



## *Lactobacillus* Cinsi Bakterilerinin Farklı Yöntemler ile Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi

Selin Ural\* , Zehranur Yüksekdağ 

Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 06500, Ankara, Türkiye

### Öne Çıkanlar

- *Lactobacillus* cinsine ait 20 bakterinin beş farklı metot ile antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir.
- Kullanılan yöntemlere göre, bakterilerin antioksidan aktivitelerinde farklılıklar olmuştur.
- Bakteri yoğunluğu fazla olduğunda daha yüksek antioksidan aktivite tespit edilmiştir.
- Bakteriler en iyi DPPH radikalini süpürerek yüksek antioksidan aktivite göstermişlerdir.

### Makale Bilgileri

Geliş: 05/11/2020  
Kabul: 22/11/2020

### Anahtar Kelimeler

*Lactobacillus* spp.,  
Probiyotik,  
Antioksidan aktivite

### Özet

Çalışmada, süt ürünleri kaynaklı *Lactobacillus* cinsine ait 20 bakterinin beş farklı metot ile (2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) serbest radikalini giderme, Fe<sup>2+</sup> iyonu şelatlama, plazma lipid peroksidasyonu, hidroksil radikalini süpürücü aktivitesi ve süperoksit anyon radikalini süpürücü aktivitesi) antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Suşların, metotların hepsinde farklı oranlarda antioksidan etki gösterdiği bulunmuştur. Suşların DPPH serbest radikalini giderme yeteneği değerlendirildiğinde, *Lactobacillus brevis* KIR12 suşunda %81,9 oranında en yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bakterilerin metal şelatlama aktiviteleri %40,5 ile %31,8 arasında değişirken, en yüksek aktiviteyi *L. fermentum* BP5 suşu göstermiştir. Çalışmada lipid peroksidasyonunun inhibisyonunda suşlar arasındaki en yüksek inhibisyon *L. rhamnosus* SMC6 suşunda %39,2 olarak, en düşük inhibisyonu ise *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 12L suşunda %30,2 olarak tespit edilmiştir. Çalışılan kültürler arasında, hidroksil radikalini süpürücü etki gösteren suşların *L. fermentum* FKK3 (%45,8) ve *L. brevis* YG7 (%43,6) olduğu belirlenmiştir. Suşlar arasındaki süperoksit radikalini süpürücü aktiviteleri kıyaslandığında ise; %75,0 ile %10,4 aralığında değişen değerler tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda, kullanılan yöntemlere göre bakterilerin antioksidan aktivitelerinde farklılık olduğu belirlenmiştir. Antioksidan aktivitesi yüksek yetenekteki suşların gıda alanında yeni potansiyel antioksidan ajanlar olarak kullanılabilirlerdir.

## Determination of Antioxidant Activities of *Lactobacillus* Genus Bacteria by Different Methods

### Highlights

- The antioxidant activities of 20 *Lactobacillus* bacteria were determined by five different methods.
- According to the methods used, there were differences in the antioxidant activities of bacteria.
- When the bacteria density is higher, higher antioxidant activity was detected.
- The bacteria were showed high antioxidant activity by scavenging the best DPPH radical.

### Article Info

Received: 05/11/2020  
Accepted: 22/11/2020

### Keywords

*Lactobacillus* spp.,  
Probiotic,  
Antioxidant activity

### Abstract

In this study, antioxidant activities of 20 *Lactobacillus* bacteria that originated from dairy products were investigated by five different methods (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging, ferrous ions (Fe<sup>2+</sup>) chelating capacity, plasma lipid peroxidation, hydroxyl radical, and superoxide radical scavenging activity). It was determined that the strains have different antioxidant effects in all of the methods. When the DPPH free radical scavenging ability of the strains was evaluated, it was determined that *Lactobacillus brevis* KIR12 strain had the highest activity at a rate of 81.9%. Fe<sup>2+</sup> chelating activities of the bacteria were in the range of 31.8 – 40.5% and *L. fermentum* BP5 showed highest activity (40.5 %) among the others. In the present study while *L. rhamnosus* SMC6 has highest lipid peroxidation inhibition (39.2%), *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 12L has lowest inhibition (30.2%). Among the cultures studied, the strains showing hydroxyl radical scavenging effect were *L. fermentum* FKK3 (45.8%) and *L. brevis* YG7 (43.6%). When the superoxide radical scavenging activities among the strains are compared; values varying between 75.0% and 10.4% were determined. As a result of this study, it was determined that there is a difference in antioxidant activities of bacteria according to the methods used. The strains that have high antioxidant activity may be used as a new potential antioxidant agents in food industry.



Hava kirliliği, bozulmuş gıdalar ve ilaçlar gibi faktörler sonucunda oluşan serbest radikaller, vücuttaki hücrelere saldırarak tahribata yol açmaktadır [1]. Serbest radikaller biyolojik sistemlerde çok reaktiftir. Serbest radikallerin vücutta aşırı üretilmesi sonucunda ateroskleroz, kanser, kronik böbrek hastalığı, nörodejeneratif hastalıklar, Alzheimer hastalığı, siroz, artrit ve Parkinson hastalığı gibi yaşamı tehdit eden hastalıklara neden olabilmektedir [2, 3]. Hücrelerin bu reaktif türlere (serbest radikaller) karşı savunma kabiliyetini arttırmak için, antioksidanlar olarak adlandırılan bazı doğal ve kimyasal bileşikler bulunmaktadır [4]. Antioksidanlar, serbest radikallerin ara ürünlerini kaldırarak zincir reaksiyonlarını sonlandırmakta ve kendilerini oksitleyerek diğer oksidasyon reaksiyonlarını inhibe etmektedirler [5].

Antioksidanlar, doğal ve sentetik antioksidanlar olarak iki gruba ayrılırlar [4]. Sentetik antioksidanlar, daha yüksek performans ve stabilite, düşük maliyet ile geniş kullanılabilirlik sunmaları nedeniyle doğal antioksidanların yerine kullanımı yaygındır [6]. Sentetik antioksidanların suda çözünürlüğünün az olması, pahalı olması, antioksidan verimliliğinin düşük olması ve yüksek toksisite göstermeleri nedeniyle daha fazla antioksidan aktivite gösteren ve ekonomik olan doğal antioksidanlar son yıllarda daha çok tercih edilmektedir [4].

Son yıllarda yapılan çalışmalar, vücudun oksidatif stresle savaşmasına yardımcı olmak için yeni moleküllerin ve maddelerin araştırılmasına odaklanmıştır; bunlardan biri de probiyotik bakterilerin kullanımınıdır [2, 7, 8]. Probiyotiklerin antioksidatif enzimleri ve bağışıklık arttırıcı etkileri değiştirerek oksidatif stresi azalttığı ve antioksidan etkiler sergilediği gösterilmiştir [7]. Antioksidan maddelerin üretilmesi ve serbest radikal temizleme faaliyetleri dışında, probiyotiklerin aynı zamanda bir dereceye kadar metal şelatlama faaliyetleri de gösterdiği rapor edilmiştir [9]. Farklı cinslere ait birçok mikroorganizma probiyotik olarak kullanılırken, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Streptococcus* türleri en yaygın kullanılan probiyotik bakterilerdir [2]. Probiyotikler içerisinde yer alan laktik asit bakterileri (LAB) yaygın olarak gıda ve tıp alanında kullanılmaktadır [10]. Laktik asit bakterilerinin, içerisinde yer alan *Lactobacillus* cinsi bakterilerin insan sağlığı üzerindeki probiyotik etkileri dikkat çekicidir. *Lactobacillus* türleri sağlıklı insan mikrobiyotasının önemli üyeleridir [11] ve insan bağırsak sisteminde yüksek hayatta kalma oranına sahiptir. Ayrıca, fenolik bileşikler dahil antioksidan metabolitler üretmek iyi antioksidan aktivite sağlarlar [12]. Bu çalışmada, potansiyel probiyotik *Lactobacillus* cinsi bakterilerin farklı yöntemlerle antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi ve kullanılan antioksidan yöntemleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olup olmadığının belirlenmesi hedeflenmiştir.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Bakteriler ve Gelişme Ortamları

Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonunda bulunan peynir ve yoğurttan izole edilmiş ve 16S rDNA ile moleküler olarak tanımlanmış *Lactobacillus brevis*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* türlerine ait 20 potansiyel probiyotik suş kullanılmıştır. *Lactobacillus* cinsi bakteriler Man Rogosa Sharpe (MRS) besiyerinde uygun sıcaklıklarda (37°C, 42°C) 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Geliştirilen mikroorganizmaların saflığı kontrol edilerek, steril edilmiş gliserol içerisinde 1:1 oranında stok alınmış ve -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Bakterilerin antioksidan aktivitelerinin direk etkisini belirlemek amacıyla pellet ile çalışılmıştır. Pelletlerin hazırlanması: Bakteriler, OD 600 nm ≈0,600'e ayarlandıktan sonra MRS sıvı besiyerine aktarılıp uygun koşullarda 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler fosfat tamponu (PBS; 8 g/L NaCl; 1,21 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,34 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,2) ile 13000 rpm'de 15 dk süreyle iki defa yıkanmıştır. Yıkanmış pellet 10 mL PBS içerisinde McFarland 5'e (10<sup>11</sup> kob/mL) ayarlanmıştır. 13000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant dökülüp pellet 1 mL PBS ile süspanse edilmiştir.

### 2.2. Antioksidan Aktivite

**Serbest radikal (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil-DPPH) giderme etkisi:** 1 mL'lik örneklerin üzerine 1 mL DPPH (Sigma-Aldrich) eklenerek, karanlık ortamda 1 saat bekletilmiştir. Bekleme sonunda örnekler 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatantlar 517 nm'de spektrofometrik olarak ölçülmüştür [13].

Suşların % DPPH radikalini gideriminin hesaplanması ise;

$$\% \text{ Süpürücü Aktivite} = [1 - (A_{\text{örnek}} - A_{\text{körve}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

Körve= PBS çözeltisi

Kontrol= PBS çözeltisi ve DPPH çözeltisi

**Metal (Fe<sup>2+</sup>) iyonu şelatlama aktivitesi:** 1 mL PBS ile süspanse edilen pellete 2 mM 0,05 mL FeCl<sub>2</sub> ve 5 mM 0,2 mL ferrozin eklenerek karanlık ortamda 10 dakika bekletilmiştir. Bekleme sonunda örnekler 13000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Şelatlama aktivitesi için 562 nm dalga boyunda yapılan ölçüm sonucu optikal yoğunluktaki azalma belirlenerek hesaplama yapılmıştır [14].

Şelatlama aktivitesinin hesaplanması;

$$\% \text{ Demir iyonu şelatlama yeteneği} = [1 - (OD_2 / OD_1)] \times 100$$

OD<sub>2</sub>: PBS ile FeCl<sub>2</sub> ve ferrozin solüsyonu, OD<sub>1</sub>: Örnek

**Plazma lipit peroksidasyonunun önlenmesi:** Çalışma Ou ve arkadaşlarının [15] önerdiği metoda göre yapılmıştır. Yoğunluğu ayarlanan bakterilerden 400 µL alınarak, üzerine 400 µL plazma, 100 µL FeSO<sub>4</sub> ve 100 µL hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ilave edilmiştir. 37°C de su banyosunda 12 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda %4 TCA (trikloroasetik asit) ve yapay oksidan olan butilhidroksianizol (BHA) ortama eklenmiş ve karışım buz banyosunda bekletilmiştir. İndikatör tiobarbitürik asit (TBA) eklenip 100°C'lik su banyosunda 30 dk bekletilmiş ve soğuduktan sonra 532 nm dalga boyunda spektrofometrik olarak ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bakterilerin lipit peroksidasyonunu inhibe etme yüzdeleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Plazma lipit peroksidasyonu inhibisyon oranı} = [1 - A_{532}(\text{Örnek}) / A_{532}(\text{Kontrol})] \times \%100$$

Kontrol: PBS çözeltisi

**Hidroksil radikal süpürücü aktivitesi:** Çalışma Wang ve arkadaşlarının [16] önerdiği metotta modifikasyon yapılarak çalışılmıştır. Örneklerin üzerine 1 mL brilliantblue (0,435 mM), 2 mL FeSO<sub>4</sub> (0,5 mM), 1,5 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%3, w/v) ilave edilmiş ve 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Örnekler 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve 624 nm de absorbansları ölçülmüştür. Bakterilerin hidroksil radikalini süpürücü etkisi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

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

A<sub>0</sub>: Belirli bir konsantrasyonda örnek içeren çözeltinin absorbans değeri

A<sub>1</sub>: Örnek olmadığı çözeltinin absorbans değeri

A: Örnek ve Fenton reaksiyon sistemini içermeyen çözeltinin absorbans değeridir.

**Süperoksit anyon radikali süpürücü aktivitesi:** Süspanse edilen örneklerin üzerine 25°C de ısıtılmış 0,2 mL pyrogallol (3 mM) ilave edilmiştir. Karışımın absorbansı 325 nm'de ölçülmüş ve yüzde süperoksit anyonu radikalini süpürücü aktivitesine göre tespit edilmiştir [16].

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

A<sub>1</sub>: Örneklerin absorbands değeri

A<sub>0</sub>: Örnek içermeyen çözeltinin absorbands değeri

### 2.3. İstatiksel Analizler

Tüm çalışmalar 2 paralelli ve 3 tekerrürlü olarak yapılmış ve bulunan değerlerin ortalama sonuçları verilmiştir. İstatiksel analizlerde SPSS Inc. Software (16.0 versiyonu, SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılmıştır. Bakterilerin antoksidan aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan metotlar arasında anlamlı farklılık olup olmadığını belirlemek amacıyla tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır.

### 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

İnsanlar yaşlandıkça, hücrelerin yapısında biriken ROS hasarı sonucu nörodejeneratif hastalıklar ve kanser ortaya çıkmaktadır [7]. Bazı araştırmacılar probiyotiklerin ROS birikimini azalttığı ve oksidatif strese karşı koruyucu etkisinin olduğunu bildirmişlerdir [7, 17-19]. *Lactobacillus* cinsine ait türlerin, probiyotik özelliklerinin yanı sıra fenolik bileşikler dahil olmak üzere antioksidan metabolitler üreterek yüksek antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir [12, 20-22]. Çalışmada süt ürünlerinden izole edilen *Lactobacillus* cinsine ait 20 suşun, DPPH giderme, Fe<sup>+2</sup> şelatlama, lipit peroksidasyonunun inhibisyonu, hidroksil radikal süpürücü aktivitesi ve süperoksit radikal süpürücü aktivitesi gibi farklı metotlar ile antioksidan etkileri belirlenmiştir. Suşların hepsinde denenen yöntemlerde farklı miktarlarda antioksidan etki olduğu belirlenmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Suşların antioksidan aktiviteleri (%)

Suşlar	DPPH radikali giderim yeteneği (%) <sup>b,c,d,e</sup>	Fe iyonu şelatlama (%) <sup>a,d,e</sup>	Lipit peroksidasyonunu inhibe etme yeteneği (%) <sup>a,e</sup>	Hidroksil radikali süpürücü aktivitesi (%) <sup>a,b,e</sup>	Süperoksit anyon radikali süpürücü aktivitesi (%) <sup>a,b,c,d</sup>
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> 12L	61,8±4,9	34,1±0,8	30,2±1,0	22,9±3,9	50,0±3,9
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> 15L	56,3±3,1	35,4±1,9	34,0±3,9	21,9±2,8	27,1±2,8
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> 26L	77,7±4,2	37,5±1,1	31,8±3,4	21,1±2,9	10,4±2,9
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> 31L	62,1±4,4	36,4±1,3	32,7±2,7	12,1±2,4	47,9±2,4
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> 37L	71,1±1,5	36,8±3,9	31,9±2,3	8,0±1,3	66,7±4,3
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> 43L	61,2±2,1	31,8±1,5	32,2±3,0	23,2±1,8	43,7±1,8
<i>L. brevis</i> KIR12	81,9±4,2	32,9±0,8	31,1±1,5	31,0±1,3	45,8±1,3
<i>L. brevis</i> KIR3	63,3±2,2	36,0±3,5	32,9±1,2	16,1±2,3	37,5±2,3
<i>L. brevis</i> SU1	64,4±3,2	36,3±3,2	36,3±1,8	22,3±1,2	31,2±4,2
<i>L. brevis</i> YG7	70,6±3,4	37,0±2,4	31,1±2,1	43,6±3,8	75,0±3,8
<i>L. brevis</i> YG9	72,9±3,5	33,8±1,6	30,9±3,8	27,1±2,3	56,2±2,4
<i>L. casei</i> EMP2	78,5±1,1	35,7±2,7	31,2±1,2	24,8±2,4	39,6±3,2
<i>L. fermentum</i> BP5	66,0±2,7	40,5±2,4	30,4±1,7	42,2±3,2	54,2±1,7
<i>L. fermentum</i> FKK3	64,7±2,7	37,6±1,9	30,5±0,9	45,8±1,7	60,4±1,2
<i>L. fermentum</i> IP5	63,4±4,4	34,4±0,9	31,3±3,1	26,1±1,2	45,8±4,3
<i>L. helveticus</i> SU2	63,2±4,1	33,5±2,8	33,2±3,3	23,1±3,3	70,8±1,8
<i>L. rhamnosus</i> CEP1	62,9±3,2	34,0±1,6	31,4±2,9	25,0±1,8	64,6±4,1

<i>L. rhamnosus</i> SU3	71,6±3,5	36,1±2,3	32,4±3,6	29,4±2,2	41,2±4,2
<i>L. rhamnosus</i> SU4	62,6±3,2	34,9±1,7	30,3±2,5	27,7±2,8	52,1±2,8
<i>L. rhamnosus</i> SMC6	62,8±2,3	36,6±2,8	39,2±4,2	28,4±3,1	66,7±2,3

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

Antioksidan aktivitenin belirlenmesinde sıkça kullanılan metotlardan biri DPPH giderim yeteneğinin test edilmesidir. DPPH radikali antioksidan varlığında DPPH-H formuna dönüşmektedir. DPPH radikal süpürücü yöntemi; kolaylığı, hızı, diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında hassasiyeti ve tekrarlanabilirliği açısından antioksidan aktivite çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ortama DPPH radikali verildiğinde oluşan mor rengin giderimi ile orantılı olarak antioksidan aktivite artmaktadır. 517 nm de maksimum absorpsiyon gösteren DPPH radikali antioksidan varlığında mor rengi sarıya dönmektedir. Bu nedenle spektrofotometrik olarak çalışılmaktadır [23]. Ortama verilen bir çeşit radikal madde olan DPPH'nin bakterilerin etkisiyle süpürülmesinin test edilmesiyle, suşların antioksidan aktiviteleri belirlenmektedir. Suşların radikal süpürücü aktivitesi spektrofotometrik metot ile tespit edilmiştir. En yüksek aktivite *L. brevis* KIR12 (%81,9) ve *L. casei* EMP2 (%78,5) suşlarında görülmüştür. Çalışılan diğer suşlara kıyasla DPPH giderim aktivitesi en az olan *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 15L suşu (%56,3) olarak tespit edilmiş ve *Lactobacillus* cinsi bakterilerle yapılan çalışmalarda suşlardan daha yüksek DPPH giderim aktivitesi gösterdikleri belirlenmiştir. 11 LAB (*Leuconostoc* sp. ve *Lactobacillus* sp.) ile yapılan bir çalışmada bakterilerin, DPPH radikal süpürücü aktivitelerini %50'ye yakın ve üzerinde bulmuşlardır. Bu suşların çevresel faktörleri optimize ederek, antioksidan kapasitelerini arttırarak endüstriyel materyal olarak kullanılabilirliği bildirilmiştir [20]. Yang ve diğerlerinin [7] yapmış oldukları çalışmada DPPH süpürücü etkinliği  $10^8$  kob/mL'lik *L. plantarum* 200655 suşunda %30,51 ile en yüksek aktiviteyi, *L. rhamnosus* GG %27,93 ve *L. plantarum* KCTC 3108' de %20,20 oranında bulmuşlardır. Zhang ve diğerleri [11], *L. casei* subsp. *casei* SY13 ve *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LJJ suşlarının ( $10^9$  kob/mL) DPPH radikal süpürücü aktivitelerini sırasıyla %23,99 ve %27,50 olarak bulmuşlardır. Bakterilerin DPPH radikal süpürücü aktivitelerinin yoğunluğa bağlı olarak değiştiği görülmektedir.

Antioksidan aktivitenin belirlenmesinde çalışılan bir diğer yöntem ise  $Fe^{+2}$  iyonu şelatlama aktivitesinin tespit edilmesidir. Hayatımız için temel elementlerden biri olan demir, aynı zamanda protein, lipit ve diğer bileşenlerle reaksiyonlara girerek oksidatif hasara neden olabilmektedir [24]. Ferrozin, ferröz iyonları gibi +2 değerlikli metal iyonları ile kompleks oluşturmaktadır. Oluşan renkli ferrozin-metal kompleksi ise 562 nm'de maksimum absorpsiyon göstermektedir. Metal şelatlayıcı ajanların (antioksidan madde) varlığında, kompleks oluşmaz ve meydana gelen mor renkte açılma gerçekleşir. Dolayısıyla 562 nm absorpsiyonunda meydana gelen azalma yani renkteki açılma metal şelatlamasının göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada bakterilerin  $Fe^{+2}$  iyonu şelatlama aktivitesi,  $FeCl_2$ 'nin ferrozin ile koyu mor renkli bir kompleks oluşturmaya dayanılarak spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Antioksidan maddeler tarafından şelatlanan demir iyonları ferrozin tarafından bağlanamayacağı için oluşacak olan mor renk şiddeti azalacak ve absorpsiyon daha düşük olacaktır. Denenen tüm suşların metal ( $Fe^{+2}$ ) iyonu şelatlama etkisinin olduğu belirlenmiştir. En yüksek aktiviteyi *L. fermentum* BP5 suşu %40,5, en düşük aktiviteyi ise *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 43L suşu %31,8 oranında göstermiştir. Düşük aktivite gösteren 43L suşunun DPPH giderim aktivitesine bakıldığında ise, ortalama bir değerde (%66) etki gösterdiği tespit edilmiştir. DPPH giderimi en yüksek olan *L. brevis* KIR12 suşunun da metal şelatlamada çok yüksek bir etkiye sahip olmadığı (%32,9) gözlenmiştir. Riane ve arkadaşları [2] probiyotik bir bakteri olan *Lactobacillus plantarum* 15 suşunun, demir iyonlarını %20,52 oranında şelatlama kapasitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LJJ ile *L. casei* subsp. *casei* SY13 suşlarının pellet ve süpernatantın şelatlama aktivitesinin araştırıldığı çalışmada, SY13 ve LJJ suşlarının farklı oranlarda  $Fe^{+2}$  şelatlama aktivitesi sergilediğini, şelatlama yeteneğinin pellette (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LJJ %50,55), süpernatanta göre daha yüksek olduğunu rapor edilmiştir [11].

Oksidasyon reaksiyonları sırasında serbest radikaller, reaktif oksijen türleri ve toksik ürünler ortaya çıkarak biyolojik moleküllerde hasara yol açmaktadır [21]. Reaktif oksijen türlerinin yol açtığı hasarlardan biri de lipitler üzerinedir. Hücrelerdeki zar fosfolipitlerinin yükseltgenerek peroksit türevlerine dönüşmesi lipit peroksidasyonu olarak tanımlanır [25]. Bu çalışmada, bakterilerin lipit peroksidasyon inhibisyon oranı

%39,2-30,2 arasında farklılık göstermektedir. *L. rhamnosus* SMC6 (%39,2) ve *L. brevis* SU1 (%36,3) suşlarında yüksek inhibisyon gözlenmiştir. Laktik asit bakterilerinin lipit peroksidasyon inhibisyonunda  $10^9$  kob/mL bakteri yoğunluğunda en yüksek aktiviteyi %64,4 (*L. brevis* MG882402)- %31,8 (*L. acidophilus* ATCC 4356) oranında değiştiğini bildirilmiştir [12]. Bu çalışmada daha yoğun bir bakteri canlı hücre sayısı ( $10^{11}$  kob/mL) ile çalışılmasına rağmen *L. brevis* SU suşu %31,8 ile en düşük inhibisyon yeteneği göstermiştir. Buda lipit peroksidasyon inhibisyonunun aynı türde suşa bağlı olarak değişebileceğini düşündürmüştür. Başka bir lipit peroksidasyonu inhibisyonu çalışmasında, *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 ve *L. acidophilus* ATCC 4356 bakterilerinin ( $10^9$  kob/mL de) pellet ve süpernatantında inhibisyon oranlarının %11 ile %29 arasında değiştiği rapor edilmiştir [21]. Bu çalışmada ise, bakterilerin yoğunluğu  $10^{11}$  kob/mL olup, lipit peroksidasyonu inhibisyon oranları da %30 ile %39,2 arasında değişen değerlerdedir. Kullanılan yoğunluğa bağlı olarak plazma lipit inhibisyonunun değiştiği düşünülmektedir. Ayrıca; Kaizu ve arkadaşları [26] heterofermentatif suşların daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Lipit peroksidasyon inhibisyonu çalışmasında, %39,2 oranında en yüksek aktiviteyi gösteren suş (*L. rhamnosus* SMC6) homofermentatif olmasına karşın, bir diğer yüksek inhibisyon yeteneğindeki *L. brevis* SU1 (%36,3) suşu heterofermentatiftir. Dolayısıyla bu çalışmada test edilen antioksidan aktivite metodlarında heterofermentatif laktik asit bakterilerinin yüksek olsa da istisnaların mevcut olabileceğini, farklı yöntemlerde farklı sonuçların alınabileceğini göstermektedir.

Reaktif oksijen türleri arasında, hidroksil radikali en reaktif kimyasaldır ve makromoleküllerde ciddi hasara yol açar [27]. Hidroksil radikali (OH•), Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten ortaya çıkmaktadır. Bu çalışmada hidroksil radikalini süpürücü etkide, en yüksek aktiviteyi gösteren suşların *L. fermentum* FKK3 %45,8 ve *L. brevis* YG7 %43,6 olduğu tespit edilmiştir. Noreen vd. [12] yapmış oldukları bir çalışmada, laktik asit bakterilerinin hidroksil radikali süpürücü aktivitesini  $10^9$  kob/mL bakteri yoğunluğunda en yüksek aktiviteyi %53,2- %66,4 oranında değiştiğini tespit etmişlerdir. Sonuçlar, Li ve arkadaşlarının [13] yaptıkları benzer bir araştırmanın sonuçları ile paralel çıkmıştır. Geleneksel Çin fermente gıdalarından izole edilen 11 det *L. plantarum* suşunun hidroksil radikali süpürücü aktiviteleri incelemişler. Test edilen 11 suş arasından *L. plantarum* C88 suşunun ( $10^{10}$  kob/mL, %44,31) yüksek inhibisyon gösterdiği,  $10^8$ - $10^{10}$  kob/mL farklı konsantrasyonlarda doza bağlı olarak hidroksil radikali süpürücü aktivitesinin değiştiği rapor edilmiştir.

Süperoksit radikalleri, mitokondride elektron taşıma zinciri reaksiyonlarının bir yan ürünü olarak oluşur ve hücre için tehlikelidir. Önemli bir antioksidan savunma sistemi elemanı olan süperoksit dismutaz enzimi, süperoksit içindeki oksijen ve hidrojen peroksiti katalize eden bir enzim olup oksijenin toksik formuna karşı vücudumuzu korur [12, 20]. Ji ve arkadaşlarının [20] yaptıkları bir çalışmada, *Leuconostoc* sp. ve *Lactobacillus* sp. suşlarını (0,2 mL) kullanarak, pirogallol oto-oksidasyonu ile süperoksit anyon radikallerini süpürücü aktivitesini test etmişlerdir. SOD aktivitesini pellette çalıştıkları 11 suşun (*Leuconostoc* sp. E1 ve E2 suşu dışında) %35'in üzerinde süpürücü aktivite gösterdiğini, *Lactobacillus* sp. S1 suşunun en yüksek aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişler. Pelletin saflaştırılmasıyla daha yüksek bir aktivite tespit edildiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada pirogallol ile çalışılmış olup, suşlar arasındaki süpürücü aktivite kıyaslandığında ise, %75,0 ile %10,4 aralığında değişen değerler tespit edilmiştir. En yüksek aktiviteyi gösteren suşun (*L. brevis* YG7 %75) aynı zamanda hidroksil radikal süpürücü aktivitesinin de yüksek olduğu (%43,6) bulunmuştur. Bu çalışmada, 1 mL konsantrasyonunda bakteri hücre pelleti kullanılırken, Ji ve arkadaşlarının [20] çalışmalarında 0,2 mL konsantrasyonunda hücre pelleti ile çalışmışlardır. Sonuçların konsantrasyona bağlı olarak değiştiğini, bakteri yoğunluğu fazla olduğunda daha yüksek süpürücü aktivite sergiledikleri görülmektedir.

Protein türevi peptitler gibi biyoaktif bileşikler, serbest radikalleri nötralize ederek bu bileşiklerin gıda ürünlerindeki etkisini azaltmada önemli bir role sahiptir [28]. Virtanen ve arkadaşlarının [22] yapmış oldukları çalışma sonucunda süt proteini hidrolizatları ile hidrolizden sonra salınan peptitlerin antioksidan aktivitesi tanımlanmıştır. Antioksidan aktivitenin bazı amino asit dizilerine bağlı olduğu ve yüksek konsantrasyonlarda histidin ve bazı hidrofobik amino asitler ile ilgili olduğu bildirilmektedir. Herna'ndez-Ledesma ve arkadaşları [29] tarafından yapılan çalışmada tanımlanan bir peptit (Trp-Tyr-Ser-Leu-Ala-Met-Ala-Ser-Asp-Ile), BHA'dan daha yüksek radikal süpürücü aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur. Buna ek

olarak, bazı serbest amino asitlerin (çoğunlukla aromatik), antioksidan özelliğe sahip olduğu da bilinmektedir. Ayrıca araştırmalarda, süt bileşenleri oksidasyon zincir reaksiyonlarını serbest radikal süpürücü özelliği ile sonlandırıldığı rapor edilmektedir [22]. *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* IFO 13953 ile fermente edilmiş süttten izole edilen κ-kazeinin özellikle Ala-Arg-His-Pro-His-Pro-His-Leu-Ser-PheMet dizilimindeki peptidinin DPPH radikalini indirgeme aktivitesi sergilediği rapor edilmiştir. Bu antioksidan peptit IFO 13953 laktik asit fermentasyonu ile oluşturulan bir peptit olduğu tahmin edilmiştir. Bu peptidin DPPH radikalini temizleme etkinliği BHT'e göre düşük olmasına rağmen, peptit β-karoten renk giderimi sistemi BHT'den yaklaşık 5 kat daha güçlü antioksidan aktivite göstermiştir [30].

LAB çeşitli yollarla antioksidan aktivite gösterir, süperoksit dismutaz (SOD) gibi enzimleri salgılayarak doğal hücrel antioksidan savunmayı güçlendirebilirler. Büyük enzimatik olmayan antioksidan ve serbest radikal temizleyici olan glutatyonun (GSH) üretilmesini sağlar. Ayrıca, ekzopolisakaritler (EPS) gibi bazı antioksidan biyomoleküllerin üretimini de uyarır [31]. LAB'de glutatyon dışında birkaç düşük molekül antioksidan da bildirilmiştir. Laktik asit bakterilerinden elde edilen düşük molekül ağırlıklı antioksidanların gıda endüstrisi ve insan sağlığı için son derece faydalı olması beklenmektedir. Bugüne kadar, LAB'de manganez süperoksit dismutaz ve NADH peroksidaz gibi çeşitli antioksidan enzimleri bildirilmiştir. LAB'de antioksidan ferritin-likeiron-binding proteini (Dpr) adı verilen bir demir bağlayıcı protein de tespit edilmiştir. Dpr üzerinde yapılan çalışma sırasında, serbest hücre ekstraktları düşük molekül ağırlıklı fraksiyonu ile fenton reaksiyonu inhibe aktivitesi tespit edilmiştir. Dpr proteini üzerine çalışmalar sürmektedir. Tüm bu veriler probiyotiklerin özellikle de laktik asit bakterilerinin, reaktif oksijen türlerinin (ROS), gastrointestinal bozukluklarda terapötik bir role sahip olabileceğini düşündürmektedir [10].

Bu çalışma sonucunda test edilen suşların farklı oranlarda olmakla birlikte antioksidan yetenekte oldukları bulunmuştur. DPPH radikali süpürücü aktivite, Fe<sup>+2</sup> şelatlama, lipit peroksidasyonunu inhibe etme, hidroksil radikali süpürücü aktivite ve süperoksit radikali süpürücü aktivite arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmak için SPSS Inc. Software (16.0 versiyonu, SPSS Inc., Chicago, IL) programı ile ANOVA testi yapılmış ve analizler sonucunda çalışılan yöntemler arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir (p<0,05).

Suşların antioksidan aktivitelerindeki farklılığın nedeni henüz tam olarak açıklanamamıştır. Bu sonuçlar ve günümüze kadar yapılan çalışmalar antioksidan aktivitenin proteolitik aktiviteyle bağlantılı olabileceğini, açığa çıkan peptitlerle ilgili olabileceği, türe, suşa ve doza bağlı olarak değişebileceği rapor edilmiştir [12, 21, 22, 27, 30]. Ayrıca, antioksidan aktivitenin izolasyon kaynağına bağlı olarak da değişebileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada peynirden izole edilen suşların, yoğurttan izole edilen suşlara kıyasla daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Yüksek antioksidan yeteneğine sahip olan *L. brevis* KIR12, *L. fermentum* BP5, *L. rhamnosus* SMC6, *L. fermentum* FKK3, *L. brevis* YG7 suşlarının gıda ve probiyotik uygulamalarda kullanılabilme potansiyelleri bulunmaktadır. Wilson ve arkadaşları [32] antioksidan etki ile antikanserojenik etkinin bağlantılı olduğunu belirtmişlerdir. Dolayısıyla çalışılan suşların antikanserojenik etkinliğe de sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bu suşların antikanserojenik etkilerinin belirlenmesinden sonra probiyotik olarak oksidatif hasarın yol açtığı hastalıkların önlenmesinde doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılabilme potansiyelleri de olabilecektir.

## TEŞEKKÜR

Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi 05/2015-13 nolu proje için vermiş oldukları araştırma-geliştirme desteklerinden dolayı teşekkür ederiz.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI/ÇAKIŞMASI BİLDİRİMİ

Yazarlar arasında çıkar çatışması/çakışması bulunmamaktadır.

## KAYNAKLAR

[1] Özenç, B. (2011). *Fumaria officinalis*'un antioksidan aktivitesinin belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Konya.

- [2] Riane, K., Sifour M., Ouled-Haddar, H., Idoui, T., Bounar, S., and Boussebt, S. (2019). Probiotic properties and antioxidant efficiency of *Lactobacillus plantarum* 15 isolated from milk. *Journal Microbiology Biotechnology Food Science*, 9(3), 516-520.
- [3] Bartkiene, E., Lele, V., Starkute, V., Zavistanaviciute, P., Zokaityte, E., Varinauskaite, I., and Dmitrijeva, L. (2020). Plants and lactic acid bacteria combination for new antimicrobial and antioxidant properties product development in a sustainable manner. *Foods*, 9(4), 433.
- [4] Mbah, J.C., Orabueze, I., and Okorie, H. N. (2019). Antioxidants properties of natural and synthetic chemical compounds: Therapeutic Effects on Biological System. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences*. 3(6), 28-42.
- [5] Hamid, A. A., Aiyelaagbe, O. O., Usman, L. A., Ameen, O. M., and Lawal, A. (2010). Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*. 4(8), 142-151.
- [6] Lourenço, S. C., Moldão-Martins, M., and Alves, V. D. (2019). Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. *Molecules*. 24(22), 4132.
- [7] Yang, S. J., Lee, J. E., Lim, S. M., Kim, Y. J., Lee, N. K., and Paik, H. D. (2019). Antioxidant and immune-enhancing effects of probiotic *Lactobacillus plantarum* 200655 isolated from kimchi. *Food Science and Biotechnology*. 28(2), 491-499.
- [8] Garcia, S. L. A., Silva, G. M., Medeiros, J. M. S., Queiroga, A. P. R., Queiroz, B. B., Farias, D. R. B., and Buriti, F. C. A. (2020). Influence of co-cultures of *Streptococcus thermophilus* and probiotic lactobacilli on quality and antioxidant capacity parameters of lactose-free fermented dairy beverages containing *Syzygium cumini* (L.) skeels pulp. *RSC Advances*, 10(17), 10297-10308.
- [9] Spyropoulos, B. G., Misiakos, E. P., Fotiadis, C., and Stoidis, C. N. (2011). Antioxidant properties of probiotics and their protective effects in the pathogenesis of radiation induced enteritis and colitis. *Digestive Diseases and Sciences*. 56(2), 285-294.
- [10] Afify, A. E. M. R., Romeliah, R. M., Sultan, S. I., and Hussein, M. M. (2012). Antioxidant activity and biological evaluations of probiotic bacteria strains. *International Journal Academic Research*. 4(6), 131-139.
- [11] Zhang, S., Liu, L., Su, Y., Li, H., Sun, Q., Liang, X., and Lv, J. (2011). Antioxidative activity of lactic acid bacteria in yogurt. *African Journal of Microbiology Research*. 5(29), 5194-5201.
- [12] Noureen, S., Riaz, A., Saif, A., Arshad, M., Qamar, M. F., and Arshad, N. (2018). Antioxidant properties of *Lactobacillus brevis* of horse origin and commercial lactic acid bacterial strains: A comparison. *Pakistan Veterinary Journal*. 38(3).
- [13] Li, S., Zhao, Y., Zhang, L., Zhang, X., Huang, L., Li, D., and Wang, Q. (2012). Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods. *Food Chemistry*. 135(3), 1914-1919.
- [14] Decker, E.A. and Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38(3), 674-677.
- [15] Ou, C., Ko, J., and Lin, M. (2006). Antioxidative effects of intracellular extracts of yogurt bacteria on lipid peroxidation and intestine 407 cells. *Journal of Food and Drug Analysis*. 14(3), 304-310.
- [16] Wang, J., Zhao, X., Yang, Y., Zhao, A., and Yang, Z. (2015). Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32. *International Journal of Biological Macromolecules*. 74, 119-126.
- [17] Amaretti, A., Di Nunzio, M., Pompei, A., Raimondi, S., Rossi, M., and Bordoni, A. (2013). Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: *In vitro* and *in vivo* activities. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97(2), 809-817.
- [18] Chang, C. K., Wang, S. C., Chiu, C. K., Chen, S. Y., Chen, Z. T., and Duh, P. D. (2015). Effect of lactic acid bacteria isolated from fermented mustard on immunopotentiating activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 5, 281-286.
- [19] Mishra, V., Shah, C., Mokashe, N., Chavan, R., Yadav, H., and Prajapati, J. (2015). Probiotics as potential antioxidants: A systematic review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63(14), 3615-3626.
- [20] Ji, K., Jang, N. Y., and Kim, Y. T. (2015). Isolation of lactic acid bacteria showing antioxidative and probiotic activities from kimchi and infant feces. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25(9), 1568-1577.
- [21] Lin, M. Y. and Chang, F. J. (2000). Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Digestive Diseases and Sciences*. 45(8), 1617-1622.
- [22] Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S., and Korhonen, H. (2007). Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 102(1), 106-115.
- [23] Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review. *Molecules*. 15(12), 9252-9287.
- [24] Rival, S. G., Boerri, C. G., and Wichers, H. J. (2001). Caseins and casein hydrolysates antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 295-302.
- [25] Yarsan, E. (1998). Lipid peroksidasyon olayı ve önlenmesine yönelik uygulamalar. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 9(1), 89-95.



- [26] Kaizu, H., Sasaki, M., Nakajima, H. and Suzuki, Y. (1993). Effect of antioxidative lactic acid bacteria on rats fed a diet deficient in vitamin E. *Journal of Dairy Science*, 76, 2493–2499.
- [27] Zhang, L., Liu, C., Li, D., Zhao, Y., Zhang, X., Zeng, X., and Li, S. (2013). Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. *International Journal of Biological Macromolecules*. 54, 270-275.
- [28] Ayyash, M., Olaimat, A., Al-Nabulsi, A., and Liu, S. Q. (2020). Bioactive properties of novel probiotic *Lactococcus lactis* fermented camel sausages: Cytotoxicity, angiotensin converting enzyme inhibition, antioxidant capacity, and antidiabetic activity. *Food Science of Animal Resources*. 40(2), 155.
- [29] Hernández-Ledesma, B., Da'valos, A., Bartolome, B., and Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 588–593.
- [30] Kudoh, Y., Matsuda, S., Igoshi, K., and Oki, T. (2001). Antioxidative peptide from milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IFO13953. *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi*. 48, 44–55.
- [31] Adebayo-Tayo, B. and Fashogbon, R. (2020). *In vitro* antioxidant, antibacterial, *in vivo* immunomodulatory, antitumor, and hematological potential of exopolysaccharide produced by wild type and mutant *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Heliyon*. 6(2), e03268.
- [32] Wilson, T. A., Nicolosi, R. J., Chrysam, M., and Kritchevsky, D. (2000). Conjugated linoleic acid reduces early aortic atherosclerosis greater than linoleic acid in hypercholesterolemic hamsters. *Nutrition Research*. 20(12), 1795-1805.