşaltımı artırmakta, karaciğerden salgılanan safra asidi sentezini indüklemekte ve kolesterol oksidasyonunu azaltmaktadır. Ayrıca kolondaki EPS'lerin özelikle propiyonat oluşturarak kolesterol sentez yolunu etkilemeleri de mümkündür.

2.6.2.4 Ekzopolisakkaritlerin diyabet üzerine etkileri

Gıda viskozitesi, gıdaların mideden çıkış hızını etkilemektedir. Bir EPS olan ksantan zamkının kullanımı, bağırsakta sindirim ve emilimi geciktirerek mide boşaltılmasının yavaşlatılması sağlamakta, bu da glisemik yanıtı yavaşlatan bir strateji olarak değerlendirilmektedir. *L. kefiranofaciens* tarafından elde edilen kefiranın ise farelerde kan şekerini düşürme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (Maeda vd. 2004).

2.6.2.5 Ekzopolisakkaritlerin probiyotiklere kazandırdığı olumlu etkiler

Son çalışmalar LAB suşlarının probiyotik etkilerinin tüm mükroorganizmanın ya da hücre duvarı komponenetlerinin sonucu değil aynı zamanda bakteri gelişimi sırasında üretilen peptid, nükleik asit ve ekstraselüler polisakkaritlerden de kaynaklandığı göstermektedir (Nishimura-Uemura vd. 2003). Bu etkinin bakteri tarafından üretilen EPS çeşitliliğinden de kaynakladığı kabul edilmektedir (Makino vd. 2006). Probiyotik bakteriler EPS üretme yeteneğine sahiptirler. Probiyotik bakterilerin sağlık açısından yararlarının EPS üretimine bağlanabileceği öne sürülmektedir. Ancak EPS'lerin kompozisyonu, yapısı ve biyolojik fonksiyonları mikroorganizmanın tipine ve çevre koşullarına bağlı olmak üzere oldukça değişkendir (Cizsek-Lenda 2011).

Teknolojik faydalarına ek olarak LAB tarafından üretilen EPS'lerin tüketici üzerinde olumlu fizyolojik etkilerinin de olduğu iddia edilmektedir. Probiyotikler tarafından üretilen EPS bağırsaktaki epitel hücrelerine yapışma ve koagregasyon ile konakçıya destek sağlamakta ve aynı zamanda patojenik bakterilerin insanda bağırsak mukusuna yapışmasını müdahale etmektedir (Ruas-Madiedo vd. 2006). Bu özellik EPS'nin probiyotik açıdan önemini oldukça arttırmaktadır. Bu durum rekabetçi çevrede EPS'nin bağırsak sisteminde probiyotiklerin kolonizasyonu ile ilişkili olduğunu göstermektedir. EPS gastrointestinal sistemde uzun süre kalabildiğinden *Bifidabacterium* ve *Lactobacillus* cinsine ait probiyotik bakterilerin kolonizasyonunu kolaylaştırabilmektedirler. Prebiyoktik olarak tanımalanan EPS'ler probiyotik olarak kullanılacak bakteriye florada daha fazla avantaj sağlamaktadır (Patel vd. 2012).

2.6.2.6 Ekzopolisakkaritlerin immünomodülatör etkileri

İmmünmodülatörler immün sistemi etkileyen faktörler olarak tanımlanmaktadır. İmmün sistem immunosüpresörler tarafından immun cevabın engellenmesi ya da immunstimulatörler tarafından immun cevabın artıtılması ile regüle edilebilmektedirler. İmmunmodülasyon mekanizmaları immun sistem hücre zarlarında bulunan reseptörler ile immunmodülatörler arasındaki etkileşim ile açıklanmaktadır. Bu etkileşim kinazların aracılığı ile belirli bir yolakda bulunan proteinlere fosfotranferi sağlayan internal kaskadı aktive etmektedir. Bunun sonucu olarak, transkripsiyonal regülatörlerin bağlanma afinitesinin değişmesi, gen ekspresyiyonunun aktivasyonunu ya da baskılanması belirlenmektedir.

Probiyotik olarak kullanılan birçok LAB suşları fonksiyonel olarak gıdalarda kullanılabilmekte, immünomodülator özelliğe sahip olmakla birlikte EPS üretim yeteğine sergilemektedirler (Foligne vd. 2007). Fakat bunların immünmolatör yetenekleri suşa özeldir ve doğrudan EPS ile bağlantılı değildir. Buna ek olarak mevcut bilgiler göstermektedir ki LAB suşları tarafından sentezlenen bu biyopolimerlerin doğası ve yapıları gereği immünomodülatör ve gıda katkı maddeleri olarak kullanılma potansiyelleri mevcuttur.

Farmakolojik aktif biyopolimerler alanında, immün sistemi uyarıcı polisakkaritler olarak oldukça yeni ve dikkat çekici bir alan haline gelmiştir. Bazı EPS'ler, diğer polisakkaritler gibi, EPS'yi oluşturan şeker rezidüsüne ve sayısına, moleküler boyutuna ve stereokimyasal yapısına bağlı olarak immün sistemi stimüle edici özelliklere sahiptirler. En çok ilgi ise enfeksiyon ajanlarına karşı direnç ve allerjenlerden sorumlu olan Th1 yanıtının uyarılması yönündedir.

Ekzopolisakkaritlerin yapısı immün-uyarıcı etkiden dolayı çok önemlidir. *L.rhamnosus* KLC37'dan alınan EPS içeren bir hücre duvarı özünün (peptidoglikan olmadan) immünmodülatör kapasitesi laboratuvar ortamında test edilmiş ve *Escherichia coli*'den alınan lipopolisakkarit (LPS) ile karşılaştırılmıştır. Fare makrofajında doza bağımlı pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimini uyardığı ve uyarının p38 ve ERK kinaz aktivitesine bağlı olduğu tespit edilmiştir (Cizsek-Lenda 2011).

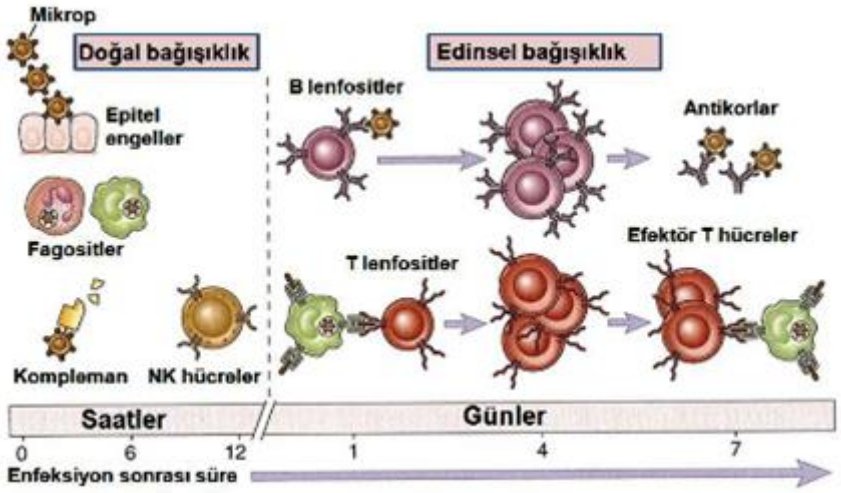
Mantarlar, bitkiler ve bakterilerdeki birleşik hücre duvarı bileşenleri olan β-glukanlar immün sistemi aktive etme yeteneklerinden dolayı "biyolojik yanıt değiştiriciler" tanımlanmaktadırlar (Wasser 2011). Lineer yapıya sahip β-glukanın dektin-1, kompleman reseptör 3 (CR3), ve Toll benzeri reseptörler (TLR) 2 ve 6 gibi bazı reseptörleri aktive ettiği yakın zamanda kanıtlanmıştır (Chlubnova vd. 2011). Bu reseptörler ile etkileşim sitokin üretimini içeren (TNF-α, IL-6 and IL-10) basamakları tetiklemektedir. Bu bilgiler doğrultusunda (1,3) β-glukan üreticisi LAB'lerine ait *Lactobacillus* ve *Pediococcus* cinslerinin *in vitro* koşullarda makrofajları aktive edebildiği tespit edilmiştir (Fernández de Palencia vd. 2009; Garai-Ibabe vd. 2010).

2.7 İmmün Sistem

Enfeksiyonlara karsı direnci sağlayan hücrelerin, dokuların ve moleküllerin oluşturduğu bütün immün sistem olarak adlandırılmaktadır. Memelilerde immün sistem kısaca yabancı olana karşı özgül ve zamanında savunma oluşturmak gibi basit bir kurala dayanmaktadır. Bununla beraber yabancı organizmaların etkisinden korunmak ya da bu etkiyi azaltmak için vücut deri sindirim, solunum ve üreme sistemlerinde bulunan epitel

hücreler (Janeway ve Medzhitov 2002) gibi fiziksel bariyerle sarılıdır ayrıca kimyasal ve hücresel yapılarda bu sistemde yer almaktadırlar (Murphy vd. 2011).

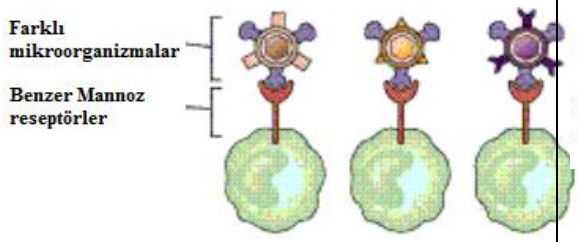
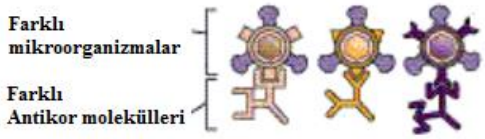
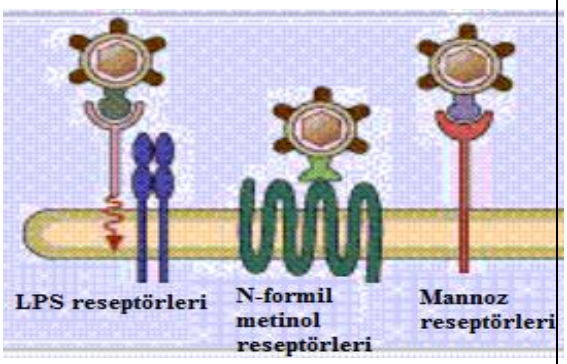
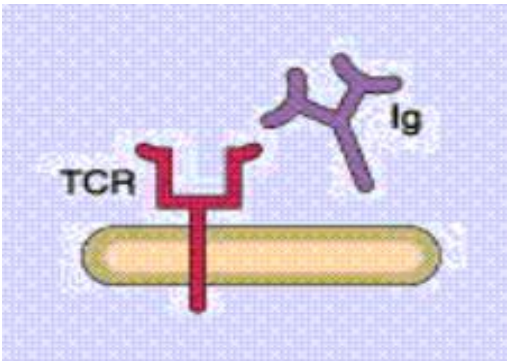
İmmun sistem enfeksiyonlara karşı ilk koruyucu engeli oluşturan doğal bağışıklık ve sonrasında daha yavaş olarak devreye giren ancak enfeksiyonlara karşı daha etkili olan edinsel bağışıklık sistemlerini kapsamaktadır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Doğal ve edinsel bağışıklığın temel mekanizmaları

Her iki bağışıklık mekanizmasında da virüsler, bakteriler, parazitler ve mantarlar gibi mikroorganizmalara karşı uzun soluklu bir savunma oluşmaktadır (Kabelitz ve Medzhitov 2007). Doğal bağışıklık sistemi antijenleri tanımlayan ancak belek yeteneği olmayan birçok reseptörü kullanmaktadır. Bunun yanı sıra edinsel bağışıklık sistemi enfeksiyonunu belirlemek için antijenlere spesifik reseptörler gibi oldukça karmaşık bir yol izlemektedir (Iwasaki ve Medzhitov 2010). Bu iki sistem arasındaki farklılıklar çizelge 2.4'de özetlenmektedir. Doğal bağışıklık savunmanın ilk aşamasını oluşturmasının yanı sıra B ve T lenfositlerin aktivasyonunda ikilcil uyarıyı da gerçekleştirmektedirler. Bu ikincil uyarıya bağlı olarak edinsel bağışıklık mikroorganizmalara yanıt oluştururken mikroorganizma dışı maddelere yanıt oluşturmamaktadır.

Çizelge 2.4 Doğal ve edinsel bağışıklığın özgünlüğü

	Doğal Bağışıklık	Edinsel Bağışıklık
Özgüllük	Mikrop sınıfları tarafından paylaşılan yapılar için (moleküler kalıplar) 	Farklı mikroorganizmalarda bulunan antijenlere özgüllerdir. 
Reseptörler	Germline içinde kodlanma; sınırlı farklılık 	Gen segmentlerinin somatik rekombinasyonu ile oluşan genler tarfından kodlanma; daha fazla farklılık 
Reseptörlerin Dağılımı	Nonklonal: Aynı dizine ait hücreler üzerindeki benzer reseptörler.	Klonal: Farklı özgüllüğe sahip lenfosit klonlarını farklı reseptörler eksprese ederler.
Öz olan ve olmayanı ayırt etme	Konak hücreleri tanınmaz veya doğal bağışıklığı engeleyici moleküller eksprese ederler.	Öze reaksiyon veren lenfositlere karşı seçime dayanır; hatalı olabilmektedir. (otoimmünite)

2.7.1 Doğal bağışıklık

Doğal bağışılık sistemi patojenlerin karşılaştığı ilk savunma hattıdır ve birçok farklı yapıdan ve alt sistemlerden oluşmaktadır. Patojenlerin karşılaştığı ilk bariyer deri ve mukozal epitel hücrelerdir. Bu epitel hücreler ve keratinositler patojenlere karşı savunmaya sağlayan antimikrobiyal peptidleri üretme yeteneği olan özelleşmiş hücrelerdir (Hiroshima vd. 2012). Bu özellikleri sayesinde sadece fiziksel değil aynı zamanda kimyasal bariyer olarak da görev yapmaktalardır (Medzhitov 2007).

Doğal bağışıklığın diğer yapıtaşları arasında doğal öldürücü hücreler (NK hücreleri), kompleman sistemleri, fagositik hücreler ve sitokinler yer almaktadır. Fagositik hücrelerin başlıcaları olan nötrofiller ve makrofaj hücreleri enfeksiyon bölgesindeki mikroorganizmaları özel reseptörleri ile tanımaktadırlar. Nötrofiller ve makrofaj hücreleri mikroorganizmaları sindirdikten sonra sitokinlerin salgılanmasına sebep olmaktadır. NK hücreleri ise mikroorganizmalar tarafından enfekte olmuş hücreleri yıkıma uğratmakta ve makrofajları uyaran IFN-ɣ gibi sitokinleri üretmektelerdirler (Orange ve Ballas 2006). Doğal bağışıklık sitokinleri enflamasyonu uyarmakta (TNF, IL-1), NK hücrelerini aktive etmekte (IL-12), makrofajları uyarmakta (IFN-ɣ) ve viral enfeksiyonları engellemektelerdir. Doğal bağışıklığın en önemli görevlerinden biri ise B ve T lenfositlerinin aktivasyonuyla edinsel bağışıklığın harekete geçmesini sağlamaktır (Watts vd. 2010). Patojenlerin tanımlanması ya da enfeksiyona maruz kalmış hücrelerin kalıntıları inflamatuvar mediyatörlerin salınımını ve nötrofiller gibi fagositoz yeteneği olan hücrelerin enfeksiyon bölgesine göç etmesini sağlamaktadır. İmmun yanıt çoğunlukla harakete geçmiş hücreler tarafından salgılanan sitokinler tarafından sağlanmaktadır (Çizelge 2.5).

Doğal bağışıklık sisteminin bir alt sistemi de patojenlerin işaretlenmesinde yardımcı olan kompleman sistemidir (Degn vd. 2007). Kompleman sistemi birçok küçük proteinden oluşmaktadır. Kompleman sisteminin aktivasyonunda bu proteinler sıralı olarak harekete geçirmekte ve hücre zarına zarar veren kompleks yapıyı oluşturmaktadırlar.

Çizelge 2.5 Sitokinlerin etkileri ve hedef hücreleri

Sitokinler	Üretildikleri Hücreler	Görevleri
IL-1β	Makrofajlar Kretinositler	Akut faz protein salınımını tekikler T hücrelerini ve makrofajları aktive eder
TNF-α	Makrofajlar Dentritik hücreler Doğal öldücücü hücreler T hücreleri	Lokal enflamasyon ve endoteliyal aktivasyonu sağlar
IL-6	Makrofajlar Dentritik hücreler	B ve T hücrelerinin gelişmesi ve farklılaşmasını sağlar
IL-12	Makrofajlar Dentritik hücreler	Doğal öldücücü hücrelerin aktivasyonunu sağlar T hücrelerinin Th 1 hücrelerine dönüşmesinde rol oynar
IFN-α	Dentritik hücreler	Anti-viral immunite ve MHC I ekspresyonunda görev alır
IFN-γ	Doğal öldücücü hücreler T hücreleri	Th 2 hücrelerinin baskılanmasında , makrofajların aktivasyonunda ve antijen sunan komplamanların ekspresyonunda görev alır

2.7.2 Patojen kalıplarını tanıyan reseptörler (PRRs)

Doğal bağışıklık sisteminde yer alan bir diğer anahtar ise enfeksiyonun yayılmasını engelleyen enflamasyon sürecidir. Bu süreçte patojen kalıplarını tanıyan reseptörleri (PRR) taşıyan makrofaj ve dendritik hücreleri gibi özelleşmiş bağışıklık hücreleri ile başlamaktadır. Bu reseptörler hastalık etmenine eşlik eden moleküler yapıları (PAMP/ patojenle ilişkili moleküler kalıplar) tanımaktadır. PAMP patojenlerde ortak olan bir dizi moleküler yapıyı tanıyabilmekte ve böylece konağa ait olanı ve olmayanı belirleyerek savunmayı başlatabilmektedir (Gordon 2002).

Lipopolisakkarit (LPS), peptidoglikan, bakteri hücre duvarı komponentlerinden lipoteikoik asit, fungal hücre duvarı olan β-glukan, bakteriyal genomda tek DNA zinciri üzerinde bulunan metillenmemiş sitozin-fosfat- guanin motifleri (CpG), virüslerde görülen çift zincirli RNA (dsRNA) en bilinen PAMP üyelerindendir (Akira 2006).

Doğal bağışıklık cevabının başlatılması PRR'ler ile sağlanır ve mikroorganizmanın hayatta kalması için temel mikrobiyal bileşenleri tanırlar. Farklı PRR'ler spesifik ligandlara tepkime verirler ve antipatojen yanıtlara yol açar. PRR'ler eşey hücre

öncülleri tarafından kodlanmış, klonal olmayan ve temel olarak konakta üretilen bileşiklerdir. Doğal immün sistem hücrelerinde bulunan Toll benzeri reseptörler (TLR) PAMP adı verilen bu bölgeleri taşıyan endojen veya eksojen ligandlar tarafından uyarılır. TLR aktivasyonu sonucu patojenlere karşı konakçı cevabı ve otoimmün yanıt oluşur. TLR'ler hücre yüzeyinden ve endosomal zardan ifade edilmektedirler. TLR bakteriden mantarlara, protozoadan virüslere kadar çok geniş çerçeve de doğal bağışıklıkta büyük rol oynar. TLR birçok patojene karşı doğal bağışık cevabın oluşmasını sağlayan proteinleridir. TLR'ler patojen tanınmasında, inflamatuvar ve immün sistem cevabının başlatılmasında oldukça önemli bir role sahip olan bir grup PRR'dir. Aynı zamanda adaptif bağışıklık cevabın aktive olmasını sağlayarak konak bağışıklığında önemli role oynamaktadırlar (Janeway ve Medzhitov 2002).

2.7.3 Toll benzeri reseptörlerin yapısı

Toll, ilk olarak meyve sineği (Drosophila melanogaster) embriyosunda tanımlanmış, mantar enfeksiyonlarına karşı immün cevapta önemli rol oynadığı tespit edilmiş bir gendir (Hashimoto vd. 1988) ve bu genin ürettiği transmembran proteinlerinin homologları daha sonradan memelilerde tespit edilmesi ile TLR olarak adlandırılmıştır. TLR, sitoplazmik ve ekstrasellüler bölgeden oluşan bir transmembran proteinidir. Sitoplazmik bölgesi, IL-1 reseptörü ile yüksek derecede benzerlik gösterir ve bu nedenle Toll/IL-1 reseptör (TIR) bölgesi olarak adlandırılır. Reseptörlerin ekstrasellüler bölgesinde her biri 24-29 amino asit içeren, lösince zengin tekrar (LRR) motifleri bulunur. Bu LRR bölgelerinin farklı patojenlerin tanınmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir (Takeuchi ve Akira 2002). İnsanlarda TLR ailesinin tanımlanmış 10 farelerde ise 12 üyesi (TLR1-12) mevcuttur (Kawai, 2010). TLR 1-9 insanda ve farede ortak olarak bulunurken; TLR 10 farelerde fonksiyonel değildir. TLR 11,12 ve 13 ise insan genomunda kaybolmuştur (Kawai, 2009). TLR 1, 2, 4, 5, 6, 11 tipleri hücre yüzeyinde, TLR 3, 7, 8, 9, 10, 12 sitoplazmada özellikle endozomlarda bulunur (Takeda vd. 2003). Bu reseptörlerin doğal immün sistem tarafından tanınması sonucu kositimülatör moleküller, sitokinler ve kemokinler uyarılır, antijen spesifik lenfositler toplanır, aktive olur ve edinsel immün cevap başlar. TLR'ler direkt ve indirekt olarak doğal ve kazanılmış immün cevapları uyarmaktadır. Her bir TLR, inflamatuar

sitokinlerin uyarılması veya kositimülatör molekül ekspresyonlarının artışı gibi genel etkileri yanında, tip I interferonu (IFN) uyarabilme gibi spesifik fonksiyonlara da sahiptirler. TLR sinyal yolları TIR domain içeren adaptör moleküller tarafından çok iyi bir biçimde düzenlenir. Bu TIR domain içeren adaptörlerin farklı kullanımı TLR aracılı sinyal yollarının spesifitesini sağlar. Bu nedenle, TLR aracılı doğal immün yanıtın aktivasyonu; yalnızca patojenlere karşı konak savunmasının kontolü değil, aynı zamanda immün hastalıklarla da ilişkilidir.

2.7.3.1 Toll benzeri reseptör ailesi üyeleri

2.7.3.1.1 Hücre dışında bulunan Toll benzeri reseptörler

TLR1, dalak ve periferal kan hücrelerinden yüksek düzeyde eksprese edilmektedir. TLR1'in triaçil lipopeptitlere karsı olusan yanıtta TLR2 ile beraber rol aynadıgı gösterilmistir (Takeda ve Akira 2005). Hem gram negatif hem de gram pozitif bakteriler üzerinde bulunan lipoproteinlerin TLR2 tarafından tanınması sonucunda hücreleri aktive ettigi gösterilmis ve TLR2'nin agırlıklı olarak lipoproteinleri tanıyan reseptör oldugu kabul edilmistir. TLR2; peptidoglikan, lipoteikoik asit, gram pozitif lipopolisakkarit ve bir grup gram pozitif makromolekül ile baglanarak cevap verebilmektedir (Underhill ve Ozinsky 2002). Peptidoglikan, TLR2 ve TLR6'nın dimer olusturdugu reseptör aracılıgıyla sinyal iletirken, lipoproteinler TLR6'ya ihtiyaç duymadan TLR2'yi aktive edebilmektedir. Ayrıca TLR2 ve TLR6 birlikte mikoplazma lipoproteinin tanınması için gereklidirler (Akira 2003). İnsanda en çok arastırılan ve fonksiyonu aydınlatılan Toll-like reseptörlerden olan TLR4, LPS'in tanınmasında rol almaktadır. TLR4'ün bir LPS reseptörü oldugu ortaya çıkarılmıs ve bu reseptörün fonksiyonel olarak hücre yüzeyinde; CD14, MD-2 ve LPS baglayıcı proteini içeren bir molekül kompleksini olusturdugu, bu moleküllerden herhangi birinin eksik oldugu farelerde LPS cevabının da eksik oldugu gözlenmistir (Agnese vd. 2002). CD14, TLR4'ü ve ekstraselüler bir protein olan MD-2'yi içeren bir kompleksle birlesmektedir. TLR4'ün LPS dısında konaga ait olan ve olmayan birçok molekülü tanıyabildigi bilinmektedir. TLR4 üzerinde sinyal ileten bir baska endojen ürün de, fibrinonektinin ekstra domain A (EDA) bölgesidir (Okamura vd. 2001). TLR5, bakteriyel flagellanın

temel yapısal bir komponenti olan bakteriyel flagellini tanımaktadır. TLR5'in flagellin ile bağlanması sonucu tümör nekroz faktörü (TNF)-α gibi inflamatuvar sinyal olusur. TLR2, TLR4 ve TLR6 birçok farklı mikrobiyal ajana cevap verebilirken, TLR5 ve TLR9 tek bir yapıyı spesifik olarak tanıyan reseptörlerdir (Akira 2003). TLR11 (profilin), idrar kesesi epitel hücrelerinden eksprese edilmistir. TLR11, üropatojenik bakteriler tarafından olusturulan enfeksiyonlara yanıt vermede görevlidir (Takeda ve Akira 2005).

2.7.3.1.2 Hücre içinde bulunan Toll benzeri reseptörler

Enfekte hücrelerde viral replikasyon, immun hücreleri stimüle edebilen çift sarmallı RNA (double-stranded RNA, dsRNA)'nın olusması ve Tip 1 interferon'un indüklenmesiyle sonuçlanır. TLR3'ten yoksun farelerde yapılan çalısmalarda viral RNA kopyasına karsı olusan cevapların azalması, TLR3'ün dsRNA'nın tanınmasında rol oynadıgını göstermistir (Takeda ve Akira 2005). TLR7, tek zincirli RNA ve imidazoquinolin ailesinin birkaç tipini tanır. Bunlar, imiquimod ve R-848 gibi kuvvetli antiviral ve antitümör özelliklerine sahip imidazoquinolin ailesinin düsük moleküler kütleli bilesikleridir. Imiquimod'un aktivitesi, IFN-α ve IL-12 gibi sitokinleri uyarma yetenegine dayanır. TLR7, loksoribin ve broprimin gibi diger sentetik kimyasalları da tanır. TLR8'in TLR7 ve TLR9 ile iliskili oldugu gösterilmistir. TLR8, endozomal kompartmanda tek zincirli RNA'yı tanır ve sitokin salınımına sebep olur (Takeda ve Akira 2005).

TLR9, bakteriyel ve viral metillenmemis, sitozin fosfat guanozin (CpG) dinükleotitlerini içeren sentetik oligodeoksinükleotitleri tanımaktadır. Bu oligodeoksinükleotitlerin B-hücre proliferasyonunu sitimüle ettigi ve makrofaj ile dendritik hücreleri aktive ettigi görülmüstür. Optimal immün sitimülasyonunu saglayan CpG-DNA motifi, insan ve fare arasında farklıdır. Bu farklılık, insan ve fare TLR9'larının ekstraselüler bölgelerindeki aminoasit sekans farklılıgından kaynaklanır (Akira 2003, Takeuchi ve Akira 2002).

2.7.3.2 Toll benzeri reseptörlerin ligandları (baglayıcıları)

Toll benzeri reseptörler (ve diğer doğustan gelen reseptörler) özelliklerinden dolayı kolayca degismezler. Bu reseptörler, tehditlerle iliskilendirilen molekülleri tanırlar ve yüksek oranda spesifite gösterirler. Bu gereklilige uyan patojenle iliskili moleküller, genellikle patojenin görevinde kritik öneme sahiptirler ve mutasyonlarla degistirilemez ya da elimine olamazlar. Bu özellikleriyle evrimden korunmus sayılırlar. Patojenlerde iyi korunan bu özellikler, bakterilerde hücre yüzeyi lipopolisakkaritleri (LPS), lipoprotein, lipopeptit ve lipoarabinoman, bakteriyel flagelladan flagellin gibi proteinler; virüslerin çift zincirli RNA'sı ya da bakterilerin metillenmemis CpG adaları ve viral DNA'sı ile diger DNA ve RNA'larıdır (Çizelge 2.7).

Çizelge 2.6 TLR'ler, bağlayıcıları ve yerleri (Tizard 2004).

Reseptör	Bağlayıcı(lar)	Adaptör(ler)	Yerleşim Yeri
TLR1	triaçil lipoproteinler	MyD88/MAL	hücre yüzeyi
TLR2	lipoproteinler; gram pozitif peptidoglikan; lipoteikoik asitler; mantar; viral glikoproteinler	MyD88/MAL	hücre yüzeyi
TLR3	çift zincirli RNA	TRIF	hücre kompartımanı
TLR4	lipopolisakkarid; viral glikoproteinler	MyD88/MAL/TRIF/TRAM	hücre yüzeyi
TLR5	flagellin	MyD88	hücre yüzeyi
TLR6	diaçil lipoproteinler	MyD88/MAL	hücre yüzeyi
TLR7	küçük sentetik birleşimler; çift zincirli RNA	MyD88	hücre kompartımanı
TLR8	küçük sentetik birleşimler; tek zincirli RNA	MyD88	hücre kompartımanı
TLR9	metillenmemiş CpG DNA	MyD88	hücre kompartımanı
TLR10	bilinmiyor	bilinmiyor	hücre yüzeyi
TLR11	profilin	MyD88	hücre yüzeyi
TLR12	bilinmiyor	bilinmiyor	?
TLR13	bilinmiyor	bilinmiyor	?

2.7.3.3 Toll benzeri reseptör sinyal yolu

Toll benzeri reseptör sinyal yolu; MyD88 bagımlı sinyal yolu ve MyD88 bagımsız sinyal yolu olmak üzere iki yoldan olusmaktadır. MyD88 bagımlı sinyal yolunda; MyD88 önemli rol oynayıp bu molekül TLR'nin sitoplazmik kuyruguyla birlesir ve uç bölgesi IRAK-1 (IL-1R iliskili kinaz) ile homofilik etkilesimde bulunarak bu molekülü reseptöre baglar (Bonizzi ve Karin 2004; Muzio vd. 2000). MyD88 bagımsız/TRIF bagımlı sinyal yol, IFN β'yı indüklemek için TLR3 ve TLR4 aracılı sinyal yollarını kullanır. Yapılan çalısmalarda üçüncü bir TIR domain içeren adaptör (TRIF) bulunmustur. Bu adaptör, TLR3 ve TLR4 ile etkilesimde bulunarak IRF3 (IFN regulatory faktör 3)'ü aktive eder ve IFN-β'nın ekspresyonunu gerçeklestirir (Takeda ve Akira 2005; Underhill ve Ozinsky 2002).

2.7.3.4 Toll bezeri reseptörlerin immün yanıta etkileri

TLR'ler, mikrobiyal ürünlerin primer sensörleri gibi davranır, immün ve inflamatuvar genlerin sentezini baslatacak mekanizmaları devreye sokarak T ve B lenfositlerden olusan adaptif immun yanıtı baslatırlar. TLR, liganda bağlanınca aktive olur ve intraselüler kısmı aracılığı ile nüklear faktör- kapa beta (NF-κB) ve mitojenle aktive edilen protein kinaz ailelerini uyarır. NF-κB; TNF-α, IL-1, IL-6 ve IL-8 gibi sitokin ve proinflamatuvar ürünlerin genlerini aktive eder. Bu süreç konagın dogal immun cevabıdır (Tizard 2004, Chen vd.2005, Tosi 2005). Pattern tanıyıcı reseptörleri ile patojendeki "patojen iliskili moleküler patternleri tanıyan, PAMP" dendritik hücreler, olgunlasırlar ve periferden lenf yumrularına tasınarak T hücrelere antijen sunarlar. Böylece T ve B hücrelerin aktivasyon sürecinde rol alırlar. TLR, dendritik hücrelerin T hücrelerini daha etkin bir sekilde uyarmasını saglayan ko-stimulan moleküllerin de seviyelerini artırır, koruyucu hücre ürünlerinin (TNF α, IL-1, IL-6, IL-12, IL-18) üretimini ve salınmasını düzenler. TLR ile uyarılan dendritik hücreler, IL-12 ile IL-18 salgılar ve Th1 (yardımcı T hücre) hücrelerin gelismesini saglar. IL-10 ve IL- 4 fazla salındıgında ise Th2 immun yanıtı gelisir. B hücreleri uyarılır ve antikor sentezi baslar (Mclnturff vd. 2005).

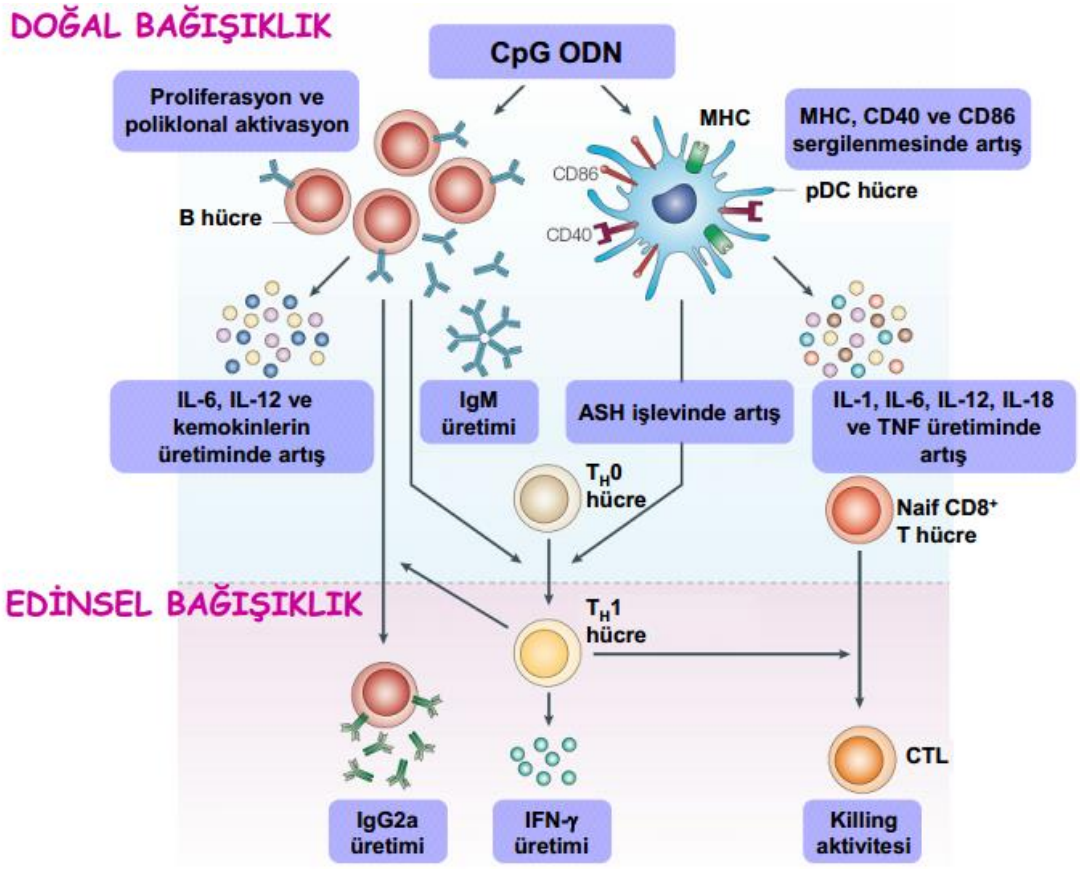
TLR iliskili NF-κB'nin aktivasyonu ile salınan enzimler, sitokinler ve mediyatörler konagın antimikrobiyal savunmasını uyarır ve inflamatuvar olayları tetiklerler. Bu süreç patojenin ortadan kaldırılmasını saglar. Inflamatuvar reaksiyon sınırlandırılamazsa, konak hücrelerinin harabiyetine neden olabilir. TLR aktivasyonu, patojenlerin konak hücrelerinin fagositozu için gereklidir. TLR, patojenlerin fagositozunu uyarır, fagozom içerigine karsı gelisen inflamatuvar yanıtı güçlendirir ve fagozomun olgunlasmasına yardımcı olur. Böylelikle fagosite edilmis bakterinin öldürülmesi kolaylasır.

2.7.4 TLR Ligandlarının Terapötik Potansiyelleri (TLR 9)

2.7.4.1 CpG ODNs

TLR 9 çoğunlukla bakteriyal DNA da bulunanan ancak memeli DNA'sında nadiren görülen metillenmemiş CpG motiflerini tanımaktadır (Krieg vd. 1995). Bakteriyel DNA'nın dublikasyon yeteneği ile metillenmemiş CpG motiflerini bulunduran sentetik oligodeoksinükleotitler (ODN) TLR 9 reseptörleri tarafından doğal bağışıklık sistemini uyarmaktadır (Şekil 2.6).

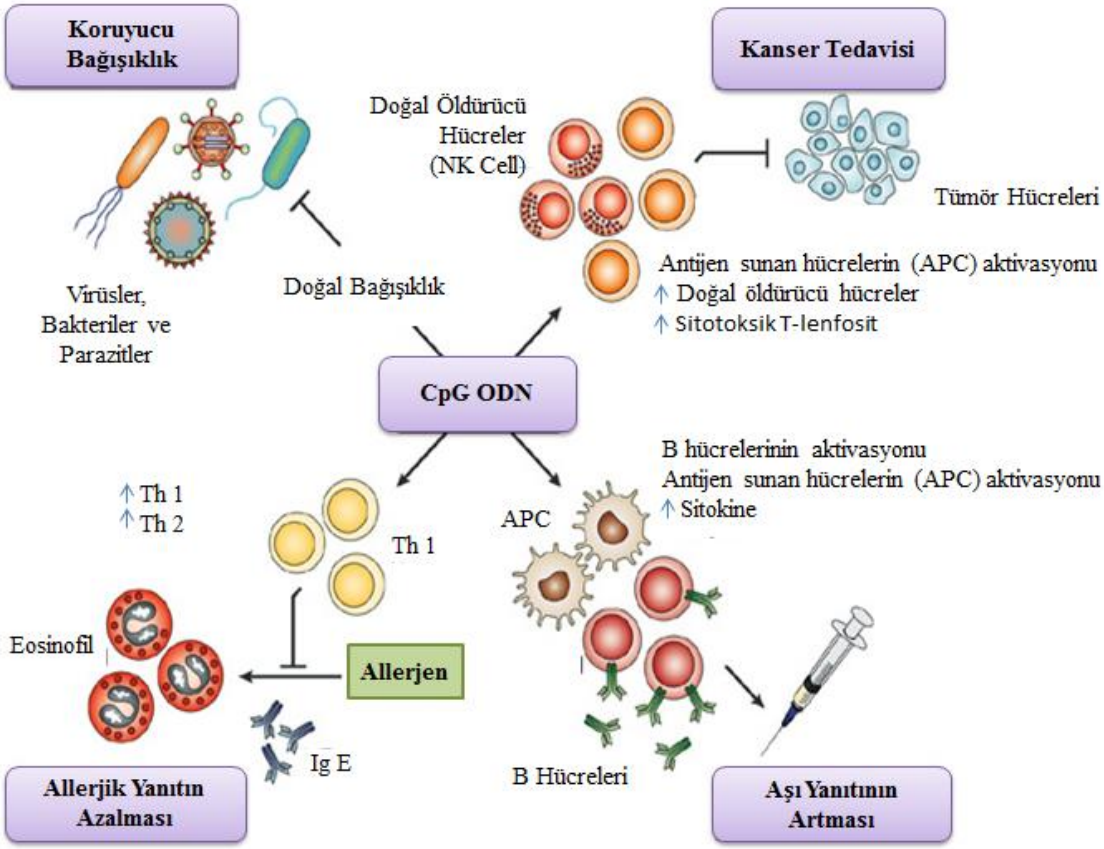
CpG-ODN'ler dentirik hücreleri ve B hücrelerini direkt olarak aktive etmekte ve NK hücreleri ve T hücrelerini de indirekt olarak etkileyerek sitokin, kemokin salgılanmasını ve Th1 tipi immun yanıtın oluşmasını sağlamaktalardır (Hanagata 2012). Ayrıca sentetik CpG ODN'ler enfeksiyon hastalıkları, kanser terapileri ve alerji başta olamak üzere bir çok klinik çalışmada immun sistemi koruyucu ajanlar ve aşı adjuvanları olarak kullanılmaktadır (Şekil 2.7) (Li vd. 2011).



Şekil 2.6 CpG ODN'lerin bağışıklık sistemi üzerine etkisi

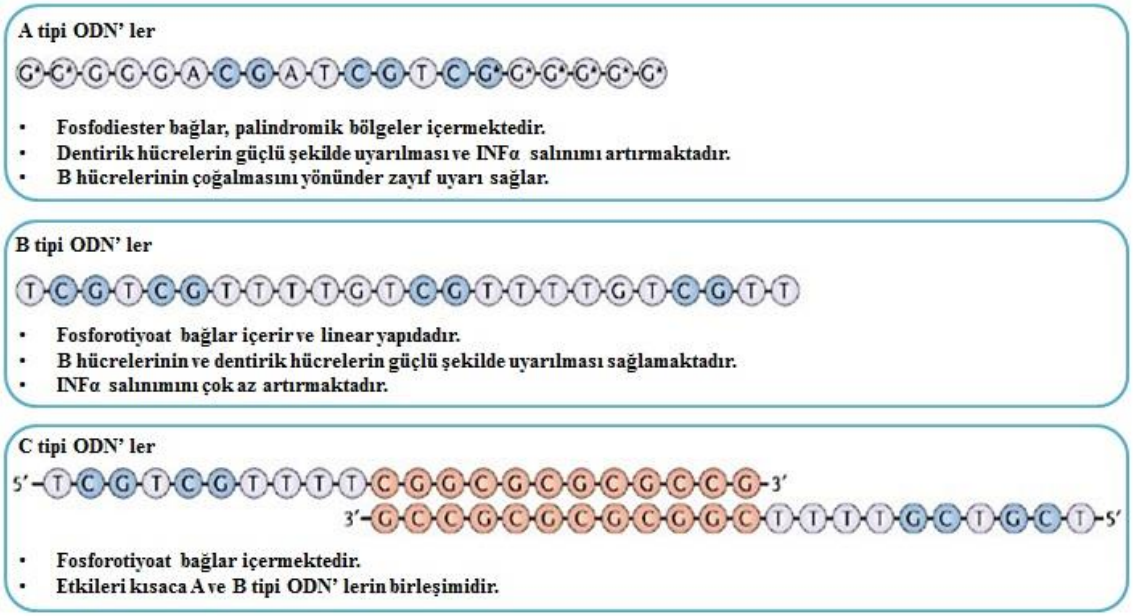
CpG ODN'lerin immün sistemi üzerindeki uyarıcı ektilerinin CpG motiflerinin sayısına, uzunluğuna ve ikincil, üçüncül yapılarına bağlı olduğu gösterilmiştir (Kreig 2006).

Modifikasyona uğramamış ODN'lerin fosfodiester yapıları serumda bulunan nükleazların saldırılarına açık durumdalardır; fosforotiyoat modfikasyonların ODN'lerin dayanılılıklarını artırdığı gösterilmiştir (Heeg vd. 2008). İmmün uyarının oluşabilmesi için gerekli olan minimum ODN uzunluğu 8 bp olmalıdır. CpG motiflerindeki sitozin metillenmesi motifin GpC ye dönüşmesine yol açmaktadır. Bu durum immün uyarının azalmasına sebep olamaktadır (Wagner 2008). CpG motiflerinin yanında bulunan sekanslar ODN'lerin immün sistem üzerindeki etkilerinde önemli rol oynamaktadır. Farelerde optimum uyarıcı sekans PuPuCpGPyPy iken insanlarda PuPyCpGPuPy (Pu: purine; Py: pyrimidine) olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (Krieg vd. 1995, Verthelyi vd. 2001).



Şekil 2.7 CpG ODN'lerin terapötik potansiyelleri

Bugüne kadar immun sistem üzerinde uyarıcı ektiye sahip dört farklı tip sentetik CpG ODN olduğu belirlenmiştir bunları i) A (D) tipi CpG ODN, ii) B (K) tipi CpG ODN, iii) C CpG ODN ve iv) P tipi CpG ODN olarak sıranlaktadır (Vollmer 2006). Bu tiplere ait özellikler şekil 2.8'de gösterilmiştir.



Şekil 2.8 CpG ODN tipleri

2.7.4.1.1 A (D) tipi CpG ODN'ler

Aynı zamanda D tipi olarak da bilinen A tipi ODN'lerin fosfodiester/ fosforotiyoat bağları karışık olarak bulunmakta ve 5' ve 3' uçlarında guaninler yeralmaktadır. CpG motifleri bu guaninlerin arasında palindromik bölgelerde yer almaktadır (Endres vd. 2001; Vollmer ve Krieg 2009). Aktif bir D ODN'nin minimum uzunluğu 18 bp olmalıdır (Verthelyi 2001). Bu palindromik sekans dubleks forma neden olmakta ve uçlarda kalan guaninler ise Hoogsteen guanin kuyrukların oluşmasını sağlamaktadır. Bu yapısal form ODN yapısının daha stabil olmasını sağlamakta ve, ODN'nin etkinliğini artırmaktadır. Bu ODN tipinin en önemli özelliklerinden biri ise dentritik hücrelerden IFN α salınımını artırmaktır (Gursel ve Gursel 2006).

Ayrıca bu yapı indirekt olarak IFN-ɣ ve IP-10 salınımının artmasına neden olmakla birlikte ve NK hücrelerinin sitokin aktivilerini artırmaktadır (Vollmer vd. 2009). Bununla beraber dentritik ve B hücrelerinden CD80, CD86 ve HLA-DR ekspresyonunu sağlamaktadır (Krug vd. 2001).

Kısaca D-ODN'ler immün yanıtın oluşamasında önemli rol oynayan Th-1 hücrelerinin uyarılmasına sebep olmaktadır. Ancak tahmin edilemeyen yapısal formları farmasötik ürün elde edilmesinde sorunlara yol açmaktadır (Wang vd. 2008).

2.7.4.1.2 B (K) tipi CpD ODN'ler

Aynı zamanda K tipi olarak da bilinen B tipi ODN'ler tamamı fosforotiyoat bağlarından oluşan CpG motiflerini içermektedir (Hartmann vd. 2003; Vollmer vd. 2004). D-ODN'lerden farklı olarak K-ODN'ler linear yapılarında poli-G kuyruk bulundurmamaktadır (Costa vd. 2004; Verthelyi vd. 2001). K-ODN'ler B hücreleri güçlü bir şekilde uyarıcı etkiye sahiptir (Gursel vd. 2002).

Ayrıca IL-6 ve IgM salınımını ve yaygınlaşmasını sağlamaktadır (Jung vd. 2002). Dentritik hücrelerin olgunlaşmasını sağladıkları gibi bu hücrelerde inflamasyon öncesi sitokin salınımını da tetiklemektedir. (Gursel vd.2002; Gursel ve Gursel 2006; Marshall vd. 2003). D-ODN'lerin aksine bu hücrelerden IFNα üretimini sağlayamazlar ancak TNFα üretimi harekete geçirebilmektelerdir (Gray vd. 2007; Gursel ve Gursel 2006).

2.7.4.1.3 C tipi CpD ODN'ler

C ODN'ler A ve B tiplerinin bir karışımı gibidir. B ODN'ler gibi B hücrelerinin uyarılmasına ve A ODN'ler gibi az miktarda da olsa IFNα salınımına sebep olmaktalardır (Jurk vd. 2004), 5' ucunda CpG motifleri ve 3' ucunda 12-16 bp uzunluğunda palindromik bir bölge bulundurmaktadır (Vollmer vd. 2004). G ve C'lerce zengin palindromik bölge T'lerden oluşan bir köprü ile 5' ucunda yer alan CpG motifine bağlanmış durumdadır. İki domain arasındaki bu bağlantı immün aktivasyon için çok önemlidir (Hartmann vd. 2003; Vollmer vd. 2004). Aynı zamanda bu bölge D ODN'lerinde yaşanan üretim sorununu ortadan kaldırmakta ve C ODN'lerin klinik çalışmalarda kullanımını sağlamaktadır. Öte yandan C ODN'ler IFNα salınımnı D-ODN'ler kadar artıramamaktadır

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteri kültürleri ve gelişme koşulları

Çalışmada probiyotik kriterler taşıdığı daha önceki çalışmalar neticesinde belirlenen insan kaynaklı *Pediococcus, Enterococcus, Lactobacillus* cinsine ait üç farklı Laktik Asit Bakteri (LAB) suşu kullanılmıştır. *Pediococcus pentosaceus* OZF pediyosin AcH/PA-1 üreticisi olup anne sütünden izole edilmiştir. Enterocin A üreticisi olan *Enterococcus faecium* OZ1 anne sütü ile beslenen bebek feçesinden, *Lactobacillus brevis* OZ1 ise sağlıklı bayan vajinal sekresyonundan izole edilmiştir.

Pediococcus, Enterococcus, Lactobacillus cinsine ait suşlar, de Man Rogosa Sharpe (MRS; Merck, Darmstadt, Germany) besiyerinde 37°C'de geliştirilmiştir. Çalışmanın diğer aşamalarında kullanılan besiyeri ve besiyerlerine ait kimyasal bileşenler ise EK 1'de belirtilmiştir.

3.1.2 Bakteri kültürlerinin saklanması

Kültürler 18 saat MRS sıvı besiyerinde geliştirildikten sonra, 10000 rpm'de 75 saniye santrifüj edilmiş ve elde edilen hücreler 1 mL steril serum fizyolojik (SF; % 0.85 NaCl) ile yıkanarak % 50'lik gliserol çözeltisinde -80°C'de saklanmıştır (Todorov vd. 1999).

3.1.3 Çözelti ve malzemelerin sterilizasyonu

Çalışma süresince kullanılan tüm cam malzemelerin sterilizasyonu için pastör fırını (185°C'de 1 saat); tampon, çözelti ve besiyerlerinin sterilizasyonu için ise otoklav kullanılmıştır (121°C'de 15 dakika).

3.1.4 ELİZA çalışmalarında kullanılan reaktifler

ELİZA için kullanılan sitokin ve rekombinant proteinler Biolegend (USA), IgG ELİZA için kullanılan alkalin fosfataz (AP) ile konjuge edilmiş monoklonal antikorlar Southern Biotech (USA)'den temin edilmiş olup reaktiflerin konsantrasyonları, markaları ve tipleri Çizelge 3.1'de belirtilmiştir. Ovalbumin (OVA), Pierce (USA) firmasından temin edilmiştir.

Çizelge 3.1 ELİZA çalışmalarında kullanılan antikor ve reaktifler

Ürün ismi	**Marka**	**Konsantrasyon**
Anti-Mouse IL-6 MAb	Biolegend	10 µg/ml
Mouse IL-6 Biyotinli MAb	Biolegend	1:1000
Mouse rekombinant IL-6	Biolegend	2000 ng/ml
Mouse IL-12/IL-23 p40 DuoSet	R&D	Capture Ab: 4 µg/ml Rekombinant Ab: 400 pg/ml Tespit Ab: 2000 ng/ml
Immunopure Stretavidin alkalin fosfataz	Biolegend	1:3000
PNPP (p-Nitrophenyl Phosphate, Disodium Salt) substrat	Thermo	5 mg PNPP tablet 4 ml ddH_2O içerisinide çözülmüş ve, 1ml diethanolamine tampon ile karıştırılmıştır.

3.1.5 Hücre kültür ortamı bileşenleri

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan besiyeri ve farklı tampon içerikleri EK 2'de belirtilmiştir.

3.1.6 Çalışmada kullanılan TLR ligandları ve ODN'ler

Sitimülasyon (uyarılma) çalışmalarında TLR ligandları olarak, *Bacillus subtilis* suşundan izole edilmiş olan peptidoglikan (PGN, SigmaChem. Co., USA) ve *Escherichia coli'*den izole edilmiş olan lipopolisakkarit (LPS, SigmaChem. Co., USA) kullanılmıştır. çizelge 3.2'de dizileri belirtilen oligodeoksinükleotitler (ODN) AlphaDNA (Canada) tarafından sentezlenmiştir.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan oligodeoksinükleotitlerin dizisi

CpG-ODN adı	**Dizi**
K23 (12 mer)	TCGAGCGTTCTC
D35 (20 mer)	GGtgcatcgatgcaggggGG

3.2 Yöntem

3.2.1 Bakterileri stok kültürlerinin aktifleştirilmesi

-80°C'de muhafaza edilen bakteri stok kültürleri, MRS sıvı besiyerinde iki kez pasajlanarak aktifleştirilmiştir. MRS besiyerinde 37°C'de 18 saat inkübasyonu takiben, belirtilen aktif kültürler ekzopolisakkarit üretimlerinin belirlenebilmesi amacıyla TGE (tripton, glukoz maya özütü) besiyerinde geliştirimişlerdir.

3.2.2 Ekzopolisakkarit ekstraksiyonu

Hücre dışına salgılan (Eps-r/release eps) ve hücre yüzeyine bağlı (Eps-b/cell bound eps) olarak bulunan ekzopolisakkaritlerin ekstraksiyonu için farklı basamaklar kullanılmıştır. Hücre dışına salgılanan ve süpernatantta serbest halde bulunan ekzopolisakkaritlerin tespiti için kullanılan temel basamaklar aşağıdaki gibi olup ayrıntılı bilgiler bölüm 3.2.5.1'de belirtilmiştir.

- *Pediococcus pentosaceus* OZF, *Enterococcus faecium* OZ1, *Lactobacillus brevis* OZ1 suşları TGE besiyerlerine % 1 oranında inoküle edilmişlerdir. 37°C'de 18 saat inkübasyonun ardından 100°C'de 10-15 dakika kaynatılmış ve oda sıcaklığına gelmeleri beklenmiştir. Isıtma neticesinde hücreler öldürülmüş ve enzim aktivitesi engellenmiştir.
- Santrifüj (15.000rpm 15 dakika) ve filtrasyon işlemi neticesinde hücreler ortamdan uzaklaştırılmıştır.
- Kimyasal deproteinizasyon gerçekleştirilmiştir.
- Süpernatanta çöktürme ajanları eklenerek polimer presipite edilmiştir.
- Çöktürülmüş polimerler dondurularak kurutulmuştur.

Hücre yüzeyine bağlı EPS ekstraksiyonu, Tallon ve ark.(2003) tarafından kullanılan yöntem temel alınarak gerçekleştirilmiştir. TGE besiyerlerinde 37°C'de 18 saat geliştirilen 10 ml kültür, 4°C'de 15.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen pellet 5 ml steril fizyolojik solüsyon (% 0.85 NaCl) ile yıkanmış ve 5 ml 1 M NaCI ile çözülerek, hücre yüzeyinde bağlı bulunan EPS'yi ayırmak için 4°C'de 40W'da 3 dk sonikasyon işlemine tabii tutulmuştur. 4°C'de 6000 rpm'de 30 dakika santrifüjün ardından supernatant alınmış ve üzerine iki katı hacimde soğuk, saf alkol eklenerek 4°C'de bir gece bekletilmiştir. 4°C'de 6000 rpm'de 30dk santrifüjün ardından e elde edilen Eps-b 2ml ddH_2O'da çözülmüştür. Liyofilize edilen örnekler çalışmanın diğer aşamalarında kullanılana kadar 4°C'de saklanmıştır.

3.2.3 Ekzopolisakkarit miktarının kantitatif tayini

Ekstraksiyon neticesinde elde edilen EPS'lerin kantitatif tayini, fenol sülfirik asit yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Dubois vd. 1956). Örneklerin üzerine 0.5 mL fenol, 5 mL %96'lık sülfürik asit ilave edilmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında ardından 20 dakika 25-30°C'de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometrede 490nm dalga boyunda optik yoğunluk belirlenmiş ve sonuçlar glukoz standart eğrisine göre belirlenmiştir (Marshall ve Rawson 1999). Çalışmada üç bağımsız deneme gerçekleştirilmiştir.

3.2.4 Glukoz standartının hazırlanması

Ekzopolisakkarit miktarının kantitatif tayini, standart eğri kullanılarak, mg/L olarak hesaplanmıştır. Standart 1 mL steril saf suda çözülerek hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki glukoz esas alınarak, fenol sülfirik asit yöntemi ile oluşturulmuştur. Çalışmada üç bağımsız deneme gerçekleştirilmiştir.

3.2.5 Maksimum ekzopolisakkarit üretiminde etkili parametrelerin belirlenmesi

Pediococcus pentosaceus OZF, *Enterococcus faecium* OZ1, *Lactobacillus brevis* OZ1 suşlarında maksimum ekzopolisakkarit üretiminde etkili parametrelerin belirlenmesi amacıyla öncelikle farklı yöntemlerin ve kimyasalların EPS ekstraksiyonu üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Bu yöntemler neticesinde maksimum üretim potansiyeline sahip olduğu belirlenen suş diğer parametrelerin değerlendirildiği çalışmalara dahil edilmiştir.

3.2.5.1 Farklı yöntem ve kimyasalların ekzopolisakkarit ekstraksiyonu üzerine etkisi

Ekzopolisakkaritlerin ekstraksiyonu, suşların 37°C'de 18 saat inkübasyonunu takiben 5 farklı yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Yöntem 1: Kullanılan bu yöntem 2011 yılında Huang ve ark. tarafından patentlenmiş olan çalışma esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Suşların 37°C'de 18 saat inkübasyonunu takiben, 5 ml kültür üzerine eşit hacimde % 20'lik trikloroasetik asit (TCA) eklenmiş ve ardından 200 rpm'de 2 saat boyunca çalkalanmıştır. 3000 rpm'de 20dk santrifüj işlemini takiben elde edilen süpernatanta iki katı hacimde % 95'lik EtOH eklenerek °C'de bir gece bekletilmiştir. 3000rpm'de 20dk santrifüj işlemini takiben süpernatant uzaklaştırımış ve pellet yıkanmış ve EtOH presipitasyonu tekrar edilmiştir. İnkübasyon neticesinde elde edilen pellet 1 ml ddH_2O'da çözünmüş ve miktar tayinine kadar 4°C'de bekletilmiştir.

Yöntem 2: Kullanılan bu yöntem 2003 yılında Tallon ve ark. tarafından yapılan çalışmalar referans alınarak gerçekleştirilmiştir. Suşların 37°C'de 18 saat inkübasyonunu takiben, 10 ml kültür 100˚C'de 15dk kaynatılmış ve 15.000 rpm'de 15 dk santrifüjün ardından elde edilen süpernatanta son konsantrasyon % 20 olacak şekilde TCA eklenmiştir. 2 saat 4°C'de çalkalamanın ardından, 4°C'de 25.000 rpm'de 20 dk santrifüj işlemi gerçekleştirilmiş ve süpernantant iki katı hacimde % 95'lik EtOH ilavesini takiben 4°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon neticesinde 4°C'de 6000 rpm'de 30 dk santrifüjün ardından pellet 2 ml ddH_2O'da çözünmüş ve miktar tayinine kadar 4°C'de bekletilmiştir.

Yöntem 3: Kullanılan bu yöntem 2003 yılında Rimada ve Abraham tarafından yapılan çalışmalar referans alınarak gerçekleştirilmiştir. Suşların 37°C'de 18 saat inkübasyonunu takiben gelişmiş kültürden 1 mL alınmış ve 100°C'de 10 dk kaynatılırak ve oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. Örnek üzerine 250µL %85'lik TCA'dan eklenerek 14.000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant başka bir mikrofüj tüpüne aktarılmış ve üzerine eşit hacimde EtOH ilave edilmiştir. 14.000 rpm'de 20 dk santrifüj neticesinde süpernatant uzaklaştırılmış ve pellete ikinci EtOH (4°C) presipitasyonu uygulanmıştır. Tekrar 14.000rpm'de 20 dk santrifüj ardından süpernatant uzaklaştırılıp, alkol uçurulmuştur. Pelletler 1ml ddH_2O'da çözünmüş ve miktar tayinine kadar 4°C'de bekletilmiştir.

Yöntem 4: Kullanılan bu yöntem 2000 yılında Frengova ve ark. tarafından yapılan çalışmalar referans alınarak gerçekleştirilmiştir. Suşların 37˚C'de 18 saat inkübasyonunu takiben gelişmiş kültürden 1 mL alınmış 100°C'de 10 dk kaynatılırak ve oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. 20°C'de 10.000 rpm'de 15dk, santrifüj işlemi ardından süpernatant alınmış ve üzerine iki katı hacimde soğuk EtOH ilave edilmiştir. -20°C'de 24 saat inkübasyonu takiben 10.000 rpm'de 15dk, 4°C'de santrifüj işlemi tekrar edilmiş süpernatant uzaklaştırılıp, alkol uçurulmuştur. Pelletler 1ml ddH_2O'da çözünmüş ve miktar tayinine kadar 4°C'de bekletilmiştir.

Yöntem 5: Kullanılan bu EPS ekstraksiyon yöntemi 1997 yılında Lemoine ve ark. tarafından yapılan çalışmaları referans alınarak gerçekleştirilmiştir. Suşların 37°C'de 18

saat inkübasyonunu takiben gelişmiş kültürden 1 mL alınmış 100°C'de 10 dk kaynatılırak ve oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. 20°C'de 10.000 rpm'de 15 dk, santrifüj işlemini takiben süpernatant alınmış ve eşit hacimde %80'lik TCA ilave edilmiştir. 4°C'de 24 saat inübasyonu takiben 4°C'de 10.000 g, 20 dk, santrifüj edilmiştir. Aynı oranda aseton elde edilen süpernatanta EPS'leri çöktürmek amacıyla eklenmiş ve 4°C'de 10.000 rpm'de 20dk, santrifüj işlemi ardından elde edilen pellet 1mL ddH_2O'da çözünmüş ve miktar tayinine kadar 4°C'de bekletilmiştir.

3.2.5.2 Farklı karbon kaynaklarının ekzopolisakkarit üretimi üzerine etkisi

Daha önce kullanılan yöntemler neticesinde en fazla EPS üretim miktarına sahip olduğu belirlenen *P.pentosaceus* OZF suşu çalışmanın ilerleyen bölümlerinde kullanımak üzere seçilmiştir. Bu bölümde farklı karbon kaynaklarının *P. pentosaceus* OZF suşu tarafından üretilen EPS üzerine etkisi belirlenmiştir. Bu amaçla, glukoz içermeyen TGE besiyeri % 1 oranlarında fruktoz, sükroz ve laktoz kullanılarak hazırlanmıştır. Belirtilen karbon kaynaklarını içeren besiyerlerinde 37°C'de 18 saat geliştirilen kültürlerden EPS ekstraksiyonu yöntem 2 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Miktar tayininin ardından, çalışmanın devamında kullanılmak üzere en uygun karbon kaynağı seçilmiştir.

3.2.5.3 Farklı inkübasyon sıcaklığının ekzopolisakkarit üretimi üzerine etkisi

Pediococcus pentosaceus OZF suşu, en yüksek EPS üretiminin tespit edildği karbon kaynağını içeren besiyerinde; 24, 34, 37 ve 42°C' de geliştirilmiş ve EPS ekstraksiyonu yöntem 2 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Miktar tayininin ardından, çalışmanın devamında kullanılmak üzere en uygun inkübasyon sıcaklığı seçilmiştir.

3.2.5.4 Farklı inkübasyon sürelerinin ekzopolisakkarit üretimi üzerine etkisi

Pediococcus pentosaceus OZF suşu, en yüksek EPS üretiminin tespit edildği karbon kaynağını içeren besiyerinde uygun sıcaklıkta 12, 18, 24, 36, 48 ve 72 saat inkübe edilmiş ve EPS ekstraksiyonu yöntem 2 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Miktar

tayininin ardından, çalışmanın devamında kullanılmak üzere en uygun inkübasyon süresi seçilmiştir.

3.2.6 *Pediococcus pentosaceus* OZF suşu tarafından üretilen ekzopolisakkaritin immunomodülatör etkisinin *in vitro* koşullarda belirlenmesi

Çalışmamızın bu bölümü Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Biyoterapötik ODN Laboratuvar'ında Doç. Dr. İhsan Gürsel danışmanlığında gerçekleştirilmiştir.

Pediococcus pentosaceus OZF suşundan elde edilen EPS'nin (eps-R ve eps-B) immunomodülatör etkisinin *in vitro* koşullarda belirlenebilmesi amacıyla BALB/C farelerinden alınan dalak hücreleri kullanılmıştır. Belirlenen sitokinlerin konsantrasyonları ELİZA kullanılarak tespit edilmiştir.

3.2.6.1 Sitimülasyon çalışmalarında kullanılan komplekslerin hazırlanması

Pediococcus pentosaceus OZF suşundan elde edilen EPS'nin (Eps-r ve Eps-b) CpG-ODN K23 (12-mer) ve CpG-ODN D35 (20-mer) ile kompleksleri değişen oranlarda (1:1, 1:2, 1:4, 1:8) ve konsantrasyonlarda (3M, 0,3M, 0,1M) hazırlanmıştır. Kompleksler bir gece 4°C'de inkübe edilmiş ve stimülasyon çalışmalarına dahil edilmiştir.

3.2.6.2 Hücre kültürü çalışmaları

3.2.6.2.1 Dalak hücre süspansiyonunun hazırlanması

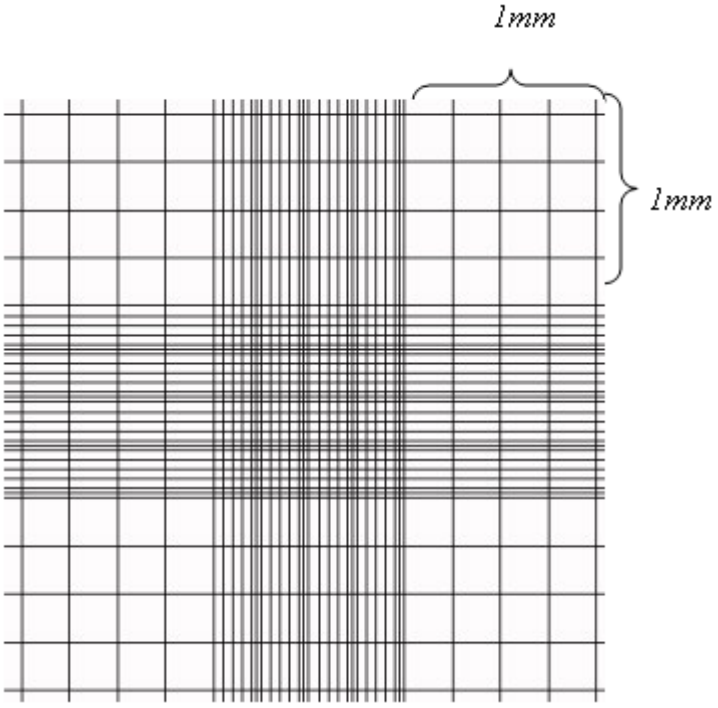
Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere dişi BALB/c farelerden aseptik koşullarda petri içine alınan dalak hücreleri % 2 regular RPMI besiyeri kullanılarak steril gereçlerin yardımıyla dairesel hareketlerle ezilerek homojenize edilmiştir. Homojenizasyonun ardından hücreleri içeren besiyeri oda ısısında 1500 rpm 5 dk santrifüj edilerek partiküllerinden uzaklaştırılmıştır. Hücreler ikinci kez 1500 rpm 5 dk

santrifüj edilerek aynı besiyerinin kullanımıyla yıkanmış ve yıkama ardından doku artıkları uzaklaştırılmış ve % 5 oligo RPMI 1640 besiyerinde çözülmüştür.

3.2.6.2.2 Hücre sayımı

Hücreler 1ml 5% regular RPMI-1640 besiyerlerinde çözüldükten 1/10 oranında seyreltilmiştir. Bu amaçla 10µl hücre süspansiyonu 90µl besiyeri ile tamanlanmıştır. Bu seyreltilmiş hücre süspansiyonundan 10µl alınarak Thoma lamına (Neubaer cell counting) yerleştirilmiştir. Işık mikroskobunda lamın 4 köşesinde bunulan ve $1mm^2$ alanındaki 16 küçük karedeki (Şekil 3.1) hücreler sayılmış ve ml'de bulunan hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. Bu formülde, lam ve lamel arasında 0.1 mm bulunduğundan dolayı her $1mm^2$'lik alanın hacmi 0.1 mm^3 olarak değerlendirilmiştir.

$$\left\{\frac{\text{4 büyük karedeki toplam hücre sayısı}}{4}\right\} = \text{X 10 (seyreltme faktörü) X } 10^4 = \text{hücre sayısı/ml}$$



Şekil 3.1. Thoma lamının genel görüntüsü

Hücre sayımı Accuri™ C6 flow cytometer cihazı kullanılarak da doğrulanmıştır. Hücreler 1ml 5% regular RPMI-1640 besiyerinde çözülmüştür. Z1 küvetine konulan 10ml izotonik II seyreltme çözeltisine 20µl hücre süspansiyonundan eklenerek ilk seyreltme gerçekleştirilmiştir. Küvet doğrudan cihaza yerleştirilmiş ve toplam hacimden 10µl okuma yapılarak ikinci seyreltme gerçekleştirilmiştir. Canlı hücreler belirlenirken apoptotik hücreler ve hücre kümeleri göz ardı edilmiştir. Ana hücre süspansiyonundaki toplam hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

Sayılan hücre sayısı X 500 (seyreltme 1) X 100 (seyreltme 2) = toplam hücre sayısı/ml

3.2.6.3 Hücrelerin sitimülasyonu

Sitimülasyon çalışmalarında daha önce belirtilen şekilde hazırlanan EPS-CpG kompleksleri kullanılmıştır. Sitimülanlar her uygulama için üç tekrar olmak üzere kullanılmış ve çalışma farklı zamanlarda en az iki kere tekrar edilmiştir. 96 kuyucuklu mikro plakalarda gerçekleştirilen çalışmada her bir kuyuya 400.000 hücre/kuyu (100 µl/kuyu) olacak şekilde dalak hücreleri eklenmiştir. Sitimülanların ilavesini (50 µl/kuyu) takiben mikro plakalar %5 CO_2'li inkübatörde 37°C'de 24 saat inkübe edilmiş ve sitimülasyonu takiben toplanan süpernatantlar sitokin üretiminin tayini için ELİZA işlemine tabi tutulmuştur. Çalışmanın bu aşamasında pozitif kontrol olarak PGN ve LPS kullanılmıştır.

3.2.6.4 ELİZA (Sitokin)

Sitimülasyonun ardından sitokin miktarlarının (IL-6, IL-12 ve IFN-gama) tespiti ELİZA kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 96 kuyucuklu mikro plakalarda, 1500rpm'de 5 dk santrifüj işleminin ardından toplanan süpernatantlar yeni bir plakaya aktarılmış ve çalışmanın diğer aşamalarında kullanılana kadar -20°C' de saklanmıştır. ELİZA için kullanılan farklı kimyasallar, antikorların konsantrasyonları, markası ve özellikleri çizelge 3.1'de belirtilmiştir. Kısaca, 96 kuyulu mikro plakalar (Immulon 2HB, Thermo

Labsystems, USA) 1X PBS'de hazırlanan IL-6 (2µg /mL), IL-12 (4 µg /mL) ve IFN-γ (5 µg /mL) monoklonal anikorları (50 µL/kuyu) ile kaplanmış ve bir gece 4°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından antikorları içeren karışım dökülmüş ve plaka kuyularına 200 µL bloklama tamponu (% 5 Bovin serum albumin ve % 0.025 Tween 20 içeren 1XPBS) eklenerek 2 saat oda ısısında inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Yıkama işlemi yıkama tamponunda (500 mL 10XPBS, 2.5mLTween 20 ve 4.5 L dH2O) beş kez 5'er dakika aralıklarla gerçekleştirilmiş ve ardından suda yıkanan plakalar kurutulmuştur. Antikorlarla kaplanan plaka kuyularına her biri 3 paralel olacak şekilde 50 µL/kuyu süpernatant eklenmiş ve plakalar 4°C'de bir gece inkübe edilmiştir. Bu aşamada, standart olarak kullanılmak amacıyla her bir sitokine ait rekombinant protein; IL-6 için 1000 ng/mL (Thermo Scientific, USA), IL-12 (Pierce Endogen USA) için 500 ng/mL ve IFN-γ (BD Biosiences USA) için 1000 ng/mL olacak şekilde 1X PBS'de (pH7.4) hazırlanarak kuyulara eklenmiş ve seri seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonun ardından yukarıda anlatıldığı şekilde yıkama işlemi tekrarlanmış ve biyotinle işaretlenmiş ikincil antikorlar eklenerek oda ısısında 2 saat inkübe edilmiştir. Biotinlenmiş IL-6, IL-12 ve IFN-γ ikincil tespit antikorları T-hücre tamponunda (500 mL 1X PBS, 0.25 mL Tween 20 ve 25 mL % 5 FCS), 1:1000 seyreltme oranında hazırlanmıştır. İnkübasyonu takiben tekrar yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve T-hücre tamponunda 1:3000 seyreltme oranında hazırlanmış olan streptavidin alkalin fosfataz (SA-AKP; Thermo Scientific, USA) enzimi 50 µL/kuyu olacak şekilde kuyulara eklenerek oda ısısında 1 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Yıkamayı takiben, para-nitrofenil fosfat (PNPP; ThermoScientific, USA) 50 µL/kuyu olacak şekilde kuyulara eklenmiş ve enzimatik reaksiyon sonucunda sarı renk oluşumu takip edilerek optik yoğunluk otomatik olarak ELİZA okuyucusunda (Molecular Devices, SoftmaxPro Software, V5) 405nm'de, standart dörtlü parametre satürasyonuna gelene kadar okunmuştur. Her bir sitokinin miktarı ise rekombinant fare sitokinlerinin yukarıda belirtilen miktarlarını içeren standartların kullanımı neticesinde tespit edilmiştir

3.2.7 *Pediococcus pentosaceus* OZF suşu tarafından üretilen ekzopolisakkaritin immunomodülatör etkisinin *in vivo* koşullarda belirlenmesi

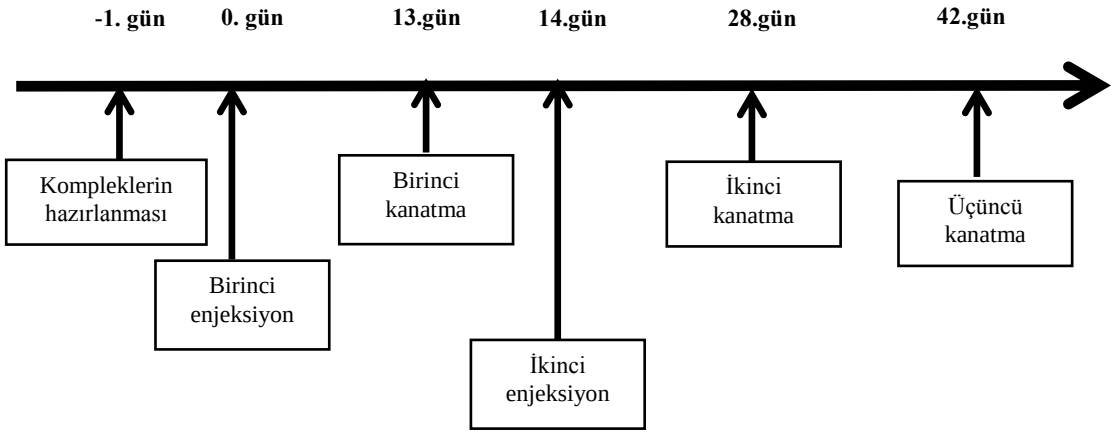
3.2.7.1 Hayvan bakımı

Pediococcus pentosaceus OZF suşu tarafından üretilen ekzopolisakkaritin (eps-B ve eps-R) immünomodülatör etkisinin belirlenebilmesi amacıyla kullanılan sağlıklı, altı-sekiz haftalık dişi BALB/c soyu fareler Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümündeki hayvan evinden temin edilmiş ve bu merkezde barındırılmıştır. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası ise EK 3'te sunulmuştur. Deney hayvanlarının barındırıldıkları odanın ısısı klima yardımı ile 22 ± 1°C olacak şekilde, nem oranı ise % 40-60 oranında sabit tutulmuştur. Odanın camları ışık geçirmeyecek şekilde olup aydınlık-karanlık döngüsü otomatik olarak denetleyici bir cihaz ile 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmıştır. Deney hayvanları için kullanılan yemler ise özel olarak deney hayvanları için üretilmekte olup deneklere herhangi bir kısıtlama olmadan verilmiştir. Su ihtiyaçları içinse yine herhangi bir kısıtlama olmadan çeşme suyu kullanılmıştır. Suluklar hepafiltreli özel kafes sistemlerinde kafese dışardan bağlanmıştır. Çalışmalar için gerekli olan etik kurul kararı Bilkent Üniversitesi (Bil-AEC) hayvan etik kurulu tarafından onaylanmıştır.

3.2.7.2 CpG-ODN/EPS ve OVA antijeni ile gerçekleştirilen immünizasyon protokolü

Çalışmanın bu aşamasında 6-8 haftalık yetişkin dişi BALB/C fareler kullanılarak 7 grup (5 adet/grup) oluşturulmuştur. Uygulama protokolü şekil 3.2'de şematize edildiği gibidir. Aşağıda detayları verilen her bir gruba, hazırlanan kompleksler (son konsantrasyon CpG ODN'ler için 15 µg/fare, EPS'ler için 60 µg/fare, OVA içinse 15 µg/fare olacak şekilde) iki kez intraperitoneal (i.p.) olarak (100 µl/fare) enjekte edilmiştir.

1) Grup 1: PBS (phosphate-buffered saline) enjekte edilen grup
2) Grup 2: OVA (ovalbumin) + K23 kompleksi enjekte edilen grup
3) Grup 3: OVA + D35 kompleksi enjekte edilen grup
4) Grup 4: OVA + K23 + eps-B kompleksi enjekte edilen grup
5) Grup 5: OVA + D35 + eps-B kompleksi enjekte edilen grup
6) Grup 6: OVA + K23 + eps-R kompleksi enjekte edilen grup
7) Grup 7: OVA + D35 + eps-R kompleksi enjekte edilen grup



Şekil 3.2. Ovalbumine karşı *in vivo* aşılama için kullanılan immünizasyon planı

Birinci enjeksiyonu takip eden 14. günde yukarıda belirtildiği şekilde enjeksiyon tekrarlanmıştır. Herbir enjeksiyonun bir gün öncesinde farelerin kuyruklarından yaklaşık 200 µl kan kanatma yöntemiyle alınmıştır. Her bir fareden alınan kan örnekleri 37°C'de 1,5 saat inkübasyona bırakılmış, pıhtıları alınmış ve geri kalan kısım 8000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen serumlar 96 kuyucuklu plakalara aktarılarak çalışmanın devamında kullanılmak üzere -20˚C'de saklanmıştır.

3.2.7.3 ELİZA

3.2.7.3.1 ELİZA (Sitokin)

ELİZA işlemi bölüm 3.2.6.3'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir.

3.2.7.3.2 IgG anti-OVA ELİZA

IgG ELİZA bazı farklılıklar dışında sitokin ELİZA ile oldukça benzerdir. Bu yöntem 2001 yılında Gürsel ve ark. tarafından yayınlanan bir çalışma referans alınarak gerçekleştirilmiştir. Immulon 1B 96 kuyucuklu plakalar (Thermo Labsystems, USA) kullanılmıştır. Tüm inkübasyon saatleri, yıkama ve bloklama aşamaları ELİZA yöntemi ile aynıdır. Her kuyucuk 50 µl'de 7,5 µg/ml olacak şekilde OVA (Pierce, USA) ile kaplanmıştır. İnkübasyonun ardından her bir farenin serum örnekleri plakaların ilk sırasına 1/7 titrasyon olacak şekilde aktarılmıştır (10 µl serum 60 µl 1XPBS ile seyreltme yapılarak). İlk sıra haricindeki bütün kuyucuklara 52 µl 1X PBS eklenmiş ve (toplam 7 seyreltme olacak şekilde) ilk sıradan dikey eksen üzerinde ilerleyerek 18 µl alınmış 4 kat seri seyreltme ile serumlar tüm kuyulara transfer edilmiştir. Fare IgG, IgG1 (Southern Biotech, USA) antikorları direk olarak AP'ye bağlandığından dolayı SA-AKP aşaması gerçekleştirilmemiştir. Çalışmanın bir gün öncesinde T-hücre tamponunda 1:3000 seyreltme oranında hazırlanmış olan AP bağlı IgG antikorları ile inkübasyonun ardından yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve PNPP ilavesini takiben enzimatik reaksiyon daha önce belirtildiği şekilde takip edilmiştir.

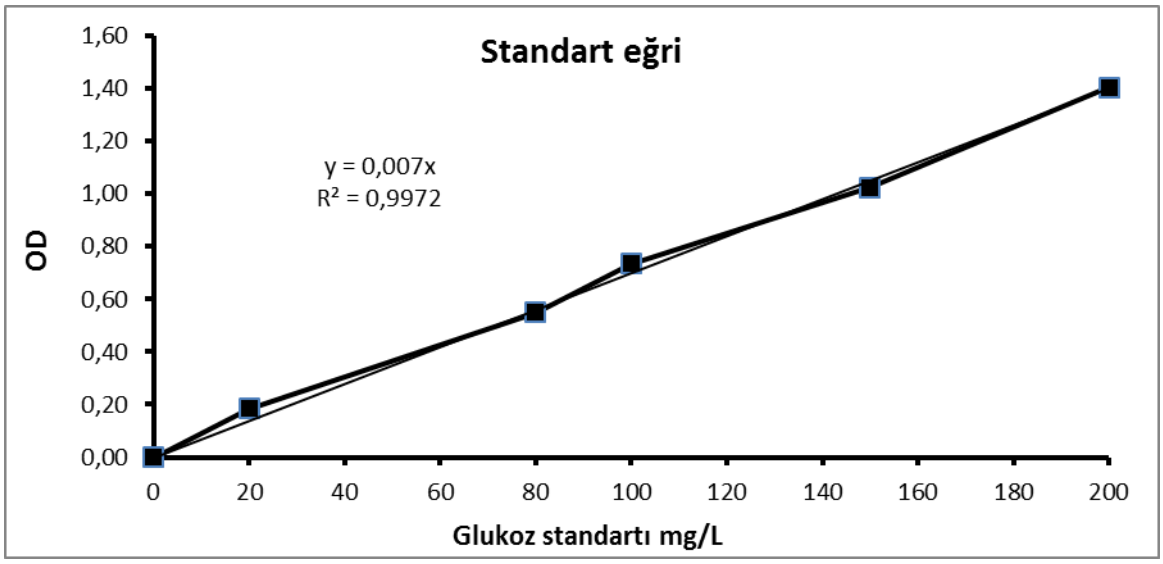
3.2.8 İstatiksel analizler

Çalışmanın her aşaması 3 tekrar gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizler için SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) istatistik analiz programı kullanılmıştır. Veriler varyansın tek yön analizi olan ANOVA, Tukey posthoc testi ve bağımsız t-testi (GraphPad Prism v.3.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) kullanılarak değerlendirilmiştir. Tüm istatistik analizlerinde $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Ekzopolisakkarit Ekstraksiyonu İçin Uygun Yöntemin Belirlenmesi

Ekzopolisakkarit ekstraksiyonu için uygun yöntemin seçilmesi EPS miktarının tayininden önceki en kritik adımlardan bir tanesidir. Bu nedenle insan kaynaklı 3 farklı laktik asit bakteri suşundan maksimum miktarda EPS eldesini sağlayan ekstraksiyon yöntemini tespit etmek amacıyla, farklı kimyasalların kullanıldığı 5 farklı yöntem uygulaması gerçekleştirilmiştir. Suşların EPS üretim miktarları kullanılan yönteme göre değişiklik göstermekle birlikte 120mg/L-1005mg/L arasında tespit edilmiştir. Hesaplamalarda kullanılan glukoz standart eğrisi şekil 4.1'de belirtilmiştir.

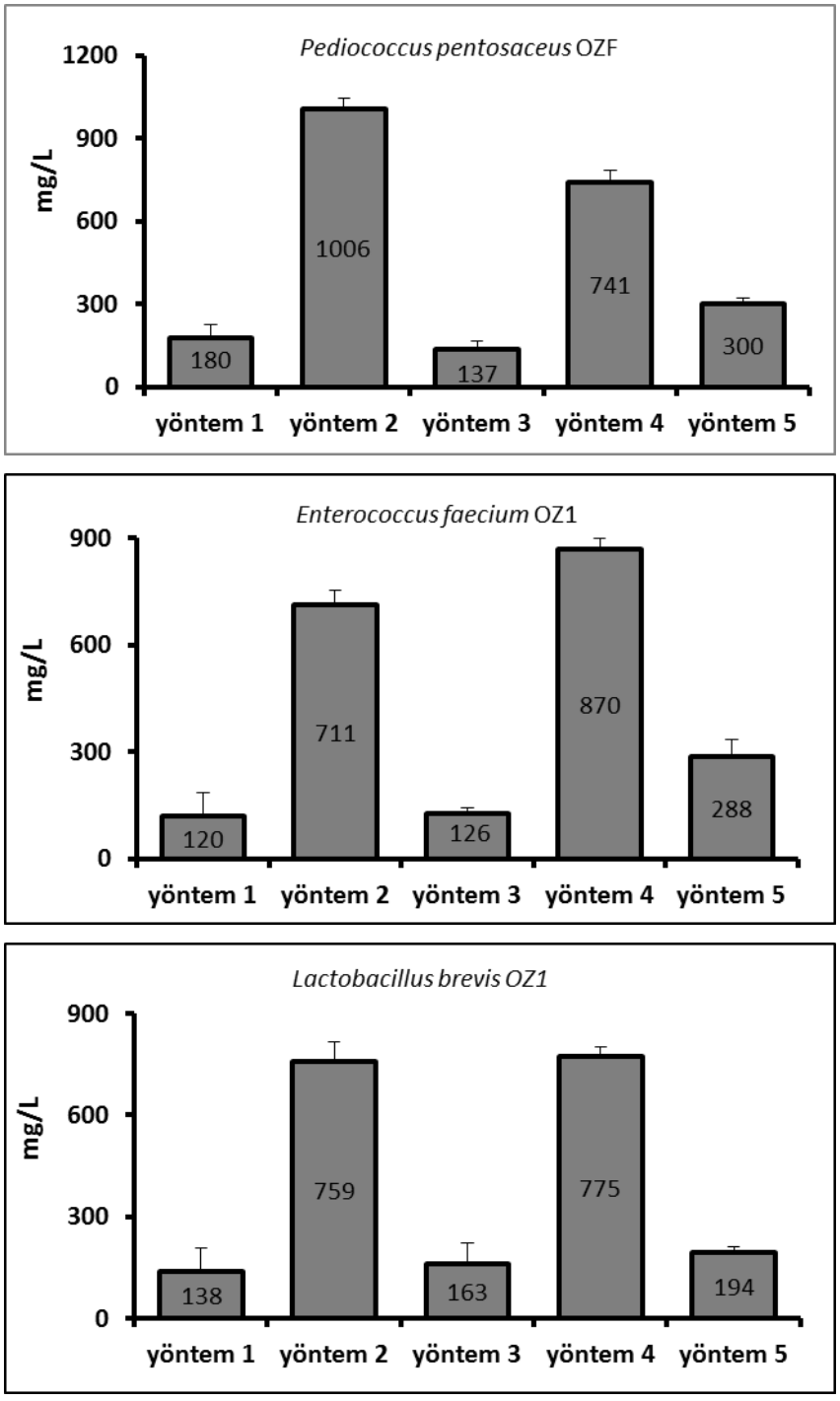


Şekil 4.1 Ekzopolisakkarit miktarını belirlemek için hazırlanan glukoz standart eğrisi

3 farklı suşun 5 farklı yöntem kullanılarak elde edilen EPS'lerine ait optik okumalarına (490nm) göre hesaplanan miktarları şekil 4.2'de gösterildiği gibidir. Yöntem sonuçları suşlara göre değerlendirildiğinde farklılık göstermektedir. En düşük EPS üretimi *Lb. brevis* OZ1 suşu tarafından elde edilirken, en yüksek EPS üretimi ise yöntem 2'nin kullanımı neticesinde *P. pentosaceus* OZF suşu tarafından elde edilmiştir.

Yöntemler kendi içlerinde karşılaştırıldığında ise oldukça belirgin fark olduğu gözlemlenen yöntem 2 ve yöntem 4'te en yüksek EPS miktarlarının elde edildiği tespit edilmiştir. *P. pentosaceus* OZF suşunun yaklaşık olarak 1000 mg/L EPS ürettiği, *E. faecium* OZ1 suşunun yaklaşık 870 mg/L EPS ürettiği, *L. brevis* OZ1 suşunun ise yaklaşık 775 mg/L EPS ürettiği tespit edilmiştir. *P. pentosaceus* OZF suşu için yöntem 2 en iyi sonucun elde edilmesini sağlarken, *E. faecium* OZ1 ve *L. brevis* OZ1 için yöntem 4 en iyi sonucu vermiştir. Bu aşamanın sonunda, EPS üretim miktarlarının karşılaştırılması neticesinde yöntem 2 en iyi yöntem, *P. pentosaceus* OZF ise en iyi üretici suş olarak çalışmanın devamında kullanılmak üzere seçilmiştir.

Bununla beraber, hücre yüzeyine bağlı ve hücre dışına salgılanan EPS miktarlarının ve fonsiyonlarının farklı olabileğine ait literatür bilgilerine dayanarak (Kim vd. 2006) *P. pentosaceus* OZF suşundan hücre yüzeyine bağlı EPS (eps-B/cell bound eps) ekstraksiyonu da gerçekleştirilmiştir. Toplamda daha fazla miktarda EPS elde edilmesi ile sonuçlanan bu aşamada eps-B miktarı 600±27 mg/L olarak belirlenmiş ve çalışmanın diğer aşamalarında eps-R ve eps-B kullanılarak devam edilmiştir.



Şekil 4.2 Farklı yöntemlerin kullanımı neticesinde elde edilen ekzopolisakkaritlerin miktarlarının karşılaştırılması (mg/L)

4.2 Maksimum Ekzopolisakkarit Üretiminde Etkili Parametrelerin Belirlenmesi

4.2.2 Farklı karbon kaynaklarının ekzopolisakkarit üretimi üzerine etkisi

Pediococcus pentosaceus OZF suşunun fruktoz, sükroz, laktoz ve glukoz içeren besiyerlerinde gelişimini takiben eps-R üretim miktarları yöntem 2 kullanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar çizelge 4.1'de belirtilmiş olup *laktoz en iyi karbon kaynağı olarak belirlenmiştir.*

Çizelge 4.1 Farklı karbon kaynaklarında ekzopolisakkarit üretim miktarları

Karbon kaynağı	**Hücre Gelişimi (OD_{600} nm)**	**EPS üretimi (OD_{490} nm)**	**EPS miktarları (mg/L)**
Glukoz	1,93	7,09±0,3	1013±43
Laktoz	1,51	9,03±0,2	1290±28
Fruktoz	1,91	5,92±0,12	846±17
Sükroz	2,06	8,01±0,17	1144±23

4.2.3 Farklı inkübasyon sıcaklığının Ekzopolisakkarit Üretimi Üzerine Etkisi

Pediococcus pentosaceus OZF suşunun karbon kaynağı olarak laktoz içeren besiyerlerinde 24, 34, 37 ve 42°C'de inkübasyon sıcaklıklarındaki gelişimini takiben eps-R üretim miktarları yöntem 2 kullanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar çizelge 4.2'de belirtilmiş olup *en yüksek EPS miktarı 34°C inkübasyon neticesinde elde edilmiştir*. *P. pentosaceus* OZF suşu tarafından üretilen EPS miktarları 24 ve 42°C'de en düşük olarak tespit edilirken; suşun optimum gelişme sıcaklığı olan 37°C'de ise 34°C'den daha düşük miktarda EPS ürettiği gözlemlenmiştir. Benzer sonuçlar yapılan farklı çalışmalarda da görülmektedir (Rabha vd. 2012).

Çizelge 4.2 Farklı inkübasyon sıcaklıklarıda ekzopolisakkarit üretim miktarları

Sıcaklık	**EPS üretimi (OD_{490} nm)**	**EPS miktarları (mg/L)**
24 ˚C	8,24±0,3	1177±42
34 ˚C	9,92±0,23	1417±32
37 ˚C	9,01±0,14	1287±20
42 ˚C	7,2±0,21	1014±28

4.2.4 Farklı inkübasyon zamanlarının ekzopolisakkarit üretimi üzerine etkisi

Pediococcus pentosaceus OZF suşunun karbon kaynağı olarak laktoz içeren besiyerlerinde 34°C'de 12, 18, 24, 36, 48 ve 72 saatlik farklı inkübasyon sürelerinin sonucunda eps-R üretim miktarları yöntem 2 kullanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar çizelge 4.3'de belirtilmiş olup *en yüksek EPS miktarı 12 saat (log faz) inkübasyon neticesinde elde edilmiştir*. Belirlenen inkübasyon sürelerine göre EPS üretiminin büyüme ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. EPS üretiminin logaritmik fazda en yüksek seviyeye ulaştığı, sabit faza geçtiğinde ise EPS logaritmik faza oranla miktarında azalma tespit edilmiştir. Sabit faz boyunca EPS miktarında önemli bir değişim gözlenmezken, ölüm evresine geçtiğinde ise EPS miktarının düşmeye başladığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3 Farklı inkübasyon sürelerinde ekzopolisakkarit üretim miktarları

İnkübasyon süresi	**Hücre Gelişimi (OD_{600} nm)**	**EPS üretimi (OD_{490}nm)**	**EPS miktarları (mg/L)**
12	1,12	10,73±0,15	1533±21
18	1,59	9,4±0,08	1342±11
24	1,59	9,12±0,09	1302±13
36	1,22	9,09±0,17	1298±24
48	1,01	7,94±0,11	1134±16
72	0,7	7,11±0,04	1015±6

4.3 *Pediococcus pentosaceus* OZF Suşu Tarafından Üretilen Ekzopolisakkaritin İmmunomodülatör Etkisinin *in vitro* Koşullarda Belirlenmesi

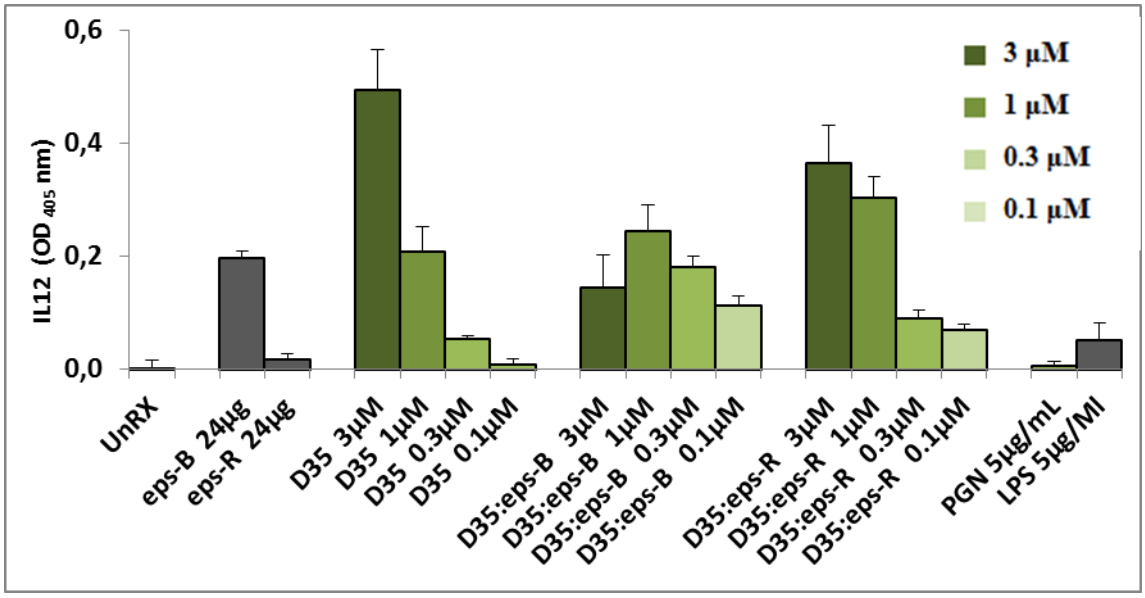
Pediococcus pentosaceus OZF suşundan elde edilen EPS'lerin (eps-R ve eps-B) *in vitro* koşullarda immünomodülatör etkileri test edilmiş ve IL-6, IL-12, IFN-γ üretimi üzerine olan etkileri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar neticesinde IFN-γ miktarı tespit edilememiştir.

Yapılan çalışmalar neticesinde eps-B/R'nin immünomodülatör etkilerine bakıldığında eps-R'ın tek başına bir etkisi olmadığı, eps-B'nin ise zayıf bir uyaran olduğu tespit edilmiştir. K ve D ODN'lerin bağışıklık sistemini güçlü uyaranlar olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bu CpG ODN'ler ile EPS'ler farklı dozlarda kompleks yapılarak bu ODN'lerin etkilerinin arttırılmasına çalışılmıştır.

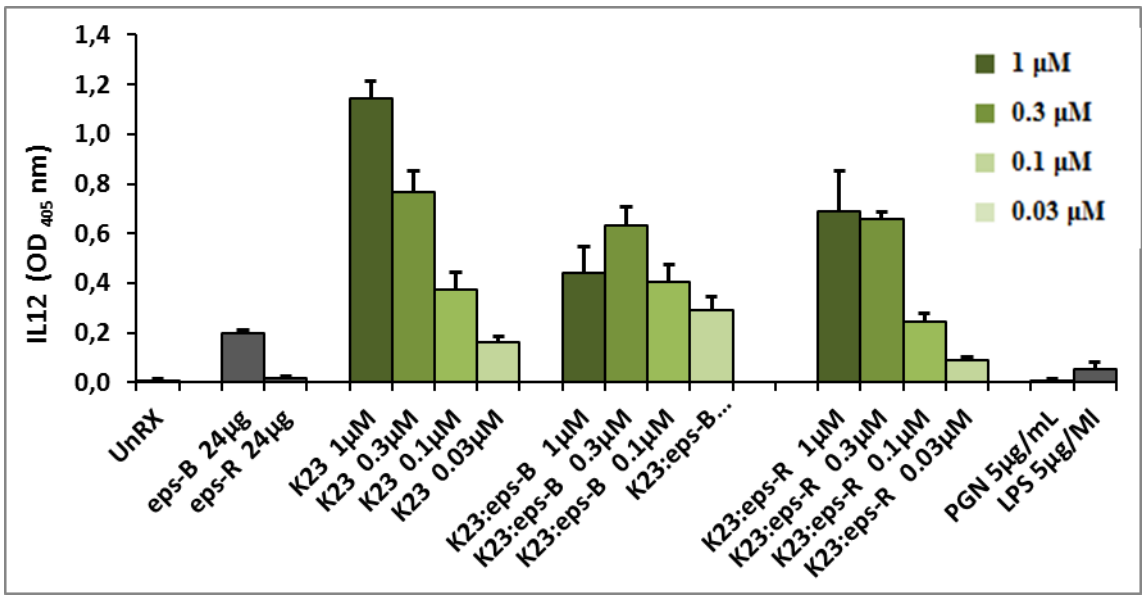
Fare dalak hücrelerinde yapılan kompleksler ile sitimülasyon neticesinde IL-12 üretimi açısından sonuçlar değerlendirildiğinde; EPS/D ODN kompleksinin uygulanan dozlarına bağlı farklılıklar olduğu tespit edilmiş ve her iki EPS için de yüksek dozda D ODN'nin etkisinin baskılandığı fakat eps-R için bu etkinin anlamlı sayılacak düzeyde

olmadığı gözlemlenmiştir. Eps-R'ın uygulanan bütün dozları ile birlikte D ODN'nin IL-12 üretimini değiştirmek açısından önemli sayılabilecek bir etkisi olmadığı tespit edilirken eps-B için yüksek dozda D ODN'nin etkisini belirgin biçimde baskıladığı tespit edilmiştir. İki EPS için de 3 µM'dan daha düşük dozlarda CpG ODN'lerin aktiviteleri üzerinde belirgin bir etkiye sahip olmadıkları gözlemlenmiştir (Şekil 4.3).

EPS/K ODN kompleksi açısından değerlendirildiğinde benzer sonuçların olduğu gözlemlenmiştir. Sonuçların, komplekslerin dozuna bağlı olarak değiştiği tespit edilmiş ve her iki EPS için de yüksek dozda K ODN'nin etkisinin baskılandığı fakat eps-R için bu etkinin yine anlamlı sayılacak düzeyde olmadığı gözlemlenmiştir. Eps-B içinse yüksek dozda K ODN'nin etkisinin belirgin biçimde azaldığı tespit edilmiştir. İki EPS için de 1 µM'dan düşük dozlarla kompleks yapıldığında pozitif ya da negatif bir etkiye sahip olmadıkları gözlemlenmiştir (Şekil 4.4).

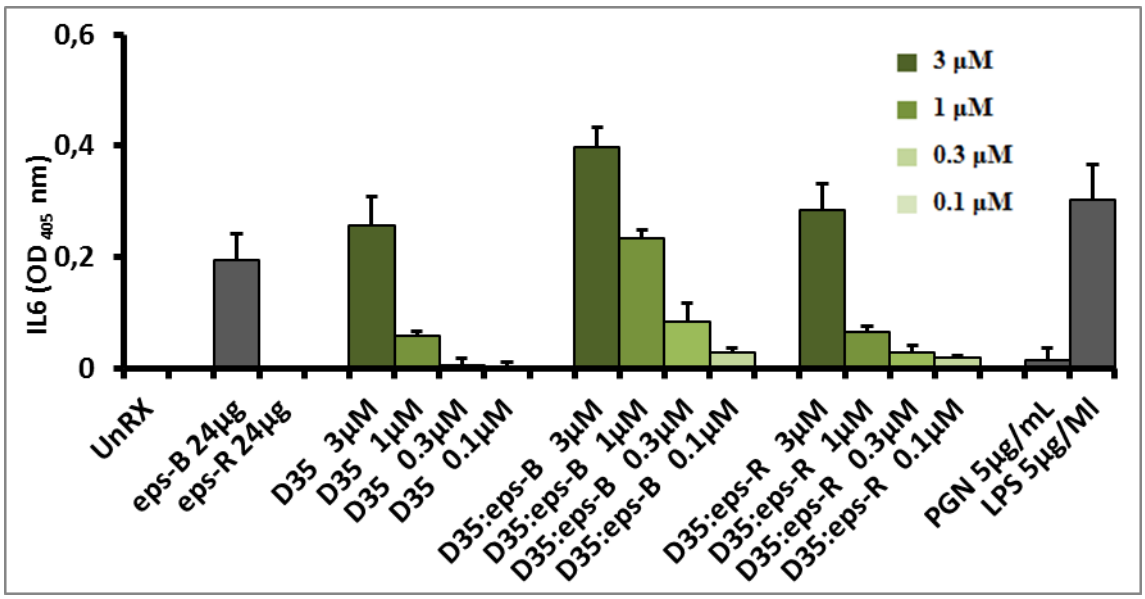


Şekil 4.3 EPS/D ODN (3, 1, 0.3, 0.1 µM) kompleksleri ile 24 saat sitimülasyon neticesinde fare dalak hücrelerinde tespit edilen IL-12 üretimi (OD)

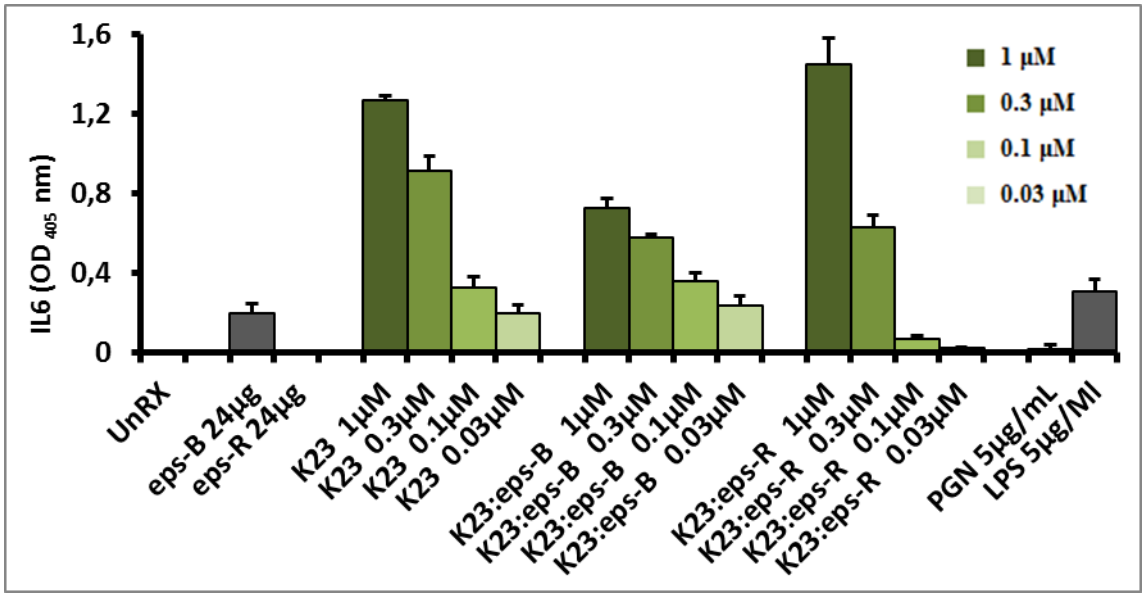


Şekil 4.4 EPS/K ODN (1, 0.3, 0.1, 0.03 µM) kompleksleri ile 24 saat sitimülasyon neticesinde fare dalak hücrelerinde tespit edilen IL-12 üretimi (OD)

Fare dalak hücrelerinin komplekler ile sitimülasyonu neticesinde IL-6 üretimi açısından sonuçlar değerlendirildiğinde; eps-B'nin tek başına zayıf bir uyaran olduğu tespit edilirken, eps-R sitimülasyon sonucunda hiçbir etki göstermemiştir. CpG ODN ile yapılan kompleksler sonucunda ise Eps-B/D ODN kompleksinin yüksek dozunda bir artış gözlemlenmiştir. Bu artışın eps-B'nin tek başına vermiş olduğu artışa eşit olduğu düşünüldüğünden uygulanan kompleksin anlamlı bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Eps-B'nin düşük dozlarına ve eps-R'ın uygulanan tüm dozlarına bakıldığında sitimülasyon açısından bir fark gözlemlenmemiştir (Şekil 4.5). K ODN ile yapılan komplekslerin sitimülasyonu sonucu ise EPS'lerin K ODN üzerinde farklı etkileri olduğu tespit edilmiştir. Eps-B K ODN'nin etkisini yüksek dozda baskılarken 1 µM'dan daha düşük dozlarla kompleks oluşturulduğunda K-ODN'nin etkisini değiştirmediği gözlemlenmiştir. Kompleks oluşumunda Eps-R ile K-ODN'nin 1 ve 0.3 µM dozları kullanıldığında, K-ODN'nin etkisinde belirgin bir fark gözlemlenmiştir; ancak, 0.3 µM'dan daha düşük dozlarında K ODN'nin immün sitimülan etkisini bir miktar baskıladığı tespit edilmiştir (Şekil 4.6).



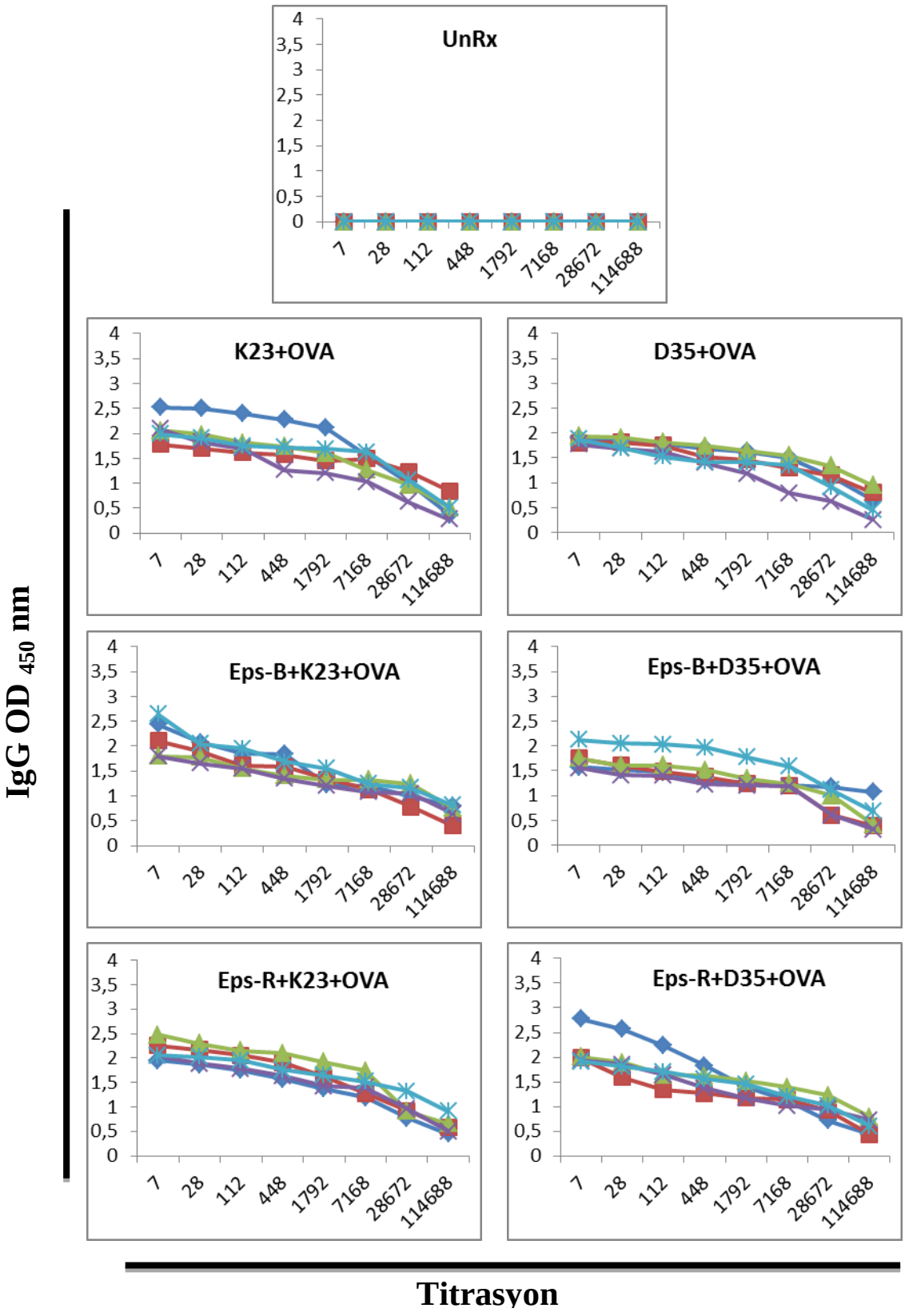
Şekil 4.5 EPS/D ODN (1, 0.3, 0.1, 0.03 µM) kompleksleri ile 24 saat sitimülasyon neticesinde fare dalak hücrelerinde tespit edilen IL-6 üretimi (OD)



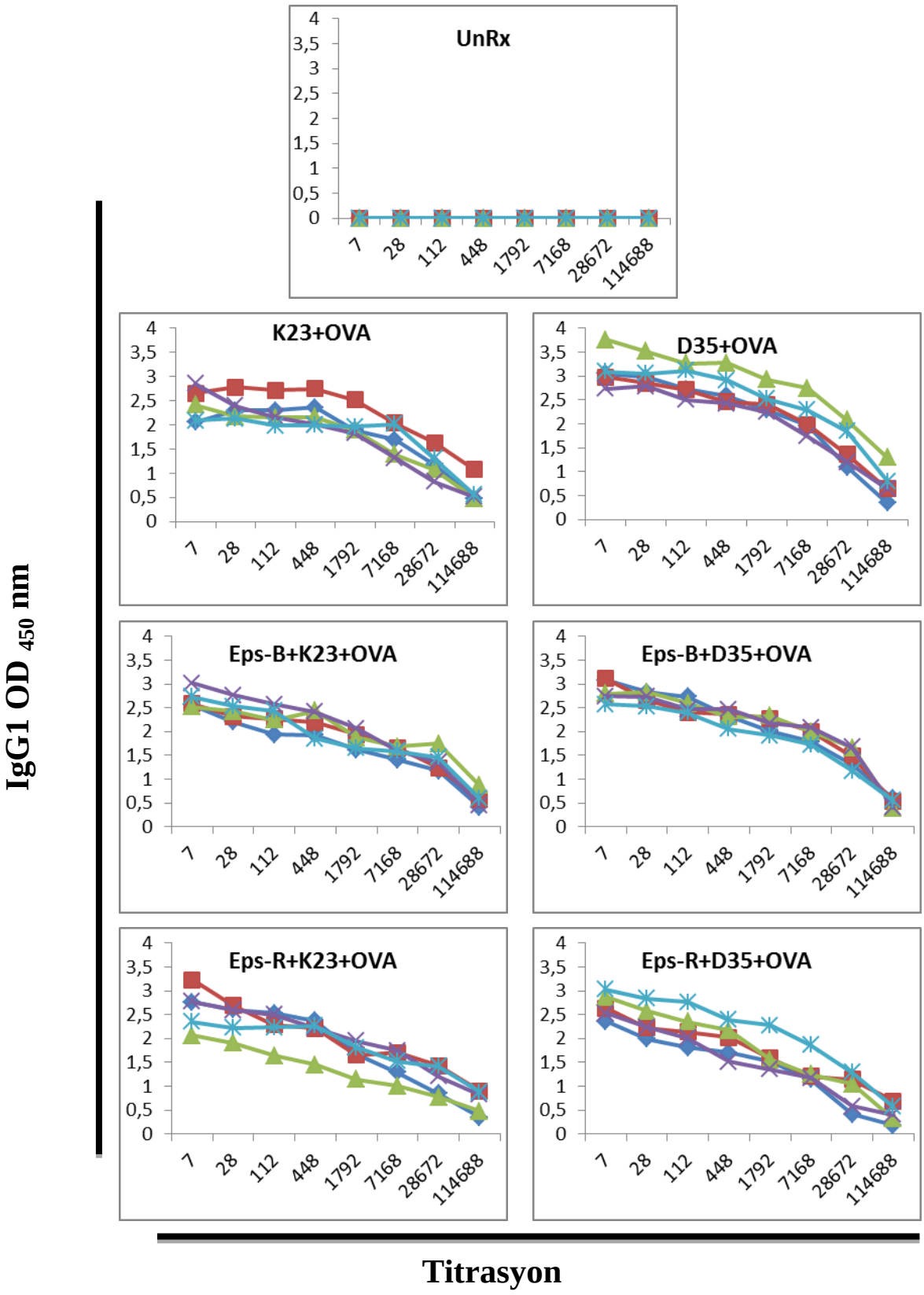
Şekil 4.6 EPS/K ODN (1, 0.3, 0.1, 0.03 µM) kompleksleri ile 24 saat sitimülasyon neticesinde fare dalak hücrelerinde tespit edilen IL-6 üretimi (OD)

4.4 *Pediococcus pentosaceus* OZF Suşu Tarafından Üretilen Ekzopolisakkaritin İmmunomodülatör Etkisinin *in vivo* Koşullarda Belirlenmesi

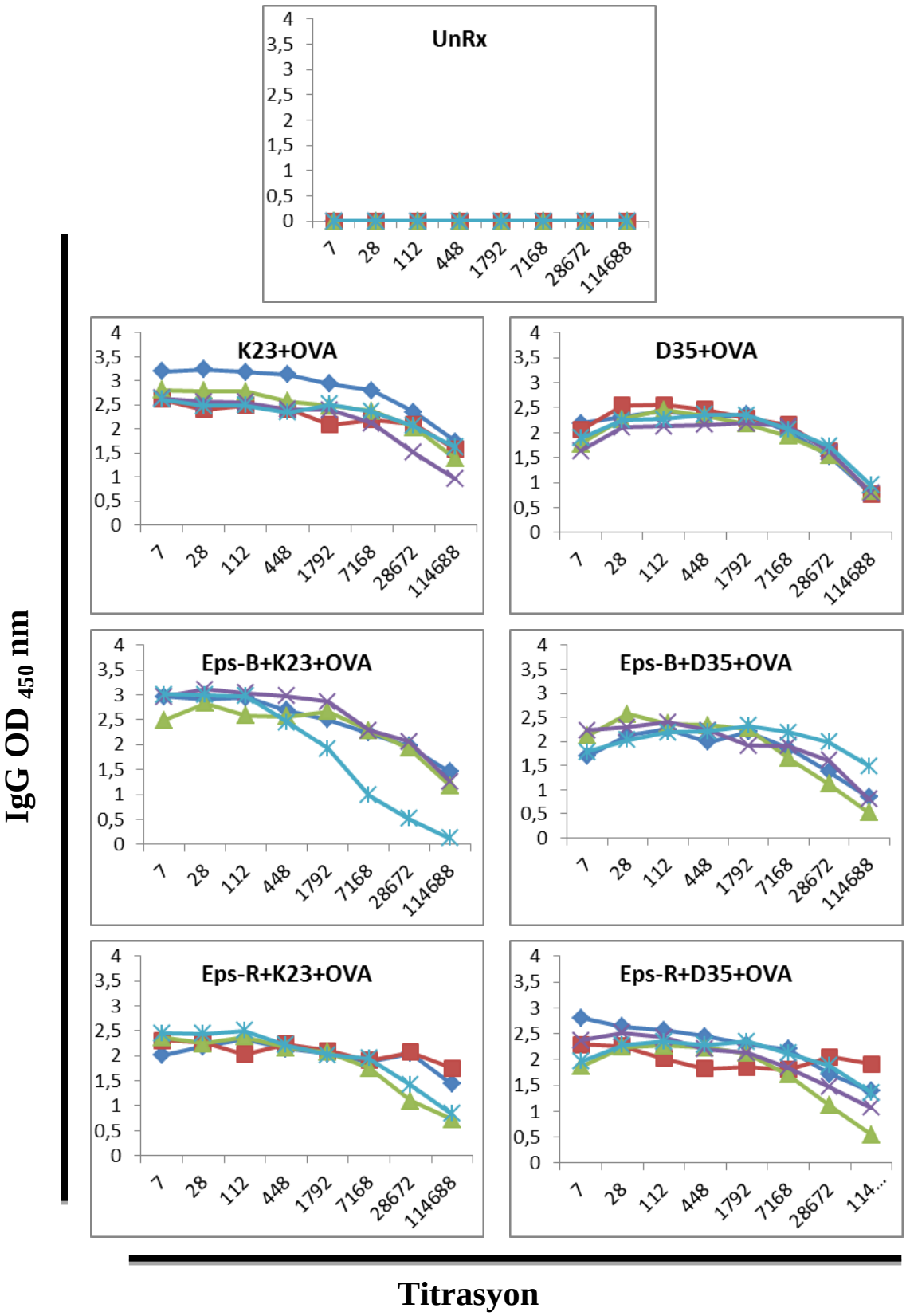
Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen *in vitro* analizler sonucunda *Pediococcus pentosaceus* OZF tarafından üretilen EPS'lerin IL-12 ve IL-6 seviyelerinde bir değişiklikliğe sebep olmadığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, EPS'nin, dendritik hücreleri ve B hücrelerini aktive eden, T hücrelerini etkileyerek sitokin salgılatan CpG ODN'lerin immün sistemi aktive edici etkilerini değiştirip değişmedikleri *in vivo* koşullarda da analiz edilmiştir. Bu amaçla immünizasyon çalışmaları için en yaygın kullanıma sahip, bir protein antijeni olan Ovalbumin (OVA) seçilmiştir. Daha önce bahsedildiği üzere Ova antijenin enjeksiyonu, D35 ve K23 ODN ve bu ODN'lerin iki tip EPS ile farklı kombinasyonları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Birinci enjeksiyonu takip eden 14. günde ikinci enjeksiyon gerçekletirilmiş, 28. ve 42. günde kanatma yapılarak her grup için toplanan serumlardan total IgG ve IgG1 seviyeleri analiz edilmiştir. Buna göre tüm grupların IgG ELİZA sonuçları şekil 4.7-4.10'da belirtilmiştir.



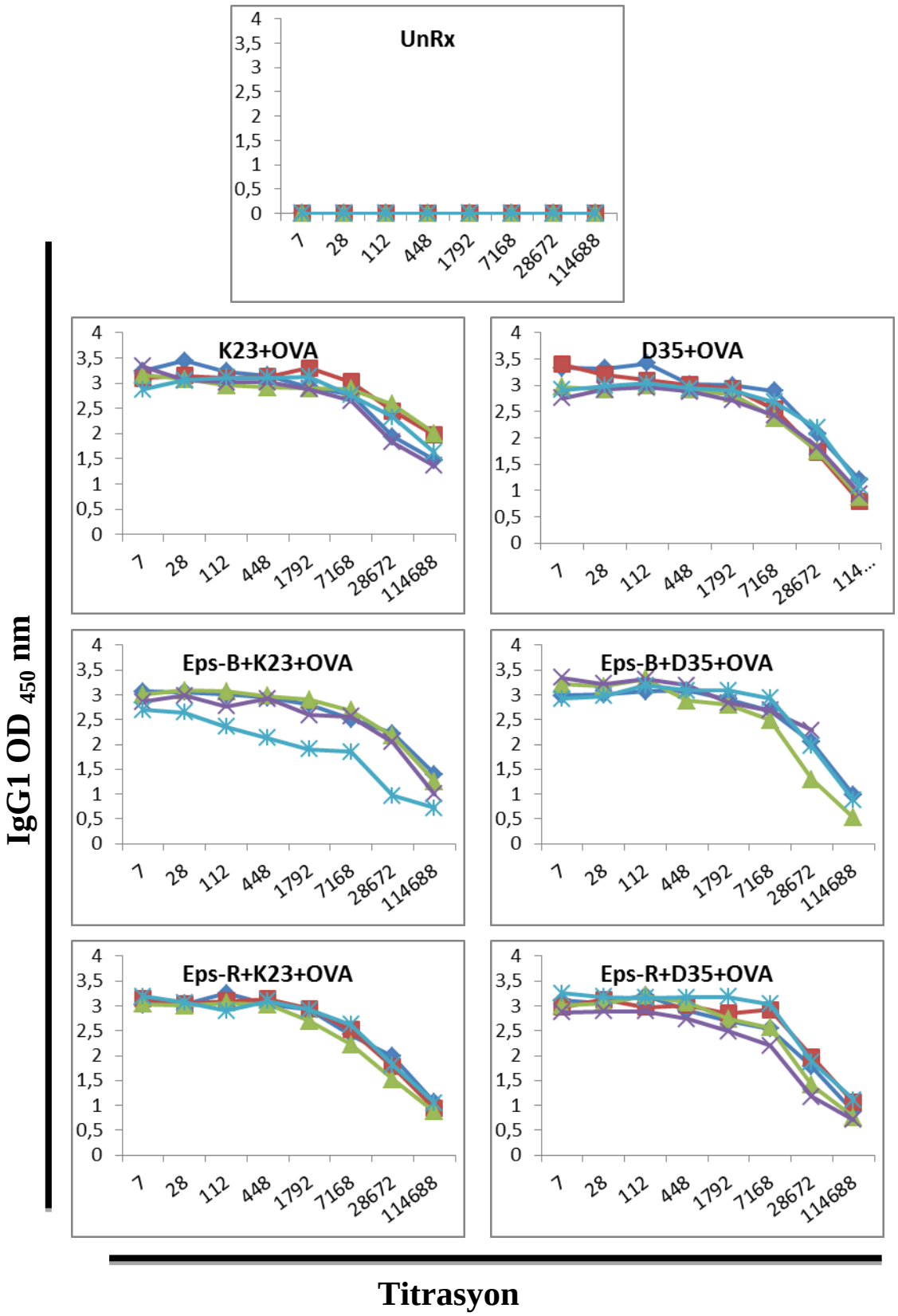
Şekil 4.7 2. kanatmada elde edilen serum örneklerindeki toplam IgG miktarları



Şekil 4.8 2. kanatmada elde edilen serum örneklerindeki toplam IgG1 miktarları



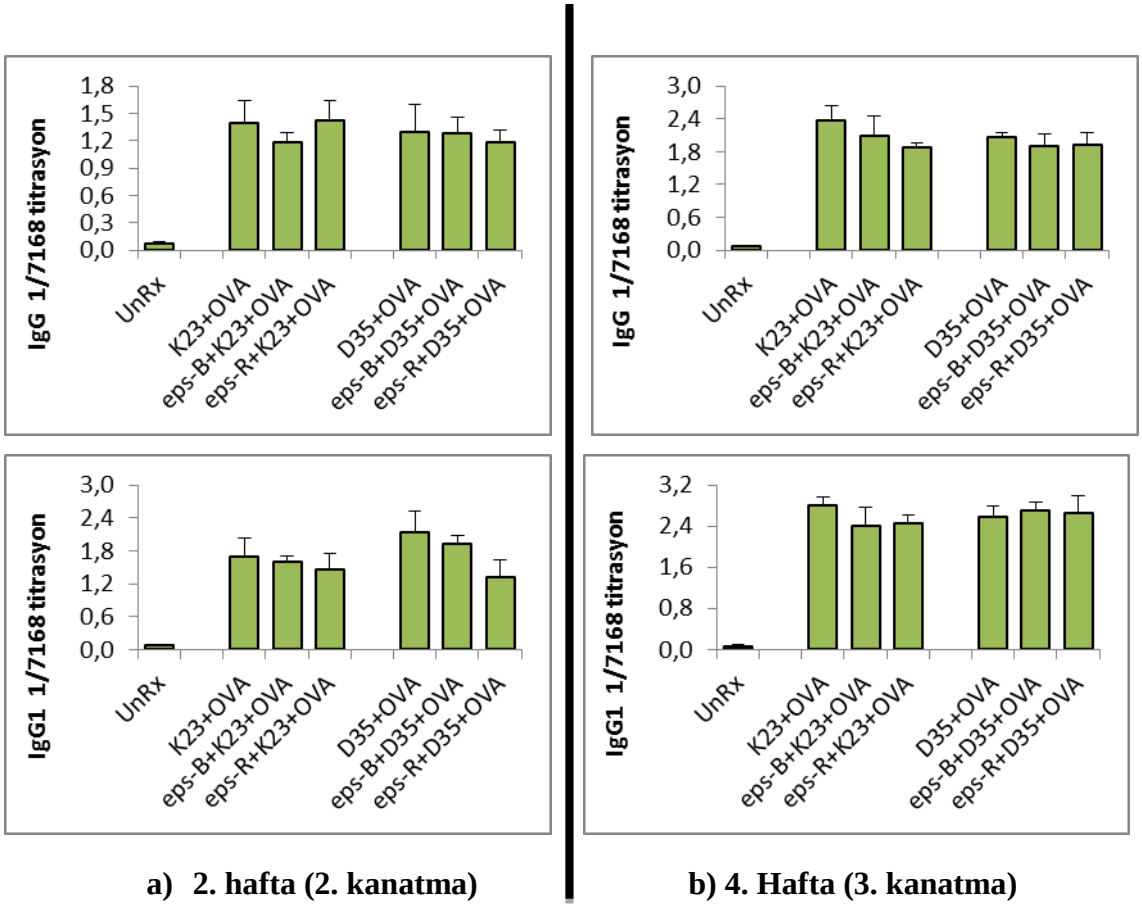
Şekil 4.9 3. kanatmada elde edilen serum örneklerindeki toplam IgG miktarları



Şekil 4.10 3. kanatmada elde edilen serum örneklerindeki toplam IgG1 miktarları

Şekil 4.11'de belirli bir titrasyondaki (1/7168) toplam IgG ve IgG1 seviyeleri karşılaştırılmıştır. İkinci kanatma sonucunda elde edilen serumlardaki toplam IgG seviyeleri K ODN ile yapılan komplekslere göre değerlendirildiğinde; eps-R'nin K23'ün etkinliği üzerinde hiçbir etkiye sahip olmadığı, eps-B'nin ise anlamlı sayılamayacak düzeyde K23'ün etkinliğini bir miktar baskıladığı gözlenmiştir. IgG1 seviyelerine bakıldığında ise herhangi bir değişiklik tespit edilememiştir. Sonuçlar, D ODN ile yapılan kompleksler açısından değerlendirildiğinde, toplam IgG seviyelerinde her iki EPS içinde bir farklılık tespit edilememiş, IgG1 seviyelerine bakıldığında ise eps-R'nin D35'in etkinlinliğini belirgin bir şekilde baskıladığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.11.a).

42. günde tekrar gerçekleştirilen kanatma sonucunda elde edilen verilere göre, her iki ODN üzerinde eps-B ve R'in belirgin etkisinin olmadığı gözlenmemiştir. OVA+D35+eps-R grubunda ikinci kanatma sonucunda tespit edilen IgG1 seviyesindeki azalmanın ise uzun süreli bir etkisinin olmadığı, varolan etkinin kaybolduğu belirlenmiştir.



a) 2. hafta (2. kanatma) **b) 4. Hafta (3. kanatma)**

Şekil 4.11 2. enjeksiyonu takiben 2. ve 4. haftada gerçekleştirilen kanatma sonucunda gruplara göre tespit edilen toplam IgG ve IgG1seviyeleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Laktik asit bakterileri uzun yıllardır ilaç, gıda ve kimya sanayisinde geniş uygulama alanlarına sahiptir. Fakat son zamanlarda çeşitli LAB suşlarının EPS salgılama yetenekleri ilgi uyandıran konular arasında bulunmaktadır. Bu ekstrasellüler polisakkaritler kullanışlı fiziko-kimyasal özelliklerinden dolayı büyük ticari değere sahiptirler. EPS'nin yapısı ve miktarı, besi ortamının içeriği (karbon ve azot kaynakları) ve inkübasyon şartları gibi (sıcaklık, pH, zaman) birçok faktörden etkilenebildiğinden dolayı günümüzde, endüstriyel önemi olan ürünleri (dekstran, ksantan, gellan ve alginatlar) sentezleyen yeni mikrobiyal suşların seçimi ve onların kültür şartlarının belirlenmesi için gerçekleştirilen çalışmalar hız kazanmıştır. Bu nedenle, özel uygulamalar için uygun olabilecek EPS'lerin keşfi oldukça önem taşımaktadır (Looisjesteijn vd. 2000, Tallon vd. 2003).

Ekstraksiyon neticesinde bakterilerden elde edilen ürün (EPS), ürünün saflığı ve polimer özellikleri ile kullanılan yöntemler arasında önemli bir ilişki bulunmaktadır. Ekzopolisakkaritlerin ekstraksiyonu için literatürde birçok yöntem bulunmaktadır. Bu işlemler sürecinde özellikle proteinlerin uzaklaştırılması amacıyla kullanılan kimyasal maddeler EPS'ler ile etkileşime girebilmekte ve bunun neticesinde daha az ürün elde edilmekte ya da polimer özellikleri olumsuz yönde etkilenebilmektedir. Bu gibi olumsuz etkiler ile karşılaşmamak için, tez çalışmasının başlangıcında EPS ekstraksiyonu için en uygun yöntemin belirlenmesi amaçlanmıştır. EPS ekstraksiyonunda ilk belirlenmesi gereken bakteriyel gelişim için kullanılan besiyerinin tespitidir. Çalışmamızda, bakterilerin geliştirilmesi için kullanılan MRS besiyeri içeriğinin kompleks olması ve bu durumun şeker ölçümü sırasında oluşabilecek hatalara neden olabileceği dolayısıyla TGE besiyerinin kullanımına karar verİlmiştir (Cerning vd. 1992).

Hücre dışına salgılanan EPS ekstraksiyonu için beş farklı yöntem kullanılmıştır. *P.pentosaceus* OZF suşunda en yüksek EPS eldesi yöntem 2'nin kullanımı ile sağlanırken, *E. faecium* OZ1 ve *L. brevis* OZ1 için en iyi sonuç yöntem 4'ün kullanımı neticesinde elde edilmiştir. İki yöntem arasındaki temel farklılık deproteinizasyon için

TCA'nın kullanımıdır. TCA kültürden kaynaklanabilecek protein ya da polipeptid kontaminasyonunu minimuma indirgeyeceğinden daha saf bir polisakkarit eldesi sağlamaktadır. Deproteinizasyon basamağı EPS kullanım amacına göre farklılık göstermektedir. Eğer EPS miktar tayini yapılacaksa deproteinizasyon basamağının önemi yoktur. Çünkü polisakkarit tayinini içeren yöntem protein kontaminasyonundan etkilenmemektedir. Öte yandan saf bir EPS eldesi gerekiyorsa örneğin moleküler karekterizasyon ya da immünolojik çalışmalarda kullanılmak üzere, kullanılacak yöntemin en azından bir TCA presipitasyonunu içeren basamağa sahip olması daha uygun olacaktır. Aynı zamanda kültürün birinci aşama olarak ısıl işleme tabi tutulması da oldukça kritik bir basamaktır. Bu basamak ile polimerlerin degrede olmasına sebep olabilecek potansiyel enzimlerin deaktivasyonu sağlanmaktadır. Isıl işlem uygulanmayan prosedürlerde hücreye bağlı bulunan EPS'ler pelletle birlikte santrifüj işlemi esnasında kaybolabilmektedir. Ayrıca yöntem 1'de olduğu gibi iki kez EtOH presipitasyonuna tabii tutmak, ilk presipitaston sonucunda elde edilen EPS'nin büyük bir kısmının kaybıyla sonuçlanmasına sebep olmaktadır.

Son raporlar gıda, ilaç ve tıp sektöründe çeşitli LAB suşları tarafından üretilen EPS ve bunların türevleri olan oligosakkaritlerin büyük potansiyele sahip olduklarını göstermektedir. EPS'lerin klinik ve ticari amaçlı kullanımları için mümkün olduğunca saf ve yüksek miktarda elde edilmeleri gerekmektedir. LAB suşları tarafından üretilen EPS'lerin çeşitli kullanım alanları ve faydaları göz önünde bulundurulduğunda, EPS'lerin verimliliğinin artırılması ve geliştirilmesi günümüzde oldukça önemlidir. EPS'lerin verimliliğinin artırılması için öncelikli olarak üretici suşların gelişimini etkileyen farklı parametrelerin optimizasyonu sağlanmalıdır. Endüstriyel açıdan EPS'lerin kullanımını sınırlayan temel etkenlerden bir tanesi fermantasyon sırasındaki düşük verimdir. EPS üreten pek çok mikroorganizmada ürün miktarını ve kalitesini karbon kaynakları belirlemektedir (Rosado vd. 2003, Audy vd. 2010). Bakterilerin EPS üretim miktarlarının suşlara göre farklılık gösterdiği, besi ortamının kompozisyonuna ve gelişim şartlarına doğrudan bağlı olduğu birçok araştırıcılar tarafından belirtilmiştir (Page vd. 1992, Pal vd. 1999). Örneğin *L. rhamnosus* RW 9595 karbon kaynağı olarak glukoz veya laktoz kullanımına bağlı olarak EPS miktarı sırasıyla 931 ile 1275mg/L olacak şekilde değişiklik gösterdiği belirtilmiştir (Van Calsteren vd.2002). Bu bağlamda

çalışmamızda karbon kaynağının hücrelerin gelişimi ve EPS üretimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. En fazla EPS üretiminin karbon kaynağı olarak laktoz kullanımı neticesinde gerçekleştiği tespit edilmiştir. Glukoz, sükroz ve fruktozda bakteri gelişimi laktoza göre daha yüksek olmasına karşın en yüksek EPS üretimi laktozda gözlenmiştir. Benzer sonuçlar Kanmani ve ark. (2011) ve Ismail ve Nampoothiri (2010) tarafından yapılan çalışmalar sonucunda da rapor edilmiştir. Sırasıyla *Streptococcus phocae* PI80 ve *L. plantarum* MTCC 9510 suşları tarafından üretilen EPS miktarları laktoz varlığında en yüksek olarak tespit edilmiştir. Grobben ve ark. tarafından 1996 yılında yapılan bir çalışmada ise *L. bulgaricus* NCFB 2772 suşu tarafından üretilen EPS'nin biyosentez yolunun regülasyonunun karbonhidrat kaynağına (fruktoz) bağlı olabileceği ileri sürülmüştür. Başka bir çalışmada ise *L. sakei 0-1* suşunun fruktozda gelişimi EPS sentezinde görevli olan anahtar enzimlerin inhibe edilmesine sebep olmaktadır. EPS sentezinde görev olan enzimler ne kadar az kompleks olursa, EPS üretimi daha yüksek sonuçlanabilmektedir. Bu durum ise karbon kaynağı laktoz olan besiyerinde gelişen şusun düşük büyüme hızına sahip olması, sahip olduğu taşıma sistemi ve ölçülen düşük β-D-galaktosidaz aktivitesi ile açıklanmaktadır (Degeest vd. 2001). İnkübasyon sıcaklığı da EPS üretimini etkileyen faktörler arasında bulunmaktadır. Dört farklı inkübasyon sıcaklığındaki üretim miktarları karşılaştırılmış ve en yüksek EPS miktarı 34°C'de inkübasyon neticesinde elde edilmiştir. Tallon ve ark. 2003 yılında yaptıkları çalışmada *L. plantarum* EP56 suşu tarafından üretilen EPS'nin üretim ve gelişme sıcaklığı arasında ters bir orantı olduğu belirtmişlerdir. İnkübasyon sıcaklığı artıkça EPS üretim miktarının da düştüğü gözlemlenmiştir. Daha yüksek miktarda EPS elde edebilmek amacıyla deneyin bundan sonraki aşamalrında belirlenen sıcaklık ve karbon kaynağı kullanılmıştır. Çalışmanın devamında farklı inkübasyon sürelerinin EPS miktarı üzerine etkileri belirlenmiş ve 12 saatlik inkübasyon sonucunda en fazla EPS miktarı elde edilmiştir. Bakteri gelişimine bağlı olarak logaritmik fazda EPS artışı görülürken sabit fazda ise EPS miktarında bir farklılık tespit edilmemiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler literatür var olan bazı sonuçlar ile benzer bulunmuştur (De Vuyst vd. 1998; Tallon vd. 2003).

Sonuç olarak tez çalışmasının birinci aşamasında probiyotik kriterlere sahip olduğu daha önce belirlenmiş olan laktik asit bakterisine ait 3 suşun EPS üretim miktarları

farklı yöntemler kullanılarak belirlenmiştir. Yöntem 2'nin kullanımı neticesinde yaklaşık olarak 1000mg/L EPS ürettiği tespit edilen *P. pentosaceus* OZF suşu çalışmanın diğer aşamalarında kullanılmak üzere seçilmiştir. Laktoz içeren TGE besiyerinde 34°C'de 12 saatlik inkübasyon neticesinde EPS miktarında yöntem 2 ile kıyaslandığında %50 oranında artış sağlanmıştır (1533mg/L).

Çalışmanın ikinci aşamasında LAB suşlarının hücre dışına gevşek bir tabaka halinde salınan ve hücre yüzeyine bağlı halde bulanan iki farklı formda EPS üretim yetenekleri göz önünde bulundurularak, *P. pentosaceus* OZF suşu tarafından üretilen ve serbest halde bulunan (eps-R) EPS ekstraksiyonuna ilaveten hücre yüzeyine bağlı (eps-B) olarak bulunan EPS ekstraksiyonu da gerçekleştirilmiş ve bu iki polimerin immünmodülatör etkileri araştırılmıştır. Hücre yüzeyine bağlı olarak bulunan EPS'lerin hücreyi olumsuz koşullara karşı koruma sağladığı belirtilmektedir (Kim vd. 2006).

Son yıllarda yapılan immünolojik ve farmasötik çalışmalar vücudumuzda bulunan kommensal bakterilerin birçok yararlı etkilerini ortaya koymaktadır. Araştırmalar probiyotik adı verilen bu faydalı bakterilerin yapılarında bulunan ya da üretmiş oldukları PGN, EPS ve bakteriyosin gibi çeşitli mikrobiyal bileşenlerin bağışıklık sistemimiz üzerinde de immünmodülatör etkilerinin olduğunu göstermektedir. Probiyotikler tarafında üretilen EPS'lerin sağlık üzerindeki olumlu etkilerini kanıtlanmıştır. LAB suşları tarafından sentezlenen EPS'lerin prebiyotik rollerine ilaveten, antikanserojenik, immünostimülatör ve kolestrolü düşürücü etkileri de mevcuttur (Patel vd. 2012). EPS üreticisi suşların immünomodülatör özellikleri ve etki mekanizmaları halen araştırılmaktadır. EPS'nin patojen kalıplarını tanıma reseptörleri için ligand olup olmadığı ve immün sistemin kommensal floradan patojenik bakteriyi nasıl ayırt ettiği henüz tam olarak net değildir. Ancak EPS'nin mukozal bağışıklık sisteminde sinyal molekül olarak rol oynamasının mümkün olabileceği düşünülmektedir (Ciszek-Lenda 2011).

Bu çalışmada; *P. pentosaceus* OZF suşu tarafından üretilen EPS'lerin immünmodülatör etkiye sahip olup olmadıkları ve bununla beraber CpG ODN'lerin etkinliğini değiştirip değiştirmediği araştırılmıştır. *In vitro* denemelerde *P. pentosaceus* OZF suşu tarafından

üretilen eps-R'nin kendi başına immünmodülatör bir etkisi olmadığı, eps-B'nin ise IL-6 ve IL-12 açısından zayıf bir uyaran olduğu tespit edilmiştir. Literatürde, çeşitli LAB suşları tarafından üretilen EPS'lerin bazılarının immün sistemi uyarıcı özellik sergilediği, bazılarının ise immün baskılayıcı özelliğe sahip oldukları belirtilmiştir. Hücre dışında salgılanan polisakkaritlerin özellikle T-lenfositlerin üretimi, makrofaj aktivasyonu ve sitokin üretimi gibi diğer immunolojik fonksiyonları artırdığı ortaya konulmuştur (Zubillaga vd. 2001). Çalışmamızda elde etmiş olduğumuz sonuçlara benzer şekilde yüksek molekül ağırlığına sahip EPS (HMW-EPS) üreten *L. rhamnosus* RW-9595M (ATCC 9595 suşunun bir izogenik varyantı) ile fare peritonel makrafojlarında stimülasyon yapılmış, TNFα ve IL-6 düşük seviyelerde indüklenmiştir. Ancak *L. rhamnosus* ATCC9595 suşu yüksek seviyelerde TNFa, IL-12, IL-6 üretimine neden olmuştur. IL-10 seviyesinde de azalma tespit edilmiştir (Bleau vd. 2010). Bu gibi benzer çalışmalar immün cevabı baskılayan EPS'lerin çoğunlukla büyük ölçekli ya da yüksek moleküler ağırlığa sahip HePS'ler olduğunu göstermektedir. Farklı bir çalışmada ise, *Pediococcus* suşları tarafından üretilen, saflaştırılmış EPS'in bağırsak mukozasında *in vitro* analizi sonucunda makrofajlar tarafından sitokin üretimi değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar EPS'nin IL10/TNFα oranını artırarak anti-inflamatuvar etki gösterdiğini ortaya koymuştur (Notararigo vd. 2011).

Çalışmada kullanılan her iki EPS'nin de güçlü bir immomodülatör etkisinin belirlenememesi yeni yaklaşımların geliştirilmesine neden olmuştur. Bu yaklaşım kapsamında EPS/CpC ODN komplekslerinin immunomodülatör etkinlikleri tespit edilmiştir. Metillenmemiş CpG motiflerini içeren DNA parçaları klinik ve klinik öncesi çalışmalarda aşı adjuvanı, anti-allerjen, anti-kanser ve profilaktik amaçlarla kullanılmaktadırlar. Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar bakteriyel DNA'da yer alan bu özel motiflerin bağışıklık sistemi hücrelerini uyarabildiğini ya da etkinliklerini değiştirebildiğini ortaya koymaktadır. CpG ODN ile beraber verilen antijenlere karşı hem çok daha yüksek düzeyde hem de daha hızlı bağışıklık oluşturulduğu gösterilmiştir. Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda anlamlı veriler elde edebilmek amacıyla son yıllarda özellikle terapötik uygulmalarda oldukça önemli kazanan CpG-ODN'lerin etkinliği üzerinde EPS'lerin etkili olup olamayacağı araştırılmıştır. Sergilediğimiz yaklaşımları temel alan benzer bazı çalışmalarda katyonik peptidler ve bitkisel polisakkaritler ile

gerçekleştirilmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Gursel vd. 2001). Doğal polimerler olarak tanımlanan bu bileşenler arasında polisakkaritler; özellikle nontoksik, amfifilik, yüksek stabiliteli, güvenli ve düşük maliyetli olmalarının yanı sıra doğal olarak kolayca bulunabilmelerinden dolayı tercih sebebidirler. Ancak literatür araştırması yapıldığında bakteriyel bir EPS'nin bu amaçla kullanılmadığı tespit edilmiştir. CpG ODN'ler ile oluşturulan EPS komplekslerinin *in vitro* koşularda tespit edilen etkilerinin doza ve kullanılan EPS tipine bağlı olarak değiştiği tespit edilmiştir. Her iki EPS'nin D ODN kompleksleri ile gerçekleştirilen sitimülasyonunda IL-6 üretiminde belirgin bir etkisinin olmadığı ($p>0.05$), IL-6 salınımını ve yaygınlaşmasını sağladığı bilinen K ODN'nin ise yüksek dozda eps-B, düşük dozda ise eps-R tarafından etkisinin azaltıldığı, IL-12 üretiminde ise komplekslerin kullanılan düşük dozlarının baskılayıcı ya da arttırıcı bir etkisinin olmadığı, yüksek dozlarda ise CpG ODN'ler tarafından üretilen IL-12 seviyelerinin baskılandığı tespit edilmiştir.

In vitro'da tespit edilen immünbaskılayıcı etkinin; EPS'lerin ODN ile etkileşime girerek antijen sunan hücrelerle olan bağlantılarını azaltaması, dalak hücrelerindeki düzenleyici T hücrelerini indüklemesi veya CpG ODN'e bağlı B hücre artışını dolaylı yoldan inhibe etmesi gibi nedenlere bağlı olabileceği düşünülmektedir. Ancak elde edilen verilerin EPS'nin doza bağlı farklılıklar göstermesi immün sistemi baskılayıcı etkiye sahip olduğu konusunda net bir fikir verememektedir. Elde edilen sonuçları doğrulamak ve tekrarlamak amacıyla çalışmanın bundan sonraki aşamaları *in vivo* koşularda Balb/C fare modelinin kullanımı ile gerçekleştirilmiştir.

K ODN için *in vitro* koşullarda tespit edilen EPS'nin baskılayıcı özelliği *in vivo* koşularda elde edilememiştir. *In vivo* çalışmaların sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde belirli bir titrasyonda (1/7168) sadece D ODN eps-R kompleksinin IgG1 seviyesini bir miktar düşürmüş ancak elde edilen sonuç uzun vadede etkinliğini kaybetmiştir. Gerçekleştirilen bir çalışmada (Ciszek-Lenda vd. 2012) EPS'nin OVA-spesifik hümoral cevabı baskıladığını göstermiştir. EPS, OVA antijeni ile birlikte verildiğinde IgG, IgG1 ve IgG2a antikor üretiminin azaldığı görülmüştür. LPS, B hücre çoğalmasının indükleyen, güçlü bir bakteriyel bir adjuvant olarak bilinmektedir. EPS,

LPS ile birlikte verildiğinde OVA-spesifik IgG üretimini inhibe ederek LPS'nin adjuvant özelliklerini azalttığı tespit edilmiştir.

Probiyotikler tarafından üretilen EPS'lerin immünomodülatör mekanizmaları hakkında net bir bilgi bulunmamaktadır. Çalışmalarda elde edilen veriler neticesinde bazılarında hümoral cevabın baskılandığı bazılarında arttığı tespit edilmiştir (De Vuyst ve Degeest 1999; Gorska vd. 2007). Bunun temelinde, EPS'lerin immünomodülatör özelliklerini etkileyebilecek birçok faktör söz konusudur. Son çalışmalar bakteriyel EPS tarafından indüklenen hücre çoğalmasının yapı-bağımlı olduğuna dikkat çekmektedir (Kalka-Moll vd. 2002). Farklı LAB suşlarına özgü farklı özellikte ve büyüklükte EPS'ler üretilmektedir. Özellikle farklı şeker monomerlerini bulunduran hücre duvarı bileşenlerinin aşırı yapısal farklılıkları farklı sonuçların oluşmasına neden olmaktadır. Moleküler ağırlıkları ve şeker içerikleri bakımından farklılık gösterebilen bu EPS'lerin moleküler mekanizmalarının anlaşılabilmesi için saf olarak elde edilmeleri gerekmektedir. Bununla beraber, polisakkaritlerin yapıları ekstraksiyon ve saflaştırma işlemi sırasında modifikasyona uğrayabilmekte ve bu durum immunomodülatör etkilerini engelleyebilmektedir. Örneğin, zwitteriyonik yüke sahip bakteriyel polisakkaritlerde kimyasal nötralizasyon neticesinde yüklü grubun kaybı, polisakkaritlerin T hücrelerini aktive etme yeteğinin kaybolmasına neden olmuştur. Zwitteriyonik yüke sahip bakteriyel polisakkarit ise hem in-vitro hem de in vivo çalışmalarda kuvvetli CD4 T hücre cevabına neden olmaktadır (Tzianabos vd. 2001). Bu noktada, immunomodülatör etkinin tam olarak belirlenebilmesi amacıyla suşa özgü üretilen EPS'nin yapısının belirlenmesi ve tam olarak saflaştırılması gerekmektedir.

Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar oral yolla alınan EPS'lerin ya da EPS üreticisi çeşitli LAB suşlarının inflamatuvar hastalıkların iyileşmesine katkıda bulunduğunu göstermiştir (Ciszek-Lenda 2011). Çalışmadan elde edilen veriler literatüre katkı sağlamakla beraber OZF suşu tarafından üretilen EPS'lerin immünoterapide anlamlı sayılabilecek bir uygulama potansiyelline sahip olmadığını göstermiştir. Ayrıca farklı biyopolimerler ile kompleks oluşturulan CpG-ODN'lerin bu çalışmada EPS ile kompleks oluşturması yeni ve farklı bir bakış açısı da sunmaktadır.

KAYNAKLAR

Agnese, D.M., Calvano, J.E., Hahm, S., Coyle, S.M., Corbett, S.A., Calvano, S.E. and Lowry, S.F. 2002. Human Toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polypmorphism are associated with an increased risk of gramnegative infections. The Journal of Infectious Diseases, 186;1522- 1525.

Akira, S. 2003. Mammalian Toll-like receptors. Current Opinion in Immunology,15, 5-11.

Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. 2006. Pathojen recognition and innate immunuty. Cell 124;783-801.

Alsteens, D., Dupres, V., Mc Evoy, K., Wildling, L., Gruber, H.J. and Dufrene, Y.F. 2008. Structure cell wall elasticity and polysaccharide properties of living yeast cells, as probed by AFM. Nanotechnololgy, 19; 384-405

Audy, J., Labrie, S., Roy, D. and LaPointe, G. 2010. Sugar source modulates exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* CRC 002. Microbiology, 156; 653-664.

Ayala-Hernández, I., Hassan, A., Goff, H.D., Mira de Orduña, R. and Corredig, M. 2008. Production, isolation and characterization of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* JFR1 and their interaction with milk proteins: Effect of pH and media composition. International Dairy Journal 18; 1109-1118.

Bahl, M.A., Schultheis, E., Hempel, D.C., Nörtemann, B. and Franco-Lara, E. 2010. Recovery and purification of the exopolysaccharide PS-EDIV from *Sphingomonas pituitosa* DSM 13101. Carbohydrate Polymers, 80; 1037-1041.

Bajaj, I.B., Survase, S.A., Saudagar, P.S. and Singhal, R.S. 2007. Gellan gum: fermentative production, downstream processing and applications. Food Technology Biotechnology, 45; 341-354.

Banks, J. M. 2004. The technology of low-fat cheese manufacture. International Journal of Dairy Technology, 57; 199-207.

Bennama, R., Rechidi-Sidhoum, N. and Bensoltane, A. 2012 Effect of some fermentation substrates and growth temperature on exopolysaccharide production by Streptococcus Thermophilus BN1. International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics, 2(1); 44-47.

Bergmaier, D., Champagne, C.P. and Lacroix, C. 2003. Exopolysaccharide production during batch cultures with free and immobilized *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. Journal of Applied Microbiology, 95; 1049-1057.

Bleau, C., Monges, A., Rashidan, K., Laverdure, J. P., Lacroix, M., Van Calsteren, M. R., Millette, M., Savard, R. and Lamontagne, L. 2010. Intermediate chains of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M increase IL-10 production by macrophages. Journal of Applied Microbiology 108; 666-675.

Bonizzi, G. and Karin, M. 2004. The two NF- kappa B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. Trends in Immunology, 6; 280-288.

Bouzar, F., Cerning, J. and Desmazeaud, M. 1997. Exopolysaccharide production and texture promoting abilities of mixed strain starter cultures in yogurt production. Journal of Dairy Science, 80; 2310-2317.

Bugaut, M. and Bentéjac, M. 1993. Biological effects of short-chain fatty acids in nonruminant mammals. 1993. Annual Review of Nutrition, 13; 217-241.

Cerning, J. 1990. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Review, 87; 113- 130.

Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M. J. and Landon, M. 1986. Isolation and characterization of exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus*. Biotechnology Letters, 8; 625- 628.

Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M. and Desmazeaud, M. 1992. Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. Journal of Dairy Science, 75; 692-699.

Cheirsilp, B., Shimizu, H., and Shioya, S. 2001. Modelling and optimization of environmental conditions for kefiran production by *Lactobacillus kefiranofaciens*. Applied Microbiology and Biotechnology, 57; 639-646.

Cheirsilp, B., Shoji, H., Shimizu, H. and Shioya, S. 2003. Interactions between *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* in mixed culture for kefiran production. Journal of Bioscience and Bioenginering, 96; 279-284.

Chen, X.M., O'Hara, S.P., Nelson, J.B., Splinter, P.L., Small, A.J., Tietz, P.S., Limper, A.H. and Larusso, N.F. 2005. Multiple TLRs are expressed in human cholangiocytes and mediate host epithelial defense response to *Cryptosporidum parvum* via activation of NF-kB. The Journal of Immunology, 175; 7447-7456.

Chlubnova, I., Sylla, B., Nugier-Chauvin, C., Daniellou, R., Legentil, L., Kralova, B. and Ferrières, V. 2011. Natural glycans and glycoconjugates as immunomodulating agents. Natural Product Reports, 28(5); 937-952.

Cıszek-lenda, M., Nowak, B., Oeróttek, M., Górska-Fraczek, S., Gamıan, A., Marcınkıewıcz1, J. 2012. Immunosuppressive effect of systemic administration of *Lactobacillus rhamnosus* KL37C-derived exopolysaccharide on the OVA-specific humoral response. Central European Journal of Immunology, 37 (4); 338-344.

Ciszek-Lenda, M. 2011. Biological functions of exopolysaccharides from probiotic bacteria. Central European Journal of Immunology, 36; 51-55.

Costa, L.T., Kerkmann, M., Hartmann, G., Endres, S., Bisch, P.M., Heckl, W.M. and Thalhammer, S. 2004. Structural studies of oligonucleotides containing G-quadruplex motifs using AFM. Biochemical and Biophysical Research Communication. 4; 1065-72.

Daeschel, M.A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria foruse as food preservatives. Food Technology, 43; 154-167

Das, D., Mondal, S., Roy, S.K., Maiti, D., Bhunia, D.M., Maiti, T.K. and Islam, S.S. 2009. Isolation and characterization of a heteropolysaccharide from the corm of *Amorphophallus campanulatus*. Carbohydrate Research, 344; 2581-2585.

De Vuyst, L. and Degeest, B. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Review, 23; 153-177.

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

De Vuyst, L., Vanderveken, F., Van de Ven, S. and Degeest, B. 1998. Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. Journal of Applied Microbiology, 84; 1059-1068.

Degeest, B., Vaningelgem, F. and De Vuyst, L. 2001. Microbial physiology, fermentation kinetics, and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria. Interntional Dairy Journal, 11; 747-757.

Degn, S.E., Thiel, S. and Jensenius, J.C. 2007. New perspectives on mannan-binding lectin-mediated complement activation. Immunobiology, 4; 301-311.

Drinan, D. F., Tobin, S. and Cogan, T.M. 1976. Citric acid metabolism in hetero and homofermentative lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 31; 481-486.

Duboc, P. and Mollet, B. 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. International Dairy Journal, 11; 759–768.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28 (3); 350-356.

Endres, A.M., Krieg, K. and Hartmann, G. 2001. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. European Journal of Immunology, 31; 2154-2163.

Faber, E.J., Kamerling, J.P. and Vliegenthart, J.F. 2001. Structure of the extracellular polysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 291. Carbohydrate Research, 331; 183-194.

Fernández de Palencia, P., Werning, M.L., Sierra-Filardi, E., Dueñas, M.T., Irastorza, A., Corbí, A. and López, P. 2009. Probiotic properties of the 2-substituted (1,3)-β-Dglucan producing bacterium *Pediococcus parvulus* 2.6. Applied and Environmental Microbiology, 75; 4887-4891.

Foligne, B., Nutten, S., Grangette, C., Dennin, V., Goudercourt, D., Poiret, S., Dewulf, J., Brassart, D., Mercenier, A. and Pot, B. 2007. Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. World Journal of Gastroenterology, 14; 236-243.

Freitas, F., Alves, V.D. and Reis, M.A.M. 2011. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. Trends in Biotechnology, 29; 8-9.

Freitas, F., Alvesa, V.D., Paisa, J., Costaa, N., Oliveiraa, C., Mafrac, L., Hillioub, L., Oliveiraa, R. and Reisa, M.A.M. 2009. Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. Bioresource Technology, 100; 859-865.

Frengova, G.I., Simova, E.D., Beshkova, D.M. and Simov, Z.I. 2000. Production and monomer composition of exopolysaccharides by yogurt starter cultures. Canadian Journal of Microbiology, 46; 1123-1127.

Gamar-Nourani, L., Blondeau, K. and Simonet, J.M. 1997. Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. Journal of Applied Microbiology, 83;281-287.

Garai-Ibabe, G., Werning, M.L., López, P., Corbí, A.L. and Fernández de Palencia, P. 2010 Naturally occurring 2-substituted (1,3)-β-D-glucan producing *Lactobacillus suebicus* and *Pediococcus parvulus* strains with potential utility in the food industry. Bioresource Technology, 101; 9254-9263.

Glazer, A.N. and Nikaido, H. 2007. Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology, 2nd ed.; Cambridge University Press.

Gordon, S. 2002. Pattern recognition receptors: doubling up fort he innate immune responce. Cell, 111; 927-930.

Gorska, S., Grycko, P., Rybka, J. and Gamian, A. 2007. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: structure and biosynthesis. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 61; 805-818.

Gray, R.C., Kuchtey, J. and Harding, C.V. 2007. CpG-B ODNs potently induce low levels of IFN-alphabeta and induce IFN-alphabeta-dependent MHC-I cross-presentation in DCs as effectively as CpG-A and CpG-C ODNs. Journal of Leukocyte Biology, 81;1075-85.

Grobben, G. J., Smith, M. R., Sikkema, J. and de Bont, J. A. M. 1996. Influence of fructose and glucose on the production of exopolysaccharides and the activities of enzymes involved in the sugar metabolism and the synthesis of sugar nucleotides in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. Applied Microbiology and Biotechnology, 46; 279- 284.

Gruter, M., Leeflang, B.R., Kuiper, J., Kamerling, J.P. and Vliegenthart, F.G. 1993. Structural characterisation of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* grown in skimmed milk. Carbohydrate Research, 239; 209-226.

Gu, R.X., Liu, A.P., and Luo, C.X. 2000. A suitable culture medium for the production of exopolysaccharide by *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Journal of Northeast Agriculture University 7; 43-49.

Gursel, I., Gursel, M., Ishii, K.J., and Klinman, D.M. 2001. Sterically stabilized cationic liposomes improve the uptake and immunostimulatory activity of CpG oligonucleotides. Journal of Immunology, 167; 3324-3328.

Gursel, M. and Gursel, I. 2006. CXCL16 influences the nature and specificity of CpG-induced immune activation. Journal of Immunology, 177; 1575-1580.

Gursel, M., Verthelyi, D., Gürsel, I., Ishii, K.J. and Klinman, D.M. 2002. Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG oligonucleotide. Journal of Leukocyte Biology, 71; 813-820.

Hanagata, N. 2012. *S*tructure-dependent immunostimulatory effect of CpG ligodeoxynucleotides and their delivery system. International Journal of Nanomedicine, 7; 2181-2195.

Hartmann, G., Battiany, J., Poeck, H., Wagner, M., Kerkmann, M., Lubenow, N., Rothenfusser, S. and Endres, S. 2003. Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells. European Journal of Immunology, 33; 1633-1641.

Hashimoto, C., Hudson, K. L. and Anderson, K.V. 1988. The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. Cell 52; 269–279.

Heeg, K., Dalpke, A., Peter, M. and Zimmermann, S. 2008. Structural requirements for uptake and recognition of CpG oligonucleotides. International Journal of Medical Microbiology, 298; 33-38.

Hiroshima, Y., Bando, M., Kataoka, M., Inagaki, Y., Herzberg, M.C., Ross, K.F., Hosoi, K., Nagata, T. and Kido, J. 2012. Regulation of antimicrobial peptide expression in human gingival keratinocytes by interleukin-1alpha. Archives of Oral Biology, 56; 761-767.

Huang, T. C., Chan, H. Y., Wann, S. Y., Lin, F. M., Lee, F. .L., Liao, C. C. US 20110091432, 2011.

Hujanen, M. and Linko, Y.Y. 1996. Effect of temperature and various nitrogen sources on L-lactic acid production by *Lactobacillus casei*. Applied Microbiology and Biotechnology, 45; 307-313.

Iliev, I., Ivanova, I. and Ignatova, C. 2006. Glucansucrases from lactic acid bacteria. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 3; 15-20.

Ismail, B. and Nampoothiri, K. M. 2010, Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510. Archives of Microbiology, 192; 1049-1057.

Iwasaki, A. and Medzhitov, R. 2010. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. Science, 327; 291-295.

Iyer, A., Mody, K. and Bhavanath, J. 2006. Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide. Enzyme and Microbial Technology, 38; 220-222.

Janeway, C.A., Medzhitov, R. 2002. Innate immune recognition. Annual review of immunology, 20; 197-216.

Jung, J., Yi, A.K., Zhang, X., Choe, J., Li, L. and Choi, Y.S. 2002. Distinct response of human B cell subpopulations in recognition of an innate immune signal, CpG DNA. The Journal of Immunology. 169; 2368-2373.

Jurk, M., Schulte, B., Kritzler, A., Noll, B., Uhlmann, E., Wader, T., Schetter, C., Krieg, A.M. and Vollmer, J. 2004. C-Class CpG ODN: sequence requirements and characterization of immunostimulatory activities on mRNA level. Immunobiology, 209; 141-154.

Kabelitz, D. and Medzhitov, R. 2007. Innate immunity-croos talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines. Curent opinion in immunology, 19; 1-3.

Kanmani, P., Satish kumar, R., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukumar, V. and Arul, V. 2011. Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity in vitro. Bioresource Technology, 102(7); 4827-33.

Kawai, T. and Akira, S. 2009. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. International Immunology. 21(4); 317-37.

Kawai, T. and Akira, S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nature Immunology, 11(5); 373-84.

Kım, J. U., Younghoon, K., Kyoung-Sık, H., Sejong, O., Kwang-Youn, W., Jaı-Neung, K., and Sae-Hun K. 2006. Function of Cell-Bound and Released Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 Journal of Microbiology and Biotechnology, 16(6); 939-945.

Kimmel, S.A., Roberts, R.F. and Ziegler, G.R. 1998. Optimization of Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR Grown in a Semidefined Medium. Applied and Environmental Microbiology, 64; 659-664.

Krieg, A.M., Yi, A.K., Matson, S., Waldschmidt, T.J., Bishop, G.A., Teasdale, R., Koretzky, G.A. and Klinman, D.M. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. Nature, 374; 546-549.

Krug, A., Rothenfusser, S., Hornung, V., Jahrsdörfer, B., Blackwell, S., Ballas, Z.K., Endres, S., Krieg, A.M. and Hartmann, G. 2001. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. European Journal of Immunology, 31; 2154-2163.

Kumar, A.S., Mody, K. and Jha, B. 2007. Bacterial exopolysaccharides - a perception. Journal of Basic Microbiology, 47; 103-117.

Laws, A., Gu, Y. and Marshall, V. 2001. Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. Biotechnology Advances, 19; 597-625.

Lemoine, J., Chirat, F., Wieruszeski, J. M., Strecker, G., Favre, N., and Neeser, J.-R. 1997. Structural characterization of the exocellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* SFi39 and SFi12. Applied and Environmental Microbiology, 63; 3512-3518.

Li, J., Pei, H., Zhu, B., Liang, L., Wei, M., He, Y., Chen, N., Li, D., Huang, D. and Fan, D. 2011. Self-assembled multivalent DNA nanostructures for noninvasive intracellular delivery of immunostimulatory CpG oligonucleotides. ACS Nano, 5; 8783–8789.

Liu, S. Q. 2003. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentation. International Journal of Food Microbiol, 83; 115-131.

Looijesteijn, P. J., Trapet, L., de Vries, E., Abee, T. and Hugenholtz, J. 2001. Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. International Journal of Food Microbiology, 64; 71-80.

Ludwing, W., Neumaier, J., Klugbayer, N., Brockmann, E., Roller, C., Jilg, S., Reetz, K., Schaachtner, I., Ludwigsen, A., Wallner, G., Bachleitner, M., Fischer, U. and Scheleifer, K.H. 1993. Phylogenetic relationships of bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek, 64; 285-304

Maeda, H., Zhu, X., Omura, K., Suzuki, S. and Kitamura S. 2004. Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood glucose, and constipation. Biofactors, 22; 197-200.

Majamaa, H., Isolauri, E., Saxelin, M. and Vesikari, T. 1995. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. Journal olf Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 20; 333-338.

Makino, S., Ikegami, S., Kano H, Sashihara, T., Sugano, H., Horiuchi, H., Saito, T. and Oda, M. 2006. Immunomodulatory effects of polysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. Journal of Diary Science, 89; 2873-2881.

Marshall, J. D., Fearon, K., Abbate, C., Subramanian, S., Yee, P., Gregorio, J., Coffman, R. L. ans Van Nest, G. 2003. Identification of a novel CpG DNA class and motif that optimally stimulate B cell and plasmacytoid dendritic cell functions. Journal of Leukocyte Biology, 73; 781-792.

Marshall, M.V. and Rawson, H.L. 1999. Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt. International Journal of Food Science and Technology, 34; 137-143.

Martinez-Cánovas, M.J., Quesada, E., Martinez-Checa, F. and Béjar, V. 2004. A taxonomic study to establish the relationship between exopolysaccharideproducing bacterial strains living in diverse hypersaline habitats. Current Microbiology, 48; 348-353.

Mclnturff, J. E., Madlin, R. L. and Kim, J. 2005. The role of Toll-like receptors in the pathogenesis and reatment of dermatological disease. Journal of Investigative Dermatology, 1; 1-8.

Medzhitov, R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. Nature, 449; 819-826.

Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R. and Remaud-Simeson, M. 2001. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. Internatoinal Dairy Journal 11; 675-685.

Mozzi, F., Savoy de Giori, G., and Font de Valdez, G. 2003. UDP-galactose 4-epimerase: a key enzyme in exopolysaccharide formation by *Lactobacillus casei* CRL 87 in controlled pH batch cultures. Journal of Applied Microbiology, 94; 175-183.

Murofushi, M., Mizuguchi, J., Aibara, K. and Matuhasi, T. 1986. Immunopotentiative effect of polysaccharide from kefir grain, KGF-C, administered orally in mice. Immunopharmacology, 12; 29-35.

Murpy, M. K., Travers, P., Walport, M. ans Janeway, C. 2011. Janeway's Immunobiology. Garland Scince Eighth Edition.

Muzio, M., Polentarutti, N., Bosisio, D., Manoj Kumar, P. P. and Mantovoni, A. 2000. Toll-like receptor family and signalling pathway. Biochemical Society Transactions, 28; 563-566.

Nicolaus, B., Kambourova. M. and Oner, E.T. 2010. Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamentals to biotechnology. Environmental Technology, 31; 1145-1158.

Nishimura-Uemura, J., Kitazawa, H., Kawai, Y., Itoh, T., Oda, M. and Saito, T. 2003. Functional alteration of murine macrophages stimulated with extracellular polysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. Food Microbiology, 20; 267-273.

Notararigo, S., Nacher-Vasquez, M., Prieto, A., Aznar, R., Corbi, A., Lopez, P. and Fernandez de Palencia, P. 2011. Analysis, in an *in vitro* intestinal mucosa environment, of the immunomodulatory properties of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. International Scientific Conference of Probiotic and Prebiotics, Kosice, Slovakia.

Okamura, Y., Watari, M., Jerud, E. S., Young, D. W., Ishizaka, S.T., Jeffrey, R., Chow Jesse, C. and Strauss Jerome, F. 2001. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. The Journal of Biological Chemistry, 276; 10229-10233.

Orange, J. S. and Ballas, Z. K. 2006. Natural killer cells in human health and disease. Clinical Immunology, 118; 1-10.

Osmanagaoglu, O., Kiran, F. and Ataoglu, H. 2010. Evaluation of *in vitro* probiotic potential of *Pediococcus pentosaceus* OZF isolated from human breast milk. Probiotics Antimicrob Proteins. 2:162–174.

Osmanagaoglu, O., Kiran, F. and Nes, I.F. 2011. A probiotic bacterium, *Pediococcus pentosaceous* OZF, isolated from human breast milk produces pediocin AcH/PA-1. Afr J Biotechnol. 10(11):2017–2079.

Osmanagaoglu, O., Kiran, F., Yagci, F.C. and Gursel, I. 2012. Immunomodulatory function and in vivo properties of *Pediococcus pentosaceus* OZF, a promising probiotic strain. Ann Microbiol DOI 10.1007/s13213-012-0590-9.

Page, W.J. 1992. Production of Polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD in Beet Molasses Culture. FEMS Microbiology Review, 103; 149-158.

Pal, S., Mana, A., and Paul A.K. 1999. Production of Poly (β-hydroxybutyric acid) and Exopolysaccharide by *Azotobacter beijerinckii* WDN-01. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 15; 11-16.

Patel, S., Majumder A. and Goyal A. 2012. Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. Indian Journal of Microbiology, 52; 3-12.

Pena, C., Millán, M. and Galindo E. 2008. Production of alginate by Azotobacter vinelandii in a stirred fermentor simulating the evolution of power input observed in shake flasks. Process Biochemistry, 43; 775-778.

Petry, S., Furlan, S., Waghorne, E., Saulnier, L., Cerning Dagger, J. and Maguin, E. 2003. Comparison of the thickening properties of four *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains and physicochemical characterization of their exopolysaccharides. FEMS Microbiology Letters, 221; 285-291.

Prasher, R., Malik, R. K., and Mathur, D. K. 1997. Utilization of whey for the production of extracellular polysaccharide by a selected strain of *Lactococcus lactis*. Microbiologie Aliments Nutrition, 15; 79-88.

Rafter, J. 2002. Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. British Journal of Nutrition, 88; 89-94.

Rimada, P. S. and Abraham, A. G. 2003. Comparative study of different methodologies to determine the exopolysaccharide produced by kefir grains in milk and whey. Lait, 83; 79-87.

Rosado, F.R., Germano, S., Carbonero, E.R., Costa S.M.G., Jacomını, M. and Kemmelmeıer C. 2003. Biomass and Exopolysaccharide Production in Submerged Cultures of Pleurotus ostreatoroseus sıng., and Pleurotus ostreatus "florida". Basic Microbiology, 43; 230-237.

Rosalam, S. and England, R. 2006. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* spp. Enzyme and Microbial Technology, 39; 197-207.

Ruas- Madiedo, P., Hugenholtz, J. and Zoon, P. 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. International Dairy Journal, 12; 163- 171.

Ruas-Madiedo, P,. Gueimonde, M. and Margolles, A. 2006. Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. Journal of Food Protection, 69; 2011-2015.

Ruas-Madiedo, P. and de los Reyes-Gavila´n, C.G. 2005. Methods for the screening, isolation and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. Journal of Dairy Science, 88; 843-856.

Schleifer, K. H., Ehrmann, M., Beimfohr, C., Brockmann, E., Ludwing, W. and Aman, R. 1995. Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. International Dairy Journal, 5; 1081-1094.

Sharpe, M.E., Fryer, T.F. and Smith, D.G. 1966. Identification of lactic acid bacteria. Identification Methods for the Microbiologist seds. Gibbs, B. M. And Skinner, F.K. Academic Press, 145.

Shaun, L. 2011. Characterisation of Bacterial Exopolysaccharides. Ph.D. thesis, University of Huddersfield, 32 p.

Shiomi, M., Sasaki, K., Murofushi, M. and Aibara, K. 1982. Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from kefir grains. Japan Journal of Medical Science and Biology, 35; 75-80.

Staaf, M., Yang, Z., Huttunen, E., and Widmalm, G. 2000. Structural elucidation of the viscous exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* Lb161. Carbohydrate Research, 326; 113-119.

Sutherland, I. W. 1985. Biosynthesis of polysaccharides. Annual Review of Microbiology, 39; 243-270.

Sutherland, I. W., Rose, A. H. and Tempest, D.W. 1972. In Advances in Microbial Physiology. Academic Press, 143-213.

Sutherland, I.W. 1977. Surface Carbohydrates of the Prokaryotic Cell; Academic Press, London.

Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., Shamel, L., Sovath, S., Goode, J., Alexopoulou, L., Flavell, R. A. and Beutler, B. 2004. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101; 3516-3521.

Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S. 2003. Toll-like receptors. Annual review of immunology. 21; 335-76.

Takeda, K. and Akira, S. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. International Immunology, 1; 1-14.

Takeuchi, O. and Akira, S. 2002. Genetic approaches to the study of Toll-like receptor function. Microbes and Infection, 4; 887-895.

Takeuchi, O., Akira, S., Ishikura, H. ans Yano, A. 2003. TLR2 as an essential molecule for protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection. International Immunology, 15; 1081-1087.

Tallon, R., Bressollier, P. and Urdaci, M. C. 2003 Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. Research in Microbiology, 154; 705-712.

Tizard, I. R. 2004. Veterinary Immunology: An Introduction.7 th Edition, Saunders, pp. 293--299.

Todorov, S.D., Onno, B., Sorokine, O., Chobert, J.M., Ivanova, I. and Dousset, X. 1999. Detection and characterization of a novel antibacterial subsrance produced by *Lactobacillus fermentum* ST 31 isolated from sourdough. International Journal of Food Microbiology, 48; 167-177.

Torino, M.I., Mozzi, F., Sesma, F. and Font de Valdez, G. 2000. Effect of stirring on growth and phosphopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 in milk. Milchwissenschaft, 55; 204-207.

Tosi, M. F. 2005. Innate immune responses to infection. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 116; 241-249.

Tzianabos, A. O., Wang, J. Y. and Kasper, D. L. 2001. Structural rationale for the modulation of abscess formation by *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. Proceedings of the National Academy Science of USA, 98; 9365.

Underhill, D. M. and Ozinsky, A. 2002. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. Current Opinion in Immunology,14;103-110.

Van Calsteren, M. R., Pau-Roblot, C., Begin, A., and Roy, D. 2002. Structure determination of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains RW-9595 M and R. Biochemical Journal, 363; 7-17.

Van Casteren, W. H. M., de Waard, P., Dijkema, C., Schols, H.A., and Voragen, A. G. J. 2000. Structural characterisation and enzymatic modification of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B891. Carbohydrate Research, 327; 411-422.

Van Denbergh, P.A. 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. FEMS Microbiology Reviews, 12; 221-237.

Van Haverbeke, C., Bosso, C., Colin-Morel, P., Gey, C., Gamar-Nourani, L., Blondeau, K., Simonet, J.M., and Heyraud, A. 1998. Structure of an extracellular polysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. Carbohydrate Research, 314; 211-220

Van Ingelgem, F., Van der Meulen, R., Zamfir, M., Adriany, T., Laws, A.P. and De Vuyst, L. 2004. *Streptococcus thermophilus* ST 111 produces a stable high-molecular-mass exopolysaccharide in milk-based medium. International Dairy Journal, 14; 857-864.

Van Kranenburg, R. 1999. Exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*: A molecular characterisation. Ph.D. Thesis, University of Wageningen, The Netherlands.

Verthelyi, D., Ishiii K. J. , Gursel, M., Takeshita, F. and Klinman, D. M. 2001. Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. The Journal of Immunology,166; 2372-2377.

Vollmer, J. R. 2006. Editorial: CpG Motifs to Modulate Innate and Adaptive Immune Responses. International Reviews of Immunology, 25; 125-134.

Vollmer, J. R. and Krieg A. M. 2009. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. Advanced Drug Delivery Reviews, 61; 195-199.

Vollmer, J., Weeratna, R., Payette, P., Jurk, M., Schetter, C., Laucht, M., Wader, T., Tluk, S., Liu, M., Davis, H. L. and Krieg, A. M. 2004. Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. European Journal of Immunology, 34; 251-262.

Wagner, H. 2008. The sweetness of the DNA backbone drives Toll-like receptor 9. Current Opinion in Immunology, 20; 396-400.

Wang, D., Bhagat, L., Yu, D., Zhu, F. G., Tang, J. X., Kandimalla, E. R. and Agrawal, S. 2008. Oligodeoxyribonucleotide - Based Antagonists for Toll-Like Receptors 7 and 9. Journal of Medicinal Chemistry, 52; 551-558.

Wang, X., Yuan, Y., Wang, K., Zhang, D., Yang, Z. and Xu P. 2007. Deproteinization of gellan gum produced by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461. Journal of Biotechnology, 128; 403-407.

Wasser, S.P. 2011. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. Applied Microbiology and Biotechnology, 89; 1323-1332.

Watts, C., West, M. A. and Zaru, R. 2010. TLR signalling regulated antigen presentation in dendritic cells. Current Opinion in Immunology, 22; 124-130.

Whitfield, C. and Valvano, M., A. 1993. Biosynthesis and expression of cell-surfaces polysaccharides in gram-negative bacteria. Advances in Mcrobiology and Physiology, 35; 135-146.

Xu, X., Chen, P., Wang, Y. and Zhang, L. 2009. Chain conformation and rheological behavior of an extracellular heteropolysaccharide Erwinia gum in aqueous solution. Carbohydrate Research, 344; 113-119.

Yang, A., Staaf, M., Huttunen, E. and Widmalm, G. 2000. Strcuture of a viscous exopolysaccharide produced by *Lactobacilus helveticus* K16. Carbohydrate Research, 329; 465-469.

Zubillaga, M., Weill, R., Postaire, E., Goldman, C., Caro, R. and Boccio, J. 2001. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. Nutrition Research, 21; 569-579.

EKLER

EK1 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasal Bileşenler

EK 2 Çalışmada Kullanılan Tampon ve Çözeltilerin Bileşenleri

EK 3 Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası

EK 1 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasal Bileşenleri

Besiyeri içerikleri uygun miktarda distile su içerisinde çözülerek hazılanmış, yarı katı besiyeri için % 0.75, katı besiyeri içinse % 1.5 agar ilave edilmiştir. Sterilizasyon 121 °C'de 15 dakika süre ile yapılmıştır. Besiyerine ilave edilen ve sıcaklıktan etkilenebilen maddeler ise 0.22 μm membran filtreden (Sartorius, Germany) geçirilerek sterilize edilmiştir.

- **MRS (deMan Rogosa Sharpe) Besiyeri**

Bileşen	**Miktar (g/L)**
Kazein pepton	10
Et ekstraktı	8
Maya ekstraktı	4
Glukoz	20
Dipotasyum hidrojenfosfat	2
$MgSO_4.7H2O$	0.5
$MnSO_4.4H2O$	0.2
Tween 80	1
Triamonyum sitrat	2
Sodyum asetat	5
pH: 6.8 ± 0.2	

- **TGE (Tripton, Glukoz, Maya Ekstraktı) Besiyeri**

Bileşen	**Miktar (g/L)**
Tripton	10
Glukoz	10
Maya ekstraktı	10
Tween-80	1
$MgSO_4.7H2O$	0.05
$MnSO_4.4H2O$	0.05
pH: 6.8± 0.2	

EK 2 Çalışmada Kullanılan Tampon ve Çözeltilerin Bileşenleri

Bloklama Tamponu (Durdurma Tamponu) [ELİZA]

500 ml 1 x PBS
25 gram BSA (%5)
250 µl Tween 20 (%0,025)
20-30 dakkika manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak BSA kristallerinin iyice çözünmesi sağlanmalıdır. Bu tampon – 20°C'de saklanmalıdır.

T-hücre Tamponu [ELİZA]

500 ml 1 x PBS
25 ml FBS (%5)
250 µl Tween 20 (%0,025)
Bu tampon – 20°C'de saklanmalıdır.

Yıkama Tamponu [ELİZA]

500 ml 10 x PBS
2,5 ml Tween 20
4,5 lt dH_2O

PBS (Phosphate Buffered Saline / Fosfat Tamponlu Tuz) **[10x]**

80 gram NaCl
2 gram KCl
8.01 gram $Na_2HPO_4 . 2H_2O$
2 gram KH_2PO_4
1 lt ddH_2O pH=6,8
1X PBS pH sı 7,2 ile 7,4 arasında olmalıdır ve kullanılmadan önce otoklavlanmalıdır.

Yüksek Glukozlu DMEM ve RPMI-1640

10 ml FBS (%2)

25 ml FBS (%5)

50 ml FBS (%10)

5 ml penisilin/streptomisin (son konsantrasyonu 50 µg/ml olacak şekilde)

5 ml HEPES (son konsantrasyonu 10Mm olacak şekilde)

5 ml Na Prüvat (0,11mg/mL)

5 ml esansiyel olmayan aminoasit solüsyonu

5 ml L-glutamin

EK 3 Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası



30 Kasım-08 Aralık 2011

X. DENEY HAYVANLARI UYGULAMA VE ETİK KURSU

KATILIM SERTİFİKASI

Sayın, Kübra ALMACIOĞLU

Gazi Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu onayı ile Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi tarafından, 30 Kasım-08 Aralık 2011 tarihleri arasında düzenlenen **"Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu X"**a katılarak, Teorik ve Pratik Eğitimleri başarı ile tamamlamış ve bu sertifikayı almaya hak kazanmıştır.

Prof. Dr. Rıza AYHAN
Rektör

Prof. Dr. Gökhan ALPASLAN
Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Nurten TÜRKÖZKAN
Merkez Müdürü

Sertifika No. 2011/10-49

Generated by CamScanner from intsig.com

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Kübra ALMACIOĞLU

Doğum Yeri: Gaziantep

Doğum Tarihi: 31.07.1988

Yabancı Dili: İngilizce

Uyruğu: TC

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise :Gaziantep Merkez Anadolu Lisesi. -2002-2006

Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü. 2006-2010

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı-Biyoteknoloji. 2010-2013

Staj ve Deneyimleri

- 2007: 29 Aralık Devlet Hastanesi (Stajer)
- 2008: Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi (Stajer)
- 2012-2013 : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (Asistan Öğrenci)

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Posterler

1. **Almacıoğlu K**, Kıran F, Önlü H, Karataş E ve Osmanağaoğlu Ö (2012) Probiyotik özellik gösteren bazı laktik asit bakterilerinde ekzopolisakkarit miktarının tespiti için uygun izolasyon yönteminin belirlenmesi. **21. Ulusal Biyoloji Kongresi**, 3-7 Eylül, İzmir, Türkiye.
2. Kıran F, **Almacıoğlu K**, Önlü H, Alagözlü H ve Osmanağaoğlu Ö (2013) Ekzopolisakkaritlerin ptobiyotik açıdan önemi. **Uluslarası Katılımlı 1. Ulusal Probiyotik, Prebiyotik ve Foksiyonel Gıdalar Kongresi**, 11-13 Nisan, Antalya, Türkiye.

3. Yağci FC, Kıran F, **Almacıoğlu K**, Osmanağaoğlu Ö ve Gürsel İ (2013) DNA-bakteriyosin komplekslerinin immün düzenleyici etkisi. **22. Ulusal İmmunoloji Kongresi**, 27-30 Nisan, İzmir, Türkiye.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında (Proceedings) Basılan Posterler

1 .Kiran F, Yagci FC, **Almacioglu K**, Osmanagaoglu O and Gursel I (2011) Enhanced Immunostimulatory activity of bacteriocin CpG ODN nanocomplexes. **17th International Symposium on Biomedical Science and Technology (BIOMED 2011)**, 23-25 October, Ankara, Turkey.

2. Kiran F, **Almacioglu K**, Karatas E, Sakyp Z and Osmanagaoglu O (2012)Typing of the human and food origined *Pediococcus* strains by RAPD PCR. **15th Europeran Biotechnology Congress**, 23-26 September, Istanbul, Turkey.