



Maya Kaynaklı Sinbiyotik ve Postbiyotik+Prebiyotik Uygulamalarının Bazı Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi^[*]

Jaafar Nozad Aakef AAKEF^{1*} Zehranur YÜKSEKDAĞ²

¹Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü, Ankara, Türkiye

²Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Ankara, TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 29.11.2022

Kabul Tarihi: 13.02.2023

Basım Tarihi: 31.03.2023

Atıf yapmak için: Aakef, J.N.A. & Yüksekdağ, Z. (2023). Maya Kaynaklı Sinbiyotik ve Postbiyotik+Prebiyotik Uygulamalarının Bazı Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 8(1), 51-61. <https://doi.org/10.35229/jaes.1211758>

How to cite: Aakef, J.N.A. & Yüksekdağ, Z. (2023). Determination of Some Biological Activities of Yeast Derived Synbiotic and Postbiotic+Prebiotic Applications. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 8(1), 51-61. <https://doi.org/10.35229/jaes.1211758>

*ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2156-2868>

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0381-5876>

*Sorumlu yazarın:

Jaafar Nozad Aakef AAKEF
Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Bölümü. 06500/Ankara, Türkiye
✉: caferakef@gmail.com

Öz: Ekzopolisakkaritin (EPS) biyolojik potansiyeli, probiyotik mikroorganizmaların yetiştirilmesinde kullanılan fermantasyon koşullarından etkilenen kimyasal yapısına bağlıdır. Probiyotik maya tarafından üretilen EPS, antimikrobiyal, immünomodülatör, anti-inflamatuvar, antioksidan, anti-tümör, anti-viral, anti-diyabetik, anti-ülser ve kolesterol düşürücü aktiviteler gibi terapötik uygulamalarda çok önem kazanmıştır. Bu çalışmada, *Pichia kudriavzevii* mayası kullanılarak elde edilen sinbiyotik (JD2+EPS_{JD2}), postbiyotik+prebiyotik (CFS_{JD2}+EPS_{JD2}) uygulamalarının bazı biyolojik aktivite (antioksidan ve antibiyofilm) çalışmalarının yapılması amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçların etkili/etkisiz olduğunu yorumlayabilmek için aynı koşullarda ticari prebiyotik olarak satılan inülin kullanılmış ve analiz sonuçları karşılaştırılmıştır. Farklı konsantrasyonlar denenerek belirlenen biyolojik aktivite çalışmalarında 10 mg/L derişimde sırasıyla en yüksek antioksidan ve antibiyofilm kapasite postbiyotik+prebiyotik (CFS_{JD2}+EPS_{JD2}) (%86,6±0,6 ve %84±1 sırasıyla) uygulamasında tespit edilmiştir. Ayrıca, ticari prebiyotik olarak kullanılan inülinin antioksidan aktivitesinin (%71,4±0,3) ve biyofilm oluşumunu engelleme (%68±4) kapasitesinin araştırmamızda kullandığımız uygulamalardan daha düşük değerde olduğu gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Antibiyofilm, antioksidan, *Pichia kudriavzevii*, postbiyotik, prebiyotik, sinbiyotik.

Determination of Some Biological Activities of Yeast Derived Synbiotic and Postbiotic+Prebiotic Applications

Abstract: The biological potential of exopolysaccharide (EPS) depends on its chemical structure, which is affected by the fermentation conditions used in the cultivation of probiotic microorganisms. EPS produced by probiotic yeast has gained great importance in therapeutic applications such as antimicrobial, immunomodulatory, anti-inflammatory, antioxidant, anti-tumor, anti-viral, anti-diabetic, anti-ulcer, and cholesterol-lowering activities. In this study, it was aimed to conduct some biological activity (antioxidant and antibiofilm) studies of synbiotic (JD2+EPS_{JD2}), postbiotic+prebiotic (CFS_{JD2}+EPS_{JD2}) applications obtained by using *Pichia kudriavzevii* yeast. To interpret the results obtained as effective/ineffective, commercial prebiotic inulin was used under the same conditions and the analysis results were compared. In biological activity studies determined by testing different concentrations, the highest antioxidant and antibiofilm capacity was identified in postbiotic+prebiotic (CFS_{JD2}+EPS_{JD2}) (86.6±0.6% and 84±1%, respectively) application, respectively, at 10 mg/L concentration. In addition, it was observed that the antioxidant activity (71.4±0.3%) and the capacity to prevent biofilm formation (68±4%) of inulin, which is used as a commercial prebiotic, were lower than the applications we used in our research.

Keywords: Antibiofilm, antioxidant, *Pichia kudriavzevii*, postbiotic, prebiotic, synbiotic.

*Corresponding author's:

Jaafar Nozad Aakef AAKEF
Gazi University Institute of Science and
Technology Department of Biology
06500/Ankara, Türkiye.
✉: caferakef@gmail.com

GİRİŞ

Orta Doğu ve Kuzey Afrika bölgesinde hem yaygın olarak tüketilen hem de geleneksel tıpta kullanılan hurma (*Phoenix dactylifera* L.), diyet lifi, şeker, protein, vitaminler, mineraller, flavonoidler ve fenolik bileşikler açısından oldukça zengin bir besin türüdür (Al-Shwyeh, 2019). Hurmalar maya, küf ve bakteri gibi mikroorganizmalar ile kontamine olabilmekte ve aynı zamanda mikroorganizmaların büyümesini de teşvik edebilmektedir (Elleuch vd., 2008). Bu sayede hurma örneklerinden çeşitli mikroorganizmaların elde edilebilmesi mümkün olabilmektedir.

Ökaryotik tek hücreli mikroorganizmalar olan mayalar, bileşenlerinde ve biyolojik aktivitelerinde, gıda katkı maddeleri ve fonksiyonel gıdaların üretiminde kullanılmalarına yol açan özelliklere sahip mikroorganizmalardır. Bu bileşenler kimyasal, farmasötik, kozmetik, tıp ve diğer endüstriyel uygulamalarda da kullanılabilir (Banik vd., 2019). Ticari anlamda mayalar; alkoller, ekmek mayası, fermente ürünler ve enzimlerin üretiminde kullanılmaktadır. Aynı zamanda gıda endüstrisinde, aroma arttırmada ve biyoremediasyon uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (El-Ghawwas vd., 2021). Mayaların probiyotik özelliklerinden yararlanılarak bağırsak hastalıklarının engellenmesine yönelik çalışmalarla sağlık alanında da yaygın uygulama alanları bulunmaktadır (Homayouni vd., 2020). Probiyotik mayaların bağırsak sisteminde bulunması mikrobiyotasının dengesinin sağlanması, bağırsak sisteminin uyarılması ve kuvvetlendirilmesi açısından da önemlidir (Çiftçi & Öncül, 2022).

Pichiaceae familyasında yer alan *Pichia* cinsinin 100'den fazla türü olduğu bilinmektedir (Burkhardt, 2022). Bu türler içerisinde *Pichia kudriavzevii* biyoyakıt açısından yüksek verimli etanol üretme yetenekleri nedeniyle diğer mayalara kıyasla daha fazla önem teşkil etmektedir (Oberoi vd., 2012). Ayrıca gıdaların korunmasına katkıda bulunan ve bazı patojen mikroorganizmaların gelişimini inhibe eden RY55 toksini üretme yeteneğine sahiptir (Bajaj vd., 2013). Daha önceleri *Candida krusei* olarak bilinen bu maya türü, *Pichia kudriavzevii* ismiyle yeniden sınıflandırılmıştır (Borman & Johnson, 2021). *P. kudriavzevii* patojenik olmadığı kabul edilen ve biyoteknoloji ve gıda endüstrileri gibi önemli uygulama alanlarında kullanılan bir maya türüdür (Douglass vd., 2018).

Probiyotikler, insan sağlığında yararlı etkileri olan, genellikle konakçının bağırsak mikrobiotasında etki gösteren, İmmün sistemi baskılanmış olanlar dışında patojenik etki göstermeyen canlı mikroorganizmalardır. Probiyotikler antiviral, antimikrobiyal, antikoolesterol, antibiyofilm ve antikanserojenik özellik göstermektedir (Datta vd., 2017; Banwo vd., 2021). Gıda sanayisinde

kullanılan en yaygın probiyotikler mikroorganizmalar laktik asit bakterileridir. Ancak *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Hanseniaspora* ve *Metschnikowia* cinslerine ait mayaların probiyotik özellik gösterdikleri de bilinmektedir (Smith vd., 2015). Mayaların probiyotik ve besin takviyesi olarak kullanımı büyük önem kazanmıştır (Bekatorou vd., 2006). Maya probiyotiklerinin, bağırsak düzenleyici özellikleri, bağırsak bozukluklarını önleme ve tedavi etme yetenekleri gibi önemli yararlı etkileri bulunmaktadır (Moslehi-Jenebian vd., 2010). Maya probiyotiklerinin diğer önemli avantajları ise, gastrointestinal enzimlere, safra tuzlarına, pH değişimlerine, organik asitlere ve sıcaklık değişimlerine karşı oldukça dirençli olmasıdır. Probiyotik mayalar, bağırsak yolu ile mukozaya tutunarak istenmeyen patojenlerin ve diğer bakterilerin mukozaya yapışmasını engellemektedir (Doğan, 2012).

Prebiyotikler, mikrobiyota elemanlarının büyümesini ve/veya aktivitesini uyarmak için konakçıya yarar sağlayan ve konakçı sağlığını iyileştiren, insanlarda sindirim enzimleri tarafından sindirilemeyen gıda bileşenleridir (Ayaz, 2021). Fruktu-oligosakkaritler ve galakto-oligosakkaritler, insan sağlığı üzerinde faydalı etkileri olan iki önemli prebiyotik grubudur. Düşük miktarlarda frukto-oligosakkaritler ve galakto-oligosakkaritler gıdalarda doğal olarak bulunduğu için, bilim insanları endüstriyel ölçekte prebiyotikler üretmeye çalışmaktadırlar (Stinson, 2017). Prebiyotikler, yararlı bakterileri besleme, kalsiyum başta olmak üzere mineral emilimine yardımcı olma, gıdaları daha hızlı fermente edebilme, sindirimi kolaylaştırma gibi önemli yardımcı özellikler göstermektedir (Okan Bakır, 2011). Prebiyotik olan ekzopolisakkaritler (EPS), suşların epitel yüzeylere yapışmasında, otoagregasyonunda ve pıhtılaşmasında etkili olan sekonder metabolitlerdir. Mikroorganizmalar tarafından salgılanan EPS, hücreleri kuruma, fagositoz ve faj etkisinden koruyarak, antibiyotiklere ve toksik maddelere karşı koruyucu etkilere sahiptir (Gientka vd., 2015).

Postbiyotikler, bağırsakta probiyotikler tarafından gerçekleştirilen fermentasyon sürecinin yan ürünleridir. Yani probiyotikler prebiyotiklerle beslendikçe postbiyotikler üretilmektedir. Bunlar temel olarak probiyotiklerin “atıkları” olarak değerlendirilmektedir (Salminen vd., 2021). Hem endüstriyel işlemlerde hem de depolama sırasında doğal stabilite sağlayabilmeleri, postbiyotiklere olan ilginin artmasına neden olmaktadır. Birçok probiyotik mikroorganizma oksijene ve ısıya duyarlı olduğundan, canlı mikroorganizmaların stabilitesini korumak teknolojik bir zorluktur. Bu nedenle soğuk zincir koşullarının sağlanamadığı ya da ortam sıcaklığının canlı mikroorganizmaların depolanması için elverişli olmadığı koşullar için postbiyotikler probiyotiklerden daha uygun olabilir (Salminen vd., 2021). Organik asitler,

bakteriyosinler, karbonik maddeler ve enzimler en çok bilinen postbiyotik bileşenlerdir (Fiore vd., 2005).

Bir (veya daha fazla) probiyotik ile bir (veya daha fazla) prebiyotik kombinasyonuna sinbiyotik denir (Pandey vd., 2015). Bilimsel çalışmalar, prebiyotikler ve probiyotikler arasındaki sinbiyotik ilişkinin sağlığa önemli ölçüde katkıda bulunduğunu bildirmektedir (Tufarelli & Laudadio, 2016; Kerry vd., 2018). Bu kombinasyonun amacı, gastrointestinal sistemdeki canlı mikroorganizmaların hayatta kalmasını arttırmaktır (Illanes & Guerrero, 2016). Bu nedenle, sinbiyotikli fonksiyonel gıdalara yönelik ticari ilgi, bağırsak sağlığı yararları, hastalıkların önlenmesi ve terapi konusundaki bilinçlenme nedeniyle sürekli olarak artış göstermektedir (Kerry vd., 2018; Rengel dos Passos vd., 2021).

Bu çalışma kapsamında; *Pichia kudriavzevii* mayası kullanılarak elde edilen sinbiyotik (JD2+EPS_{JD2}), postbiyotik+prebiyotik (CFS_{JD2}+EPS_{JD2}) uygulamaların ve ticari prebiyotik inulinin antibiyofilm ve antioksidan özelliklerinin karşılaştırılmaları amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Araştırmada Kullanılan Maya Suşu

Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji ve Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan Barhi Hurması, Irak da satışı sunulan hurma örneğinden izole edilen ve 18S rRNA dizi analizi ile moleküler tanımlaması yapılan *Pichia kudriavzevii* JD2 maya suşu (Aakef, 2018) kullanılmıştır.

Örneklerin Hazırlanması

Probiyotik (JD2): *P. kudriavzevii* JD2 maya suşu YPD (Yeast-Pepton-Dekstroz) sıvı besiyerinde 37°C'de 24 saat boyunca geliştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda örnek 10000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiş ve elde edilen pellet fosfat tamponu (PBS) ile yıkanarak, 1 mL PBS ile süspansiyon edilmiştir. Maya hücre yoğunluğu 0,5 McFarland yoğunluğuna ayarlanarak maya süspansiyonu hazırlanmıştır.

Prebiyotik (EPS_{JD2}): *P. kudriavzevii* JD2 maya suşundan YPD sıvı besiyerine %2'lik ekim yapılarak 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. EPS izolasyonu için 800 mL'lik YPD sıvı besiyerine aktif kültürden %2 oranında ekilerek aynı sıcaklık ve sürede inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra örnek 80°C'de 10 dk sıcak su banyosunda bekletildikten sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Ardından örneğe %4 TCA (Trikloroasetik Asit) (Merck) eklenerek manyetik karıştırıcıda (VELP) TCA çözünene kadar karıştırılmıştır. TCA çözündükten sonra örnek 4000 rpm'de 25 dk santrifüjlenmiş (SIGMA Model 2-16KC) ve süpernatant mezürde toplanmıştır. Toplanan süpernatant ölçülerek süpernatantın 2 katı %96'lık alkol eklenmiş ve uygun şişelere paylaştırıldıktan sonra +4°C'de 1 gece bekletilmiştir. Örnek 4000 rpm'de 25 dk

santrifüjlenerek süpernatant atılmış ve kalan alkol uçurulmuştur. Pelletler 2 mL distile suda çözdürülmüştür ve 500'er µL olacak şekilde viyallere dağıtılarak -80°C'de 1 gece bekletildikten sonra EPS liyofilizatör cihazında (CHRIST alpha 2-4 LD plus), dondurulup kurutulmuş toz haline getirilmiştir (EPS_{JD2}) (Yi vd., 2008; Kanmani vd., 2011; Shi vd., 2014). Örnekte protein bulaşı Bradford protein kiti (Sigma-Aldrich) ile araştırılırken nükleik asit için 0,05 mg/mL EPS_{JD2} ultra saf suda çözülerek 280 ve 260 nm'de UV-spektrofotometrede (Hitachi U-1800) pik görülmemesi ile doğrulanmıştır.

Postbiyotik (CFS_{JD2}): *P. kudriavzevii* JD2 maya suşu YPD sıvı besiyerinde 2 kez 37°C'de 24 saat bekletilerek aktifleştirilmiştir. İnkübasyon bitiminde 5000 rpm'de 30 dakika santrifüj işlemi uygulanmış ve süpernatant 0,22 µm çaplı steril membran filtreden (Whatman) geçirilmiştir. Süpernatant postbiyotik olarak kullanılmıştır.

Sinbiyotik (JD2+EPS_{JD2}): 200 mg/mL'lik EPS_{JD2} ana stoğundan son konsantrasyon 0,5, 1, 5 ve 10 mg/mL olan EPS_{JD2} hazırlanmış ve 1 mL Dimetil Sülfoksit (DMSO; Merck)'te çözülmüştür. Daha sonra 500 µL maya süspansiyonu (Probiyotik, JD2) ile 500 µL farklı konsantrasyonlardaki prebiyotik (EPS_{JD2}) karıştırılmış ve sinbiyotik elde edilmiştir.

Postbiyotik ve Prebiyotik (CFS_{JD2}+EPS_{JD2}): Yukarıda verilen şekilde hazırlanan postbiyotik ve farklı konsantrasyonlardaki prebiyotik 1:1 oranında karıştırılarak CFS_{JD2}+EPS_{JD2} elde edilmiştir.

Sinbiyotik (JD2+EPS_{JD2}) ve Postbiyotik+Prebiyotik (CFS_{JD2}+EPS_{JD2}) Uygulamaların Biyolojik Aktiviteleri

Antioksidan Aktivite: Örneklerin (farklı konsantrasyonlardaki sinbiyotik, postbiyotik+prebiyotik ve inulin) antioksidan aktivitesi, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), süperoksit anyon ve hidroksil radikalini süpürücü aktivite yöntemleri kullanılarak tespit edilmiştir.

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali giderme etkisinin belirlenmesi: Örneklerin (farklı konsantrasyonlardaki sinbiyotik, postbiyotik+prebiyotik ve inulin) 1,1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH) radikalini süpürme aktiviteleri, Li vd., (2014) tarafından bildirilen yöntemle göre belirlenmiştir. Örneklerin üzerine 1 mL DPPH çözeltisi (%0,008 w/v) eklenerek karanlıkta 1 saat tutulmuştur. Süre bitiminde örnekler 4000 rpm'de 25 dakika santrifüj işlemi uygulanarak süpernatantların yoğunlukları 517 nm dalga boyundaki spektrofotometrede (Hitachi) ölçülmüştür. Kör olarak 1 mL DMSO, kontrol olarak ise 1 mL için DMSO+DPPH çözeltisi kullanılmıştır. Örneklerin DPPH radikalini giderme yüzdesi aşağıda yer alan formüle göre tespit edilmiştir.

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

A: Antioksidan aktivite (%)

B₅₁₇: DPPH ile muamele edilen örneklerin yoğunluğu

C₅₁₇: Kontrol grubunun (Boş DMSO ve DPPH çözeltisi) yoğunluğu

Süperoksit anyon radikalini süpürücü aktivitesi: Sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik ve bitkisel kaynaklı ticari prebiyotik olan inülinde (kontrol) süperoksit anyon radikal süpürme aktivitesi belirleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Wang vd., 2015). Örneklerin üzerine 25°C'de 0,2 mL pirogallol (3 mM, Sigma) eklenmiş ve karışımın absorbans değeri 325 nm'de ölçülmüştür. Elde edilen sonuçların yüzde süperoksit anyon radikal süpürme aktivitesi aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır.

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

A₁: Örneklerin absorbans değeri

A₀: Örnek içermeyen çözeltinin absorbans değeri

Hidroksil radikalini süpürücü aktivite: Örneklerin üzerine 1 mL brilliant blue (0,435 mM, Sigma), 2 mL FeSO₄ (0,5 mM, Sigma), 1,5 mL H₂O₂ (%3, w/v Sigma) eklenerek 37°C de 1 saat inkübe edilmiştir. Bekleme süresi sonunda örnekler 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi uygulanmış ve 624 nm'de absorbansları ölçülmüştür (Wang vd., 2015). Örneklerin hidroksil radikalini süpürücü etkisi aşağıdaki formüle göre belirlenmiştir.

% Hidroksil radikalini süpürücü aktivite = $[(A_0 - A_1) / (A - A_1)] \times 100$

A₀: Belirli bir konsantrasyonda örnek içeren çözeltinin absorbans değeri

A₁: Örnek olmadığı çözeltinin absorbans değeri

A: Örnek ve Fenton reaksiyon sistemini içermeyen çözeltinin absorbans değeri

Antibiyofilm Aktivite: Antibiyofilm madde olarak farklı konsantrasyonlardaki (0,5, 1, 5 ve 10 mg/mL) (JD₂+EPS_{JD2}), (CFS_{JD2}+EPS_{JD2}) ve ticari prebiyotik inülin (kontrol, Sigma) kullanılmıştır. Test bakterisi olarak, biyofilm yapma yeteneği daha önceki çalışmalar ile (Sarikaya vd., 2017; Bikric vd., 2022) belirlenen *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* 29212 ve *Escherichia coli* ATCC 11229 bakterileri kullanılmıştır. Örneklerin antibiyofilm aktiviteleri kristal viyole boyama esasına göre kolorimetrik olarak tespit edilmiştir (Sandasi vd., 2010; Chaieb vd., 2011). 96 kuyucuklu mikrolakalarda 20 µL numune ve 180 µL test bakterisi (yoğunluğu McFarland 0,5 ayarlanmış) aktarılmıştır. Negatif kontrol olarak %0,85 serum fizyolojik (SF) içeren kuyular, pozitif kontrol olarak ise test bakterilerini içeren kuyular kullanılmıştır. Örnekler ve kontrol grupları 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Bekleme süresi sonunda kuyulardaki sıvılar uzaklaştırılmış ve planktonik formdaki hücrelerin uzaklaştırılması için de üç kez steril SF ile yıkama işlemi uygulanmıştır. Ardından mikrolak plakalar oda

koşullarında kurumaya bırakılmış ve sonra kuyulara 150'şer µL %95'lik metanol (Merck) ilave edilerek fikse edilmiştir. Boşaltılan kuyuların üzerine 200 µL %0,1'lik kristal viyole çözeltisi (Merck) eklenmiştir. Mikrolakalar oda koşullarında 30 dakika bekletildikten sonra kuyular steril distile su ile yıkanarak tutunmayan hücreler uzaklaştırılmıştır. Plakalar kurutulduktan sonra, kuyulara %33'lük glasiyel asetik (Merck) eklenmiş ve kuyu çeperlerindeki biyofilm yapılarına tutunmuş boya çözündürülmüştür. Kristal viyole renginin optik yoğunluğu 570 nm'de eliza okuyucuda (Epic, Biotek) absorbans değerleri belirlenmiştir. Biyofilm inhibisyonunun yüzde oranını aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

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

İstatiksel Analizler: Çalışmalar iki paralelli ve üç tekerrürlü olarak yapılmış ve sonuçların aritmetik ortalamaları hesaplanmıştır. İstatistiksel analizlerde SPSS Inc. Software (Ver. 22.0) kullanılmıştır. Antioksidan ve antibiyofilm çalışmalarında sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamalarda konsantrasyon artışı ile antioksidan/antibiyofilm arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak için regresyon analizi uygulanmıştır. Regresyon analizinde, 0,75'ten yüksek çoklu R değerleri güçlü bir korelasyon olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca örneklerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan üç farklı yöntem arasında anlamlı bir fark olup olmadığını tespit etmek için tek yönlü ANOVA testi uygulanmış ve p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Antioksidan Aktivite: Probiyotik bakteriler ve bu bakterilerden elde edilen postbiyotikler, çeşitli hastalıklara neden olan oksidatif strese karşı antioksidan savunma sistemini güçlendirmek için potansiyel ajanlar olarak kabul edilmektedirler. Çalışmada, üç farklı metot süperoksit anyon ve hidroksil radikalini süpürücü aktivitesi ile farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 5, 10 mg/mL) ve kontrol olarak ticari prebiyotik inülinin antioksidan aktivitesi tespit edilmiştir. Antioksidan aktivite sonuçları *Tablo 1*'de verilmiştir. Kullanılan üç farklı yöntemle göre yapılan çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde, en yüksek antioksidan aktivite DPPH metodunda 10 mg/mL'lik (%86,6±0,6) uygulamasında, en düşük aktivite ise süperoksit anyon radikalini süpürücü aktivitesi metodunda 0,5 mg/mL'lik (%53,2±0,8) uygulamasında tespit edilmiştir. Kontrol olarak kullanılan ticari bir prebiyotik olan inülinde de benzer şekilde en yüksek antioksidan aktivite DPPH metodunda 10 mg/mL (%71,4±0,3) inülin konsantrasyonunda gözlenirken, en düşük aktivite süperoksit anyon radikalini süpürücü aktivite metodunda 0,5 mg/mL konsantrasyonda (%22,4±0,7) gözlenmiştir.

Tablo1. Sinbiyotik, postbiyotik+prebiyotik ve inülinin antioksidan aktivitesi (%).

Farklı konsantrasyonlarda sinbiyotik (mg/mL)				Farklı konsantrasyonlarda postbiyotik+prebiyotik (mg/mL)						Farklı konsantrasyonlarda ticari inülin (mg/mL)					
JD2+EPS _{JD2}				Multiple R value	Significant F	CFS _{JD2} +EPS _{JD2}				Multiple R value	Significant F				
0,5	1	5	10			0,5	1	5	10			0,5	1	5	10
1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini giderme etkisi (%)															
66,3±0,6	73,6±0,5	78,4±0,4	83,3±0,3	0,92	0,08	69,8±0,1	74,1±0,3	80,5±0,3	86,6±0,6	0,97	0,03	23,2±0,2	46,2±0,2	59,3±0,2	71,4±0,3
Süperoksit anyon radikali süpürücü aktivitesi (%)															
59,0±0,4	68,4±0,5	73,8±0,1	78,4±0,3	0,89	0,11	53,2±0,8	65,3±0,4	69,7±0,6	72,8±0,9	0,81	0,19	22,4±0,7	27,8±0,4	32,2±0,2	41,4±0,5
Hidroksil radikali süpürücü aktivitesi (%)															
57,8±0,2	62,9±0,3	66,6±0,3	74,4±0,5	0,97	0,03	54,3±0,2	59,7±0,2	60,0±0,1	69,0±0,4	0,93	0,07	37,8±0,1	41,9±0,3	56,3±0,4	67,4±0,2

Antibiyofilm Aktivite

Farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 5 ve 10 mg/mL) ve kontrol olarak ticari prebiyotik inülinin, biyofilm oluşturma yeteneğine sahip üç patojen mikroorganizma (*E. coli* ATCC 11229, *P. aeruginosa* 29212 ve *S. aureus* ATCC 25923) üzerindeki antibiyofilm aktivitesi, 96 kuyucuklu mikropalakalarda kristal viyole boyama esasına göre değerlendirilmiştir (Tablo 2). Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, en yüksek antibiyofilm

inhibisyonunun 10 mg/mL'lik (%84±1) uygulamasında *E. coli* ATCC 11229'a karşı, en düşük inhibisyonun ise *P. aeruginosa* 29212'ye karşı 0,5 mg/mL'lik (%54±1) uygulamalarda olduğu belirlenmiştir. Kontrol olarak kullanılan ticari bir prebiyotik olan inülinde de benzer şekilde en yüksek antibiyofilm inhibisyonunun 10 mg/mL inülin konsantrasyonunda (%68±1) *E. coli* ATCC 11229'a karşı, en düşük inhibisyonun ise *P. aeruginosa* 29212'ye karşı 0,5 mg/mL konsantrasyonda (%40±1) gözlenmiştir.

Tablo 2. Sinbiyotik, postbiyotik+prebiyotik ve inülinin biyofilm inhibisyonu (%).

Test Bakterisi	Farklı konsantrasyonlarda sinbiyotik (mg/mL)				Farklı konsantrasyonlarda postbiyotik+prebiyotik (mg/mL)						Farklı konsantrasyonlarda ticari inülin (mg/mL)					
	JD2+EPS _{JD2}				Multiple R value	Significant F	CFS _{JD2} +EPS _{JD2}				Multiple R value	Significant F				
	0,5	1	5	10			0,5	1	5	10			0,5	1	5	10
<i>E. coli</i> ^a	62±2	68±4	76±7	81±1	0,95	0,05	63±2	71±4	78±2	84±1	0,93	0,07	45±11	54±1	62±0	68±4
<i>P. aeruginosa</i> ^b	54±0	62±3	68±0	75±3	0,94	0,06	58±7	66±2	71±2	79±5	0,94	0,06	40±1	41±0	54±1	62±0
<i>S. aureus</i> ^c	58±4	63±4	72±0	77±0	0,96	0,04	63±0	70±1	76±7	80±2	0,91	0,09	42±1	50±2	58±0	63±1

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

TARTIŞMA

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

Mayalar, metabolizmaları nedeniyle fermente gıdaların üretiminde önemli fonksiyonel aktivite göstermektedirler (Soccol vd., 2010). Bitkisel ürünlerde bulunan *P. kudriavzevii*, birçok patojenik mikroorganizmayı öldürebilen toksinler üretme yeteneğine sahiptir. Bu nedenle gıda muhafazasına, bağışıklık sistemi modülasyonuna, antioksidan, antitümör, anti-ülser veya kolesterol düşürmeye katkıda bulunmaktadır (Castro-Bravo vd., 2018). Bu çalışmada, *Pichia kudriavzevii* JD2 suşu kullanılarak elde edilen, ve bitkisel kaynaklı inulinin (ticari prebiyotik) antioksidan ve antibiyofilm aktivitelerinin karşılaştırılması hedeflenmiştir.

Antioksidanlar, oksidatif hücresel substratların oksidasyonunu geciktiren ve/veya önleyen ve gıda endüstrisinde katkı olarak kullanılabilen maddelerdir. Sağlık endişeleri ışığında, daha güvenli ve doğal antioksidanlar bulmaya artan bir ilgi vardır (Aponete vd., 2020). Mayalar, gıda işleme için güvenli bir içerik ve katkı maddesi kaynağıdır. Mayalar, hücre duvarındaki glutatyon, protein ve enzimler gibi antioksidan görevi

görebilecek biyoaktif bileşikleri sentezlerler (Vargas-Ochoa vd., 2016).

Serbest radikaller insan sağlığını büyük ölçüde etkileyebilir ve vücutta yaşlanma ve iltihaplanma gibi çeşitli hastalıklara neden olabilir; bu nedenle araştırmacılar her zaman antioksidan olan ve insan vücudunda serbest radikallerin neden olduğu zararı azaltabilecek biyopolimerler araştırmaktadırlar. Çalışmamızda farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 5 ve 10 mg/mL) uygulamaların antioksidan aktivitesi üç farklı metot ile belirlenmiş ve antioksidan değerlerinin $53,2 \pm 0,8$ - $86,6 \pm 0,6$ arasında değiştiği bulunmuştur. Üç antioksidan uygulamasının etkisi ile artan EPS_{JD2} konsantrasyonlarının etkisi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p < 0,05$). Artan EPS_{JD2} konsantrasyonları ile üç antioksidan uygulamasının etkisi arasındaki ilişki regresyon analizi ile belirlenmiştir. Çoklu R değerleri 0,75'ten büyük olduğu için güçlü ve pozitif bir korelasyon tespit edilmiştir. Rashad vd., (2011) yapmış oldukları çalışmada fermente soya fasulyesinden izole edilen *Pichia pinus* suşlarının antioksidan aktivitelerini %72 olarak belirlemiştir. Başka bir çalışmada, *P. kudriavzevii* (OP2, 1P2, 2P10) süpernatantının (postbiyotik) antioksidan aktivitesi 18. ve 48. saatte DPPH serbest radikali ile belirlenmiş (%59,67-68,51) ve 48 saatte 18 saate kıyasla daha yüksek oranda antioksidan aktiviteye sahip oldukları rapor edilmiştir (Merchán vd., 2020). Amaretti vd., (2013) otuz dört laktik asit bakteri suşunun (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Streptococcus*) hücre içi postbiyotiğinin farklı yöntemlerle antioksidan aktivitelerini araştırmış ve antioksidan değerinin kullanılan suşa özgü olarak değiştiğini bildirmiştir. İn vitro çalışmalar, ekzopolisakaritlerin bu konuda birçok sağlık yararına ve antioksidan etkiye sahip olduğunu bildirmiştir (Das vd., 2014). de Oliveira Coelho vd. (2019), *Liquorilactobacillus satsumensis*, *Leuconostoc mesenteroides* ve *Sacharomyces cerevisiae*'nin hem hücre içi hem de hücre dışı içeriğinin, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) inhibisyonunun %20 ila 28'i oranında antioksidan sergilediğini bildirmiştir. Başka bir çalışmada, postbiyotik RI11 (*L. plantarum* suşu RI11) etçi civcivlerin diyetine eklenmiştir. Antioksidan potansiyeli, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyonun aktivitesine dayalı olarak değerlendirilmiştir ve postbiyotik RI11'in, piliçler için antioksidan takviyesi olarak tatmin edici etkilere ve potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir (Humam vd., 2021). Çalışmalar, postbiyotiklerin varyasyonunun metal iyonlarının şelatlama yeteneği, antioksidan enzim sistemi ve bunlarda bulunan antioksidan metabolitler gibi mekanizmalara bağlı olduğunu göstermektedir (Yang vd., 2017). Yapılan literatür taramaları sonucu bakterilere ait postbiyotiklerin antioksidan aktivitelerini belirleme

yönelik çeşitli çalışmalara rastlanılırken, maya postbiyotik ya da postbiyotik+prebiyotik uygulama ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Çalışmamızın sonuçlarında, uygulanan üç metotta da konsantrasyon artışına bağlı olarak hem (postbiyotik+prebiyotik) hem de (sinbiyotik) uygulamalarda antioksidan aktivitenin yüksek çıktığı tespit edilmiştir. Ayrıca hem ticari olarak satılan inüline hem de diğer çalışmalara kıyasla sonuçlarımızın antioksidan kapasitesinin daha yüksek değerde olduğu gözlenmiştir. Sinbiyotikler ve postbiyotikler+prebiyotikler arasındaki bu benzerlik, her iki uygulamada da antioksidan aktivitelerini artıran ekzopolisakkaritlerin (EPS) varlığından kaynaklanıyor olabilir. Birçok çalışma (EPS)'nin etkili antioksidan aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir (Li, vd, 2014; Wang, vd, 2021 ve Sadeghi, vd, 2022).

Biyofilm, bir biyotik canlı olarak kullanıldığından dolayı daha çok insan vücudu dokuları için kullanılmaktadır. Antimikrobialerin etkisini sınırlayabilen, kendi kendine üretilen bir ekzopolimer matriksinin ayrılmaz bir parçasıdır (Madigan vd., 2019). Gıda kaynaklı patojenler, gıda endüstrisinde gıda işleme sırasında kullanılan paslanmaz çelik, lastik eldiven, plastik, silikon kauçuk ve cam gibi biyotik ve abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşturarak gıda kalitesi ve güvenliği için ciddi bir tehdit oluşturan gıda kontaminasyonuna neden olabilirler. Gıda bozulmaları ve ekipman erozyonu nedeniyle gıda endüstrisi işletmelerinin ekonomik faaliyetlerini olumsuz yönde etkilemektedir (Nahar vd., 2018; Touthik vd., 2020). Bu nedenle, araştırmaların çoğu, biyofilm oluşumunu veya patojenik bakterilerin tamamen yok edilmesini sınırlayan alternatif yolu belirlemeye odaklanmıştır (Kanmani vd., 2011; Xu vd., 2020; Soliemani vd., 2022; Karaca vd., 2022). Bu çalışmada, farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 5 ve 10 mg/mL) sinbiyotik ve postbiyotik+prebiyotik uygulamaların antibiyofilm aktivitesi üç farklı patojene karşı belirlenmiş ve biyofilm inhibisyon değerleri, %54±0-84±1 arasında değiştiği bulunmuştur. Kontrol amacıyla kullanılan inülinin (0,5, 1, 5 ve 10 mg/mL) konsantrasyonları ise %40-68 oranında patojen bakterilerin oluşturduğu biyofilmi engellemiştir. Sonuçlar, antibiyofilm aktivitesinin konsantrasyona bağlı olduğunu ve 10 mg/mL konsantrasyonunda postbiyotik+prebiyotik'de %84±1 maksimum inhibitör etkinin olduğunu göstermiştir. Maksimum inhibe edici etki, 10 mg/mL'lik bir konsantrasyonda (sinbiyotik) %81±1 olarak tespit edilmiştir.

Literatür taramaları sonucunda EPS'nin antibiyofilm etkisinin ortaya konulduğu bir çalışmada, *L. acidophilus* A4 suşundan elde edilen EPS'nin, 0,1, 1 ve 10 mg/mL konsantrasyonları hazırlanarak, Enterohemorajik *E. coli* O157:H7 bakterisi üzerinde biyofilm inhibisyon

etkisi araştırılmıştır. En iyi biyofilm inhibisyon etkisinin 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan EPS'de meydana geldiği ve bu konsantrasyondaki EPS'nin biyofilm oluşumunu %87 oranında düşürdüğü belirlenmiş ve biyofilm oluşumundaki bu düşüşün, bakteriyel yüzey özelliklerinin kısmen etkilenmesi sonucunda (hücre yüzeyi modifikasyonlarının veya hücre-hücre yüzey etkileşimlerinin azaltılmasıyla) hücrelerin ilk bağlanma ve otoagregasyonunun engellenmesiyle ortaya çıkabileceği öne sürülmüştür (Kim vd., 2009). Başka bir çalışmada Koohestani vd., (2018) tarafından, *L. acidophilus* LA-5 ve *L. casei* 431 suşlarından elde edilen kültür süpernatantlarının (postbiyotik) mikropilaya yöntemine göre, *S. aureus* ATCC 25923 suşu üzerinde biyofilm inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Kültür süpernatantlarının artan konsantrasyona bağlı olarak biyofilm inhibisyon oranını artırdığı ve *L. acidophilus* LA-5 ve *L. casei* 431 suşlarının %100 konsantrasyondaki süpernatantlarının, sırasıyla %70,6 ve %65,3 oranlarında biyofilm oluşumunu engellediği tespit edilmiştir. Yapılan literatür taramaları sonucu maya postbiyotik, prebiyotik, postbiyotik+prebiyotik ya da sinbiyotik uygulama ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle, mayaların, ürettikleri metabolitlerin ve mayalardan elde edilen ekzopolisakkaritlerin biyofilm oluşumunu engelleme mekanizması tam olarak rapor edilmemiştir.

Ancak, laktik asit bakterilerinin EPS'lerinin bakterilerin hücre yüzeylerini değiştirerek, yüzeylere ilk yapışmayı önleyerek ve biyofilmle ilişkili genlerin ekspresyonunu aşağı doğru düzenleyerek antibiyofilm etkilerine sahip olabilecekleri bildirilmiştir (Wang vd., 2015; Karaca vd., 2022). Mayaların antibiyofilm yeteneklerinin de bundan kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızın sonuçlarında, konsantrasyon artışına bağlı olarak hem (postbiyotik+prebiyotik) hem de (sinbiyotik) uygulamalarda biyofilm oluşumunun azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca hem ticari olarak satılan inüline hem de diğer çalışmalara kıyasla sonuçlarımızın biyofilm inhibisyon kapasitesinin daha yüksek değerlerde olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak yaptığımız deneysel çalışmalar neticesinde *Pichia kudriavzevii* JD2 maya suşu kullanılarak elde edilen (sinbiyotik), (postbiyotik+prebiyotik) uygulamalarının antioksidan ve antibiyofilm aktivite kapasitesine sahip oldukları tespit edilmiştir. Farklı konsantrasyon denemeleri yapılarak belirlenen biyolojik aktivite çalışmalarında artan konsantrasyona bağlı olarak hem antioksidan aktivitenin hem de biyofilm inhibisyon yeteneğinin artış gösterdiği tespit edilmiştir. Ticari prebiyotik olarak kullanılan inülinin, DPPH, süperoksit anyon ve hidroksil radikalini süpürücü etkisinin çalışmamızda kullandığımız

uygulamalardan çok daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle en yüksek antioksidan kapasiteye sahip postbiyotik+prebiyotik (%86,6±0,6) uygulamasının serbest radikaller üretebilen oksidasyonu reaksiyonunun engellenmesinde alternatif olarak kullanılabilceği düşünülmektedir. *P. kudriavzevii* JD2 maya suşu kullanılarak elde edilen uygulamalarının patojen mikroorganizmalar tarafından oluşturulan biyofilm yapısını oluşumunu engelleme ve/veya azaltma etkisinin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, ticari prebiyotik olarak kullanılan inülinin biyofilm oluşumunu engelleme kapasitesinin araştırmamızda kullandığımız uygulamalardan daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle en yüksek biyofilm inhibisyon yeteneğine sahip (%84±1) uygulamasının hastalık etkeni oluşturan mikroorganizmalarla mücadelede ve biyomedikal ekipmanlarda biyolojik koruyucu kaplamalarda kullanılabilceği düşünülmektedir.

Probiyotik bakteriler, probiyotik bakterilerden elde edilen ve prebiyotik ajan olarak değerlendirilen EPS'ler, postbiyotik ve sinbiyotikler güçlü antioksidan ve antibiyofilm ajanları olarak kabul edilmektedirler. Maya probiyotikleri, EPS, postbiyotik ve sinbiyotiklerinin de uygun antioksidan ve antibiyofilm ajanları olup olmadığının değerlendirilmesi için daha fazla çalışma ile desteklenmesi gerekmektedir. Bu çalışmada denenen farklı uygulamalarında potansiyel antioksidan ve antibiyofilm ajan olma kapasiteleri olduğu belirlenmiştir. Buna ilaveten *in vitro* olarak yapılan bu çalışmaların *in vivo* olarak desteklenmesi gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yürütülmekte olan “*Pichia kudriavzevii* JD2 Maya Suşunun Bazı Probiyotik Özelliklerinin ve Suştan İzole Edilen Ekzopolisakkaritin Prebiyotik Aktivitelerinin Belirlenmesi” isimli doktora tezinin bir kısmından türetilmiştir. Dr. Berat ÇINAR ACAR’a çalışmaya sağladığı değerli katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

Aakef, J.N.A. (2018). *Hurmadan izole edilen mayaların bazı probiyotik özelliklerin araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara. 118.

Aguilar-Toala, J.E., Hall, F.G., Urbizo-Reyes, U.C., Garcia, H.S., Vallejo-Cordoba, B., González-Córdova, A.F., Hernández-Mendoza, A. & Liceaga, A.M. (2019). *In silico* prediction & *in vitro* assessment of multifunctional properties of

postbiotics obtained from two probiotic bacteria. *Probiotics & Antimicrobial Proteins*, **12**(2), 608-622. DOI: [10.1007/s12602-019-09568-z](https://doi.org/10.1007/s12602-019-09568-z)

- Al-Shwyeh, A. (2019).** Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruit as potential antioxidant & antimicrobial agents. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, **11**(1), 1-11. DOI: [10.4103/jpbs.JPBS_168_18](https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_168_18)
- Amaretti, A., Di Nunzio, M., Pompei, A., Raimondi, S., Rossi, M. & Bordoni, A. (2013).** Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: *In vitro* & *in vivo* activities. *Applied Microbial Biotechnology*, **97**(2), 809-817. DOI: [10.1007/s00253-012-4241-7](https://doi.org/10.1007/s00253-012-4241-7)
- Andresen, V., Gschossmann, J. & Layer, P. (2020).** Heat-inactivated *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 (SYN-HI-001) in the treatment of irritable bowel syndrome: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Lancet Gastroenterology Hepatology*, **5**(7), 658-666. DOI: [10.1016/S2468-1253\(20\)30056-X](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30056-X)
- Aponte, M., Murru, N. & Shoukat, M. (2020).** Therapeutic, prophylactic, & functional use of probiotics: A current perspective. *Frontiers in Microbiology*, **11**(562048), 1-16. DOI: [10.3389/fmicb.2020.562048](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.562048)
- Ayaz, Z. (2021).** Prebiyotikler ve sağlık açısından faydaları. *The Journal of Turkish Family Physician*, **12**(4), 201-206. DOI: [10.15511/tjtfp.21.00493](https://doi.org/10.15511/tjtfp.21.00493)
- Bajaj, B. K., Raina, S. & Singh, S. (2013).** Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. *Journal of Basic Microbiology*, **53**, 645-656. DOI: [10.1002/jobm.201200187](https://doi.org/10.1002/jobm.201200187)
- Banik, A., Halder, S., Ghosh, C. & Mondal, C. (2019).** Fungal probiotics: Opportunity, challenge, & prospects. *Recent Advancement in White Biotechnology through Fungi*, **11235**, 101-117. DOI: [10.1007/978-3-030-14846-1_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-14846-1_3)
- Banwo, K., Alonge, Z. & Sanni, A.I. (2021).** Binding capacities & antioxidant activities of *Lactobacillus plantarum* & *Pichia kudriavzevii* against cadmium & lead toxicities. *Biological Trace Element Research*, **199**(2), 779-791. DOI: [10.1007/s12011-020-02164-1](https://doi.org/10.1007/s12011-020-02164-1)
- Bekatorou, A., Psarianos, C. & Koutinas, A.A. (2006).** Production of food grade yeast. *Biotechnology*, **44**(3), 407-415. ISSN: 1330-9862.
- Bikric, S., Aslim, B., Dincer, İ., Yüksekdağ, Z., Ulusoy, S. & Yavuz, S. (2022).** Characterization of exopolysaccharides (EPSs) obtained from *Ligilactobacillus salivarius* strains & investigation at the prebiotic potential as an alternative to plant prebiotics at poultry. *Probiotics & Antimicrobial Proteins*, **14**, 49-59. DOI: [10.1007/s12602-021-09790-8](https://doi.org/10.1007/s12602-021-09790-8)

- Borman, A.M. & Johnson, E.M. (2021).** New names for fungi of medical importance: Can we have our cake & eat it too? *Journal of Clinical Microbiology*, **59**(3). DOI: [10.1128/JCM.02896-20](https://doi.org/10.1128/JCM.02896-20)
- Burkhardt, L. (2022).** *Eine enzyklopädie zu eponymischen pflanzennamen [Encyclopedia of eponymic plant names]* (in German). Berlin: Botanic Garden & Botanical Museum, Freie Universität Berlin.
- Castro-Bravo, N., Wells, J.M., Margolles, A. & Ruas-Madiedo, P. (2018).** Interactions of surface exopolysaccharides from *Bifidobacterium* & *Lactobacillus* within the intestinal environment. *Frontiers in Microbiology*, **9**, 2426. DOI: [10.3389/fmicb.2018.02426](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02426)
- Chaieb, K., Kouidhi, B., Jrah, H., Mahdouani, K. & Bakhrouf, A. (2011).** Antibacterial activity of thymoquinone, an active principle of nigella sativa & its potency to prevent bacterial biofilm formation. *BMC Complementary & Alternative Medicine*, **11** 29. <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/11/29>
- Çiftçi, M. & Öncül, N. (2022).** Ticari probiyotik içeceklerin bazı mikrobiyolojik özellikleri. *Akademik Ziraat Dergisi*, **11**(1), 165-178. DOI: [10.29278/azd.1002242](https://doi.org/10.29278/azd.1002242)
- Das, D., Baruah, R. & Goyal, A. (2014).** A food additive with prebiotic properties of an alpha-d-glucan from *Lactobacillus plantarum* DM5. *International Journal of Biological Macromolecules*, **69**, 20-26. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2014.05.029](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.029)
- Datta, S., Timson, D.J. & Annapure, U.S. (2017).** Antioxidant properties & global metabolite screening of the probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, **97**(9), 3039-3049. DOI: [10.1002/jsfa.8147](https://doi.org/10.1002/jsfa.8147)
- de Oliveira Coelho, B., Fiorda-Mello, F., de Melo Pereira, G., Thomaz-Soccol, V., Rakshit, S.K., de Carvalho, J.C. & Soccol, C.R. (2019).** In vitro probiotic properties & DNA protection activity of yeast & lactic acid bacteria isolated from a honey-based kefir beverage. *Foods*, **8**(10), 485. DOI: [10.3390/foods8100485](https://doi.org/10.3390/foods8100485)
- Doğan, M. (2012).** The effect mechanisms of probiotic bacteria in gastrointestinal system. *Electronic Journal of Food Technologies*, **7**(1), 20-27. e-ISSN:1306-7648.
- Douglass A.P., Offei B., Galleani, S.B., Coughlan, A.Y., Martos, A.A.R., Ortiz-Merino, R.A., Byrne K.P. & Wolfe, K.H. (2018).** Population genomics shows no distinction between pathogenic *Candida krusei* & environmental *Pichia kudriavzevii*: One species, four names. *PLoS Pathogens*, **14**(7), e1007138. DOI: [10.1371/journal.ppat.1007138](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007138)
- El-Ghawas, D.E., Elkhateeb, W.A., Akram, M. & Daba, G.M. (2021).** Yeast as biotechnological tool in food industry. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **5**(2), 1-6.
- Elleuch, M., Besbes, S., Roiseux, O., Blecker, C., Deroanne, C., Drira, N. & Attia, H. (2008).** Date flesh: Chemical composition & characteristics of the dietary fibre. *Food Chemistry*, **111**(3), 676-682. DOI: [10.1016/j.foodchem.2008.04.036](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.036)
- Fiore, C., Arrizon, J., Gschaedler A., Flores, J. & Romano, P. (2005).** Comparison between yeasts from grape & agave musts for traits of technological interest. *World Journal Microbiology Biotechnology*, **21**, 1141-1147. DOI: [10.1007/s11274-005-0196-5](https://doi.org/10.1007/s11274-005-0196-5)
- Gibson, G., Hutkins, R., Sanders, M., Prescott, S., Reimer, R. & Salminen, S. (2017).** Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition & scope of prebiotics (PDF). *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, **14**(8), 491-502. DOI: [10.1038/nrgastro.2017.75](https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75)
- Gientka, I., Blazejak, S., Stasiak-Rozanska, L. & Chlebowska-Smigiel, A. (2015).** Exopolysaccharides from yeast: Insight into optimal conditions for biosynthesis, chemical composition & functional properties. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. **14**(4), 283-292. DOI: [10.17306/J.AFS.2015.4.29](https://doi.org/10.17306/J.AFS.2015.4.29)
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C. & Sanders, M.E. (2014).** Expert consensus document: the international scientific association for probiotics & prebiotics consensus statement on the scope & appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, **11**(8), 506-514.
- Homayouni, A., Azizi, A., Oroojzadeh, P. & Pourjafar, H. (2020).** *Kluyveromyces marxianus* as a probiotic yeast: A mini-review. *Current Nutrition & Food Science*, **16**(8), 1163-1169. DOI: [10.2174/1573401316666200217113230](https://doi.org/10.2174/1573401316666200217113230)
- Humam, A.M., Loh, T.C., Foo, H.L., Izuddin, W.I., Zulkifli, I., Samsudin, A.A. & Mustapha, N.M. (2021).** Supplementation of postbiotic RI11 improves antioxidant enzyme activity, upregulated gut barrier genes, & reduced cytokine, acute phase protein, & heat shock protein 70 gene expression levels in heat-stressed broilers. *Poultry Science*, **100**(3), 100908. DOI: [10.1016/j.psj.2020.12.011](https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.12.011)
- Illanes, A. & Guerrero, C. (2016).** Functional foods & feeds: Probiotics, prebiotics, & synbiotics. *Lactose-Derived Prebiotics. A Process Perspective*, 35-86. DOI: [10.1016/B978-0-12-802724-0.00002-0](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802724-0.00002-0)
- Kanmani, R., Dhivya, S., Jayalakshmi, S. & Vijayabaskar, P. (2011).** Studies on detergent additives of protease enzyme from an estuarine bacterium *Bacillus cereus*.

- International Research Journal of Biotechnology*, 27, 157-163.
- Karaca, B., Haliscalik, O., Gursoy, M., Kiran, F., Loimaranta, V., Söderling, E. & Gursoy, U.K. (2022).** Analysis of chemical structure & antibiofilm properties of exopolysaccharides from *Lactiplantibacillus plantarum* EIR/IF-1. Postbiotics. *Microorganisms*, 10, 2200. DOI: [10.3390/microorganisms10112200](https://doi.org/10.3390/microorganisms10112200)
- Kerry, R.G., Patra, J.K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H.S., Das, G. (2018).** Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of Food & Drug Analysis*, 26(3), 927-939. DOI: [10.1016/j.jfda.2018.01.002](https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.01.002)
- Kim, Y., Oh, S. & Kim, S.H. (2009).** Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 379(2), 324-329. DOI: [10.1016/j.bbrc.2008.12.053](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.12.053)
- Koohestani, M., Moradi, M., Tajik, H. & Badali, A. (2018).** Effects of cell-free supernatant of *Lactobacillus acidophilus* LA5 & *Lactobacillus casei* 431 against planktonic form & biofilm of *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Research Forum*, 9(4), 301-306. DOI: [10.30466/vrf.2018.33086](https://doi.org/10.30466/vrf.2018.33086)
- Li, W., Ji, J., Chen, X., Jiang, M., Rui, X. & Dong, M. (2014).** Structural elucidation & antioxidant activities of exopolysaccharides from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. *Carbohydrate Polymers*, 102, 351-359. DOI: [10.1016/j.carbpol.2013.11.053](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.053)
- Li, S., Huang, R., Shah, N., Tao, X., Xiong, Y. & Wei, H. (2014).** Antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides from *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 and *Lactobacillus plantarum* R315. *Journal of Dairy Science*, 97(12), 7334-7343.
- Madigan, M., Bender, K., Buckley, D., Sattley, M. & Stahl, D. (2019).** *Brock Biology of Microorganisms*, 15th Global Edition, 1064s.
- Merchán, A.V., Benito, M.J., Galván, A.I. & Ruiz-Moyano Seco de Herrera, S. (2020).** Identification & selection of yeast with functional properties for future application in soft paste cheese. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie (LWT)*, 124, 109173. DOI: [10.1016/j.lwt.2020.109173](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109173)
- Moslehi-Jenebian, S., Pedersen, L.L. & Jespersen, L. (2010).** Beneficial effects of probiotic & food borne yeasts on human health. *Nutrients*, 2(4), 449-73. DOI: [10.3390/nu2040449](https://doi.org/10.3390/nu2040449)
- Nahar, S., Mizan, F.R., Ha, A.J.W. & Ha, S.D. (2018).** Advances & future prospects of enzyme-based biofilm prevention approaches in the food industry. *Comprehensive Reviews in Food Science & Food Safety*, 17(6), 1484-1502. DOI: [10.1111/1541-4337.12382](https://doi.org/10.1111/1541-4337.12382)
- Oberoi, H.S, Babbar, N., Sandhu, S.K., Dhaliwal, S.S., Kaur, U., Chadha, B.S. & Bhargav, V.K. (2012).** Ethanol production from alkali-treated rice straw via simultaneous saccharification & fermentation using newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39(4), 557-556. DOI: [10.1007/s10295-011-1060-2](https://doi.org/10.1007/s10295-011-1060-2)
- Okan Bakır, B. (2011).** Prebiyotik, probiyotik ve sinbiyotiklere genel bakış. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 40(2), 178-182.
- Pandey, K.R., Naik, S.R. & Vakil, B.V. (2015).** Probiotics, prebiotics & synbiotics- a review. *Journal of Food Science & Technology*, 52(12), 7577-7587. DOI: [10.1007/s13197-015-1921-1](https://doi.org/10.1007/s13197-015-1921-1)
- Rashad, M.M., Mahmoud, A.E., Abdou, H.M. & Nooman, M.U. (2011).** Improvement of nutritional quality of yeast antioxidant activities of yeast fermented soybean curd residues. *African Journal of Biotechnology*, 10(28), 5504-5513. DOI: [10.5897/AJB10.1658](https://doi.org/10.5897/AJB10.1658)
- Rengel dos Passos, F., Maestre, K.L., Florêncio da Silva, B., Rodrigues, A.C., Triques, C. C., Garcia, H.A., Fagundes-Klen, M.R., Antonio da Silva, E. & Fiorese, M.L. (2021).** Production of a synbiotic composed of galacto-oligosaccharides & *Saccharomyces boulardii* using enzymatic-fermentative method. *Food Chemistry*, 353, 129486. DOI: [10.1016/j.foodchem.2021.129486](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129486)
- Sadeghi, A., Ebrahimi, M., Shahryari, S., Kharazmi, M. & Jafari, S. (2022).** Food applications of probiotic yeasts; focusing on their techno-functional, postbiotic and protective capabilities. *Trends in Food Science and Technology*, 128, 278-295.
- Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M. M., Sanders, M. E., Shamir, R., Swann, J. R., Szajewska, H. & Vinderola, G. (2021).** The International Scientific Association of Probiotics & Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition & scope of postbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18, 649-667. DOI: [10.1038/s41575-021-00440-6](https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6)
- Sandasi, M., Leonard, C.M. & Viljoen, A.M. (2010).** The *in vitro* antibiofilm activity of selected culinary herbs & medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 50(1), 30-35. DOI: [10.1111/j.1472-765X.2009.02747.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02747.x)
- Sarikaya, H., Aslim, B. & Yuksekdağ, Z.N. (2017).** Assessment of anti-biofilm activity & bifidogenic growth stimulator (BGS) effect of lyophilized exopolysaccharides (L-EPSs) from *Lactobacilli* strains. *International Journal of Food Properties*, 20(2), 362-371. DOI: [10.1080/10942912.2016.1160923](https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1160923)
- Shi, Y., Davis, K., Zhang, F., Duffy, C & Yu, X. (2014).** Parameter estimation of a physically-based I&

- surface hydrologic model using the ensemble Kalman Filter: A synthetic experiment. *Water Resources Research*, **50**, 706-724. DOI: [10.1002/2013WR014070](https://doi.org/10.1002/2013WR014070)
- Smith, I.M., Baker, A., Arneborg, N. & Jespersen, L. (2015).** Non *Saccharomyces* yeasts protect against epithelial cell barrier disruption induced by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium. *Applied Microbiology*, **161**(5), 491-7. DOI: [10.1111/lam.12481](https://doi.org/10.1111/lam.12481)
- Socol, C.R., Vandenberghe, L.P.S., Spier, M.R., Medeiros, A.B.P., Yamagishi, C.T., Lindner, J.D.D., P&ey, A. & Thomaz-Socol, V. (2010).** The potential of probiotics. *Food Technology & Biotechnology*, **48**(4), 413-434. ISSN 1330-9862.
- Soliamani, O., Salimi, F. & Rezaei, A. (2022).** Characterization of exopolysaccharide produced by probiotic *Enterococcus durans* DU1 & evaluation of its anti-biofilm activity. *Archives of Microbiology*, **204**, 419. DOI: [10.1007/s00203-022-02965-z](https://doi.org/10.1007/s00203-022-02965-z)
- Stinson, L.F., Payne, M.S. & Keelan, J.A. (2017).** Planting the seed: origins, composition, & postnatal health significance of the fetal gastrointestinal microbiota. *Critical Reviews in Microbiology*, **43**(3), 352-369. DOI: [10.1080/1040841X.2016.1211088](https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1211088)
- Swanson, K.S., Gibson, G.R., Hutkins, R., Reimer, R.A., Reid, G., Verbeke, K., Scott, K.P., Holscher, H.D., Azad, M.B., Delzenne, N.M. & Sanders, M.E. (2020).** The International Scientific Association for Probiotics & Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition & scope of synbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, **17**, 687-701. DOI: [10.1038/s41575-020-0344-2](https://doi.org/10.1038/s41575-020-0344-2)
- Toushik, S.H., Mizan, F.R., Hossain, I. & Ha, S.D. (2020).** Fighting with old foes: The pledge of microbe-derived biological agents to defeat mono- & mixed-bacterial biofilms concerning food industries. *Trends in Food Science & Technology*, **99**, 413-425. DOI: [10.1016/j.tifs.2020.03.019](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.019)
- Tufarelli, V. & Laudadio, V. (2016).** An Overview on the functional food concept: perspectives & applied researches in probiotics, prebiotics & synbiotics. *Journal of Experimental Biology & Agricultural Sciences*. **4**(3), 273-278. ISSN: 2320-8694.
- Vargas-Ochoa, B., Mejía-Barajas, J., Clemente-Guerrero, M., Manzo-Avalos, S., Salgado-Garciglia, R. & Saavedra-Molina, A. (2016).** Evaluation of antioxidant activity from different yeast extracts. *Experimental Biology*, **30**(S1), 1174.22-1174.22. DOI: [10.1096/fasebj.30.1_supplement.1174.22](https://doi.org/10.1096/fasebj.30.1_supplement.1174.22)
- Wang, J., Zhao, X., Yang, Y., Zhao, A. & Yang, Z. (2015).** Characterization & bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32. *International Journal of Biological Macromolecules*. **74**, 119-126. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2014.12.006](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.12.006)
- Wang, Z., Zhao, Y., Jiang, Y. & Chu, W. (2021).** Prebiotic, antioxidant, and immunomodulatory properties of acidic exopolysaccharide from marine *Rhodotorula* RY1801. *Frontiers in Nutrition*, **8**, 134-141. DOI: [10.3389/fnut.2021.710668](https://doi.org/10.3389/fnut.2021.710668)
- Xu, X., Peng, Q., Zhang, Y., Tian, D., Zhang, P., Huang, Y., Ma, L., Dia, V. P., Qiao, Y. & Shi, B. (2020).** Antibacterial potential of a novel *Lactobacillus casei* strain isolated from Chinese northeast sauerkraut & the antibiofilm activity of its exopolysaccharides. *Food & Function*, **11**, 4697-4706. DOI: [10.1039/D0FO00905A](https://doi.org/10.1039/D0FO00905A)
- Yang, X., Li, L., Duan, Y. & Yang, X. (2017).** Antioxidant activity of JM113 *in vitro* & its protective effect on broiler chickens challenged with deoxynivalenol. *J. Anim. Sci.*, **95**(2), 837-846. DOI: [10.2527/jas.2016.0789](https://doi.org/10.2527/jas.2016.0789)
- Yi, Y., Huang, W. & Ge, Y. (2008).** Exopolysaccharide: A novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **24**(7), 1061. DOI: [10.1007/s11274-007-9575-4](https://doi.org/10.1007/s11274-007-9575-4)