

**T.C.**  
**BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**  
**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**



**TRÜF MANTARI BİLEŞİMİNİN, TRÜF MANTARI VE RİZOSFER**  
**ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN**  
**ANTİMİKROBİYAL, ANTİOKSİDAN VE ANTİKANSEROJEN ETKİLERİNİN**  
**BELİRLENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**TUĞÇE ÖNBAŞ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR**

**İKİNCİ TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Fadime KIRAN**

**BOLU, MAYIS 2024**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

**Tuğçe ÖNBAŞ** tarafından hazırlanan “**TRÜF MANTARI BİLEŞİMİNİN, TRÜF MANTARI VE RİZOSFER ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN ANTİMİKROBİYAL, ANTİOKSİDAN VE ANTİKANSEROJEN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**” adlı tez çalışması jürimiz tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda Doktora Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

02/05/2024

### Jüri Üyeleri

#### İmza

#### Danışman

Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR  
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

#### Üye

Prof. Dr. Serap COŞANSU AKDEMİR  
Sakarya Üniversitesi

.....

#### Üye

Prof. Dr. Hande Selen ERGE  
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

#### Üye

Prof. Dr. Yasin TUNCER  
Süleyman Demirel Üniversitesi

.....

#### Üye

Dr. Öğr. Üyesi İlker Turan AKOĞLU  
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

### Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

**Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL**  
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

## ETİK BEYAN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

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

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

Teze ilişkin Turnitin adlı programında enstitü müdürlüğünce belirlenen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan benzerlik raporuna göre, tezin benzerlik oranı %30'u geçmemektedir.

.....

**TUĞÇE ÖNBAŞ**

## ÖZET

**TRÜF MANTARI BİLEŞİMİNİN, TRÜF MANTARI VE RİZOSFER  
ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN  
ANTİMİKROBİYAL, ANTİOKSİDAN VE ANTİKANSEROJEN ETKİLERİNİN  
BELİRLENMESİ  
DOKTORA TEZİ  
TUĞÇE ÖNBAŞ  
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI  
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. İBRAHİM ÇAKIR)  
(İKİNCİ DANIŞMAN: PROF. DR. FADİME KIRAN)  
BOLU, 2024  
XVII+142 Sayfa**

Bu çalışmanın amacı, *Tuber aestivum* trüf mantar ekstraktları ile meyve ve rizosfer tabakasından izole edilen laktik asit bakterilerinin (LAB) hücre bağımsız ekstraktlarının (HBE) antimikrobiyal, antioksidan, antikanser özelliklerini belirlemek ve kimyasal bileşimlerini incelemektir. Trüf mikrobiyotasından ve rizosfer örneklerinden 14 bakteri izole edilmiş olup 12 tanesi *Enterococcus faecium*, 2 tanesi *Lactobacillus sakei* olarak tespit edilmiştir. Çalışma dahilinde izole edilen LAB izolatlarına ait HBE'lerin ve *T. aestivum* türünün hekzan, etil asetat, etanol, metanol ve su ekstraktlarının önemli patojenlere karşı inhibitör etkisi kuyu difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. *T. aestivum* etil asetat ve su ekstraktları ile (+)Tr1, (+)Tr2, (+)Tr3, (-)Tr1 LAB HBE'lerinin tüm patojen suşlar üzerinde inhibisyon etki sergilediği tespit edilmiştir. Seçilen ekstraktların antioksidan aktiviteleri fenolik, flavonoid içerik ve DPPH yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. En yüksek fenolik madde içeriği, 4.85 mg/g gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak trüf mantarı etil asetat ekstresinde, flavonoid madde içeriği ise 3.19 mg/g kuersetin eşdeğeri (QE) olarak trüf mantarı su ekstresinde tespit edilmiştir. Aerobik koşullarda kültüre edilen (+)Tr1 örneğinin fenolik içeriği en yüksek 16.94 mg/g GAE olarak saptanırken; (-)Tr1 anaerobik koşullarda kültüre edilen bakteri HBE'sinin fenolik içeriği en yüksek 18.24 mg/g GAE olarak belirlenmiştir. En yüksek flavonoid içeriğine 3.99 mg/g QE olarak (+)Tr4 HBE'sinin sahip olduğu görülmüştür. Tüm ekstraktların DPPH radikalini giderici etkisi ise %100 olarak tespit edilmiştir. Ekstrelerin kolon kanser hücre hattı (HT-29) ve hepatoselüler kanser hücre hattı (Hep40) üzerindeki sitotoksik etkileri MTT analizi neticesinde belirlenmiştir. Trüf etil asetat ekstresi kontrole kıyasla HT-29 hücrelerinin canlılığını %47 oranında, Hep40 hücrelerinin ise canlılığını %34 oranında azaltmıştır. Etil asetat ekstraktı, yüksek biyolojik aktivite göstermiş ve ellajik asit, naringenin, kateşin, 4-hidroksibenzoik asit, klorojenik asit gibi fitokimyasallar içerdiği belirlenmiştir. Seçilen LAB ekstraktlarının sitotoksik etkilileri (+)Tr1, (+)Tr2, (+)Tr3, (+)Tr4 ve (-)Tr1 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, trüf mantarı etil asetat ekstresi ve bazı *E. faecium* (+Tr1, +Tr2, +Tr3, +Tr4) ile *L. sakei* (-Tr1) HBE'lerinin doğal etken madde olarak kullanım potansiyeline sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

**ANAHTAR KELİMELER:** Trüf mantarı (*Tuber aestivum*), Laktik asit bakterileri, MALDI-TOF analizi, Fenolik bileşikler, Biyolojik aktivite, HPLC

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF THE ANTIMICROBIAL, ANTIOXIDANT AND ANTICARCINOGENIC EFFECTS OF TRUFFLE COMPOSITION, LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM TRUFFLE AND RHIZOSPHERE SAMPLES

DOCTORAL THESIS

TUĞÇE ÖNBAŞ

BOLU ABANT İZZET BAYSAL UNIVERSITY

INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES

DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING

(SUPERVISOR: PROF. DR. İBRAHİM ÇAKIR)

(CO-SUPERVISOR: PROF. DR. FADİME KIRAN)

BOLU, 2024

XVII+142 Pages

Within the scope of this thesis, antimicrobial, antioxidant, and anticancer properties and chemical composition of cell-free extracts (CFE) from both *Tuber aestivum* mushrooms and lactic acid bacteria (LAB) isolated from the *T. aestivum* and their rhizosphere layer were investigated. Fourteen bacteria were isolated from the truffle microbiota and rhizosphere samples: 12 *Enterococcus faecium* and 2 *Lactobacillus sakei*. The inhibitory effects of CFEs of isolated LAB strains and extracts of *T. aestivum* species with hexane, ethyl acetate, ethanol, methanol, and water on significant pathogens were determined by well diffusion method. The highest inhibitory effect against all pathogenic strains was observed in ethyl acetate, water extracts, and (+)Tr1, (+)Tr2, (+)Tr3, and (-)Tr1 LAB's CFEs. The antioxidant activities of the selected extracts were assessed using phenolic and flavonoid content, as well as the DPPH method. The highest phenolic content (4.85 mg/g GAE) and flavonoid content (2.03 mg/g QE) were found in the ethyl acetate extract. The water extract of truffle mushrooms exhibited the highest flavonoid content at 3.19 mg/g QE. The phenolic content of (+)Tr incubated under aerobic conditions was found to be 16.94 mg/g GAE while the CFE of (-)Tr1 incubated under anaerobic conditions showed the highest level at 18.24 mg/g GAE. The highest flavonoid content was determined to be 3.99 mg/g QE for (+)Tr4. All extracts exhibited a 100% DPPH radical scavenging effect. The cytotoxicity of the extracts on cancer cell lines (HT-29 and Hep40) was determined using the MTT assay. All extracts demonstrated moderate anticancer activities against all cancer cells ( $p<0.05$ ). Ethyl acetate extract showed strong antioxidant activities and revealed a 47% decrease in viability in HT-29 cells and a 34% decrease in Hep40 cells compared to control cells. The ethyl acetate extract exhibited high biological activity and contained phytochemicals such as ellagic acid, naringenin, catechin, 4-hydroxybenzoic acid, and chlorogenic acid. The selected LAB extracts showed cytotoxic effects, identified as (+)Tr1, (+)Tr2, (+)Tr3, (+)Tr4, and (-)Tr1. As a result, it was concluded that the truffle ethyl acetate extract and some *E. faecium* (+Tr1, +Tr2, +Tr3, +Tr4) and *L. sakei* (-Tr1) CFEs could be used as natural active agents.

**KEYWORDS:** Truffle (*Tuber aestivum*), Lactic acid bacteria, MALDI-TOF analysis, Phenolic compounds, Biological activity, HPLC

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

|                                                                                  |      |
|----------------------------------------------------------------------------------|------|
| KABUL VE ONAY SAYFASI.....                                                       | iii  |
| ETİK BEYAN.....                                                                  | iv   |
| ÖZET .....                                                                       | v    |
| ABSTRACT.....                                                                    | vi   |
| İÇİNDEKİLER .....                                                                | vii  |
| ŞEKİL LİSTESİ.....                                                               | x    |
| TABLO LİSTESİ.....                                                               | xiii |
| FOTOĞRAF LİSTESİ .....                                                           | xiv  |
| KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ .....                                              | xv   |
| TEŞEKKÜR .....                                                                   | xvii |
| 1. GİRİŞ .....                                                                   | 1    |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ.....                                                          | 4    |
| 2.1 Trüf Mantarı Hakkında Genel Bilgi .....                                      | 4    |
| 2.1.1 Trüf Mantarının Önemi.....                                                 | 4    |
| 2.1.2 Trüf Mantarı Türleri.....                                                  | 5    |
| 2.1.3 Trüf Mantarı Makro Bileşenleri.....                                        | 6    |
| 2.1.4 Trüf Mantarı ve Rizosfer Mikrobiyotası.....                                | 7    |
| 2.2 Laktik Asit Bakterileri.....                                                 | 9    |
| 2.2.1 Trüf Mantarı Kaynaklı Laktik Asit Bakterileri.....                         | 11   |
| 2.3 Gıda ve İnsan Kaynaklı Önemli Patojenler .....                               | 12   |
| 2.3.1 <i>Listeria monocytogenes</i> .....                                        | 12   |
| 2.3.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....                                         | 13   |
| 2.3.3 <i>Escherichia coli</i> O157:H7 .....                                      | 14   |
| 2.3.4 <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis..... | 14   |
| 2.3.5 <i>Bacillus subtilis</i> .....                                             | 15   |
| 2.3.6 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....                                        | 15   |
| 2.4 Trüf Mantarının Gıda ve Sağlık Alanındaki Fonksiyonları .....                | 16   |
| 2.4.1 Trüf Mantarının Antimikrobiyal Aktivite Özellikleri.....                   | 17   |
| 2.4.2 Trüf Mantarının Antioksidan Aktivite Özellikleri.....                      | 18   |
| 2.4.3 Trüf Mantarının Antikanser Aktivite Özellikleri.....                       | 19   |

|                                                                                   |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2.5 Laktik Asit Bakterilerinin Gıda ve Sağlık Açısından Önemi .....               | 21         |
| 2.5.1 Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Aktivite Özellikleri .....        | 22         |
| 2.5.2 Laktik Asit Bakterilerinin Antioksidan Aktivite Özellikleri .....           | 23         |
| 2.5.3 Laktik Asit Bakterilerinin Antikanser Aktivite Özellikleri .....            | 25         |
| 2.6 Fenolik Bileşikler ve Etkileri .....                                          | 26         |
| <b>3. MATERYAL ve YÖNTEM .....</b>                                                | <b>28</b>  |
| 3.1 Materyal.....                                                                 | 28         |
| 3.1.1 Bakteri Kültürleri ve Gelişme Koşulları .....                               | 28         |
| 3.1.2 Bakteri Kültürlerinin Saklanması .....                                      | 28         |
| 3.1.3 Tampon ve Çözeltiler.....                                                   | 29         |
| 3.2 Yöntem .....                                                                  | 31         |
| 3.2.1 Saha Çalışmaları .....                                                      | 31         |
| 3.2.2 Trüf Mantar Ekstraktlarının Elde Edilmesi .....                             | 32         |
| 3.2.3 Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu.....                                  | 37         |
| 3.2.4 İzolatların Ön Seçimi .....                                                 | 37         |
| 3.2.5 İzolatların MALDI-TOF Analizi ile Tanımlanması .....                        | 38         |
| 3.2.6 LAB İzolatlarına Ait Hücre Bağımsız Ekstraktların Hazırlanması .....        | 38         |
| 3.2.7 Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi .....                               | 40         |
| 3.2.8 Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi .....                                  | 40         |
| 3.2.8.1 Fenolik madde miktarının belirlenmesi .....                               | 40         |
| 3.2.8.2 Flavonoid madde miktarının belirlenmesi .....                             | 41         |
| 3.2.8.3 DPPH radikal yakalama aktivitenin belirlenmesi .....                      | 41         |
| 3.2.9 Antikanser Etkinin Belirlenmesi.....                                        | 42         |
| 3.2.10 Fenolik Madde İçerik Analizi .....                                         | 45         |
| 3.2.11 İstatiksel Analizler .....                                                 | 46         |
| <b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>                                               | <b>47</b>  |
| 4.1 Trüf Mantarı Toplanması ve Ekstraksiyonu.....                                 | 47         |
| 4.2 Trüf Mikrobiyotasından İzole Edilen Laktik Asit Bakterileri.....              | 48         |
| 4.3.Trüf Mikrobiyotasından İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması.. | 52         |
| 4.4 Antimikrobiyal Aktivite Sergileyen İzolat ve Ekstraktların Seçimi.....        | 53         |
| 4.5 Ekstraktların Antioksidan Aktiviteleri .....                                  | 64         |
| 4.5.1 Toplam Fenolik Madde Miktarı Sonuçları .....                                | 64         |
| 4.5.2 Toplam Flavonoid Madde Miktarı Sonuçları .....                              | 68         |
| 4.5.3 DPPH Radikal Yakalama Aktivite Analiz Sonuçları .....                       | 71         |
| 4.6 Ekstraktların Antikanser Etkileri.....                                        | 75         |
| 4.7 Ekstraktların Fenolik ve Flavonoid Madde İçerikleri .....                     | 97         |
| <b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER .....</b>                                                 | <b>119</b> |
| <b>6. KAYNAKLAR .....</b>                                                         | <b>121</b> |

|                                 |            |
|---------------------------------|------------|
| <b>7. EKLER.....</b>            | <b>138</b> |
| EK 1- Kalibrasyon Eğrileri..... | 138        |



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 1.</b> Mantar gövdelerinde, ektomikorizalarında ve toprakta bulunan bakteriyel topluluklar (Çubuklar literatürde rapor edilen minimum ve maksimum değerleri temsil ederken, noktalar tek bir literatür değerini göstermektedir. Literatür verisi bulunmayan bölümler boş bırakılmıştır) (Vahdatzadeh vd., 2015) ..... | 9  |
| <b>Şekil 2.</b> (a) Toplam fenolik madde tayini için standartta reaksiyona bağlı meydana gelen renk değişimi, (b) Gallik asit kalibrasyon eğrisi .....                                                                                                                                                                         | 66 |
| <b>Şekil 3.</b> Trüf mantarı ekstraktlarının mg/g gallik asit eşdeğeri cinsinden fenolik içerik sonuçları .....                                                                                                                                                                                                                | 67 |
| <b>Şekil 4.</b> Hücre bağımsız ekstraktlarının mg/g gallik asit eşdeğeri cinsinden fenolik içerik sonuçları .....                                                                                                                                                                                                              | 67 |
| <b>Şekil 5.</b> (a) Toplam flavonoid madde miktar tayini için standartta reaksiyona bağlı meydana gelen renk değişimi, (b) Kuersetin kalibrasyon eğrisi .....                                                                                                                                                                  | 68 |
| <b>Şekil 6.</b> Hücre bağımsız ekstraktlarının ve trüf mantarı ekstraktlarının mg/g kuersetin eşdeğeri cinsinden flavonoid içerik sonuçları .....                                                                                                                                                                              | 69 |
| <b>Şekil 7.</b> (a) DPPH radikal yakalama aktivite tayini için standartta reaksiyona bağlı meydana gelen renk değişimi; (b) Antioksidan aktivite tayini, reaksiyona bağlı meydana gelen mor rengin şiddeti .....                                                                                                               | 72 |
| <b>Şekil 8.</b> Ekstraktların % antioksidan aktivitesi .....                                                                                                                                                                                                                                                                   | 73 |
| <b>Şekil 9.</b> <i>T. aestivum</i> hekzan ekstraktının HT-29 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns $p \geq 0.05$ (anlamli değil); ** $p < 0.01$ (yüksek düzeyde anlamli)) .....                                                                                                                                             | 77 |
| <b>Şekil 10.</b> <i>T. aestivum</i> etil asetat ekstraktının HT-29 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (**** $p < 0.0001$ (son derece yüksek düzeyde anlamli)) .....                                                                                                                                                          | 77 |
| <b>Şekil 11.</b> <i>T. aestivum</i> etanol ekstraktının HT-29 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns $p \geq 0.05$ (anlamli değil); ** $p < 0.01$ (yüksek düzeyde anlamli)) .....                                                                                                                                            | 78 |
| <b>Şekil 12.</b> <i>T. aestivum</i> metanol ekstraktının HT-29 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns $p \geq 0.05$ (anlamli değil); * $p < 0.05$ (anlamli)) .....                                                                                                                                                           | 78 |
| <b>Şekil 13.</b> <i>T. aestivum</i> su ekstraktının HT-29 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (** $p < 0.001$ (çok yüksek düzeyde anlamli); **** $p < 0.0001$ (son derece yüksek düzeyde anlamli)) .....                                                                                                                      | 79 |
| <b>Şekil 14.</b> <i>T. aestivum</i> hekzan ekstraktının Hep40 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns $p \geq 0.05$ (anlamli değil)) .....                                                                                                                                                                                    | 80 |
| <b>Şekil 15.</b> <i>T. aestivum</i> etil asetat ekstraktının Hep40 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (* $p < 0.05$ (anlamli); ** $p < 0.01$ (yüksek düzeyde anlamli); *** $p < 0.001$ (çok yüksek düzeyde)) .....                                                                                                           | 80 |
| <b>Şekil 16.</b> <i>T. aestivum</i> etanol ekstraktının Hep40 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns $p \geq 0.05$ (anlamli değil); ** $p < 0.01$ (yüksek düzeyde anlamli); *** $p < 0.001$ (çok yüksek düzeyde)) .....                                                                                                      | 81 |

|                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 17.</b> <i>T. aestivum</i> metanol ekstraktının Hep40 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns $p \geq 0.05$ (anlamalı değil); * $p < 0.05$ (anlamalı)).....                                                                     | 81 |
| <b>Şekil 18.</b> <i>T. aestivum</i> su ekstraktının Hep40 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns $p \geq 0.05$ (anlamalı değil)).....                                                                                                   | 82 |
| <b>Şekil 19.</b> (+)Tr 1 hücre bağımsız ekstraktının HT-29 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns $p \geq 0.05$ (anlamalı değil); * $p < 0.05$ (anlamalı); *** $p < 0.001$ (çok yüksek düzeyde)) ...                                    | 85 |
| <b>Şekil 20.</b> (+)Tr 2 hücre bağımsız ekstraktının HT-29 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns $p \geq 0.05$ (anlamalı değil); * $p < 0.05$ (anlamalı); ** $p < 0.01$ (yüksek düzeyde anlamalı)).                                    | 85 |
| <b>Şekil 21.</b> (+)Tr 3 hücre bağımsız ekstraktının HT-29 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns $p \geq 0.05$ (anlamalı değil); * $p < 0.05$ (anlamalı)).....                                                                         | 86 |
| <b>Şekil 22.</b> (+)Tr 4 hücre bağımsız ekstraktının HT-29 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns $p \geq 0.05$ (anlamalı değil); * $p < 0.05$ (anlamalı); ** $p < 0.01$ (yüksek düzeyde anlamalı)).                                    | 86 |
| <b>Şekil 23.</b> (+)TR 18 hücre bağımsız ekstraktının HT-29 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns $p \geq 0.05$ (anlamalı değil); * $p < 0.05$ (anlamalı)).....                                                                        | 87 |
| <b>Şekil 24.</b> (-)Tr 1 hücre bağımsız ekstraktının HT-29 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns $p \geq 0.05$ (anlamalı değil); ** $p < 0.01$ (yüksek düzeyde anlamalı); *** $p < 0.001$ (çok yüksek düzeyde)) .....                  | 87 |
| <b>Şekil 25.</b> (-)TR 16 hücre bağımsız ekstraktının HT-29 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns $p \geq 0.05$ (anlamalı değil); ** $p < 0.01$ (yüksek düzeyde anlamalı); *** $p < 0.001$ (çok yüksek düzeyde)) .....                 | 88 |
| <b>Şekil 26.</b> (-)TR 26 hücre bağımsız ekstraktının HT-29 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (** $p < 0.01$ (yüksek düzeyde anlamalı); *** $p < 0.001$ (çok yüksek düzeyde)).....                                                     | 88 |
| <b>Şekil 27.</b> (+)Tr 1 hücre bağımsız ekstraktının Hep40 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns $p \geq 0.05$ (anlamalı değil); **** $p < 0.0001$ (son derece yüksek düzeyde anlamalı)).....                                          | 90 |
| <b>Şekil 28.</b> (+)Tr 2 hücre bağımsız ekstraktının Hep40 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns $p \geq 0.05$ (anlamalı değil); **** $p < 0.0001$ (son derece yüksek düzeyde anlamalı)).....                                          | 90 |
| <b>Şekil 29.</b> (+)Tr 3 hücre bağımsız ekstraktının Hep40 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns $p \geq 0.05$ (anlamalı değil); ** $p < 0.01$ (yüksek düzeyde anlamalı); **** $p < 0.0001$ (son derece yüksek düzeyde anlamalı))..... | 91 |
| <b>Şekil 30.</b> (+)Tr 4 hücre bağımsız ekstraktının Hep40 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns $p \geq 0.05$ (anlamalı değil); **** $p < 0.0001$ (son derece yüksek düzeyde anlamalı)).....                                          | 91 |
| <b>Şekil 31.</b> (+)TR 18 hücre bağımsız ekstraktının Hep40 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns $p \geq 0.05$ (anlamalı değil)).....                                                                                                 | 92 |
| <b>Şekil 32.</b> (-)Tr 1 hücre bağımsız ekstraktının Hep40 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns $p \geq 0.05$ (anlamalı değil); **** $p < 0.0001$ (son derece yüksek düzeyde anlamalı)).....                                          | 92 |
| <b>Şekil 33.</b> (-)TR 16 hücre bağımsız ekstraktının Hep40 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns $p \geq 0.05$ (anlamalı değil); ** $p < 0.01$ (yüksek düzeyde anlamalı); *** $p < 0.001$ (çok yüksek düzeyde)) .....                 | 93 |
| <b>Şekil 34.</b> (-)TR 26 hücre bağımsız ekstraktının Hep40 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns $p \geq 0.05$ (anlamalı değil)).....                                                                                                 | 93 |
| <b>Şekil 35.</b> <i>T. aestivum</i> ekstraktlarının Gallik Asit, 4-Hidroksibenzoik Asit, Klorojenik Asit, Vanilik Asit, Kafeik Asit, Ellajik Asit, p-Kumarik Asit, Ferulik Asit, Kateşin ve                                               |    |

Naringenin aktif bileşiklerin piklerini gösteren 254 nm dalga boyunda ölçülen kromatogramları; (a) Hekzan ekstraktlarının ana aktif bileşiklerinin piklerini gösteren kromatogramları; (b) Etil asetat ekstraktlarının ana aktif bileşiklerinin piklerini gösteren kromatogramları; (c) Etanol ekstraktlarının ana aktif bileşiklerinin piklerini gösteren kromatogramları; (d) Metanol ekstraktlarının ana aktif bileşiklerinin piklerini gösteren kromatogramları; (e) Su ekstraktlarının ana aktif bileşiklerinin piklerini gösteren kromatogramları..... 98

**Şekil 36.** Trüf mantarı etil asetat ekstraktının ana kimyasal bileşimlerinin sonuçları ..106

**Şekil 37.** LAB ekstraktlarının Gallik Asit, 4-Hidroksibenzoik Asit, Klorojenik Asit, Vanilik Asit, Kafeik Asit, Ellajik Asit, p-Kumarik Asit, Ferulik Asit, Kateşin ve Naringenin aktif bileşiklerin piklerini gösteren 254 nm dalga boyunda ölçülen kromatogramları; (a) (+)Tr1 hücre bağımsız ekstraktının ana aktif bileşiklerinin piklerini gösteren kromatogramları; (b) (+)Tr2 hücre bağımsız ekstraktının ana aktif bileşiklerinin piklerini gösteren kromatogramları; (c) (+)Tr3 hücre bağımsız ekstraktının ana aktif bileşiklerinin piklerini gösteren kromatogramları; (d) (+)Tr4 hücre bağımsız ekstraktının ana aktif bileşiklerinin piklerini gösteren kromatogramları; (e) (-)Tr1 hücre bağımsız ekstraktının ana aktif bileşiklerinin piklerini gösteren kromatogramları..... 109

**Şekil 38.** Hücre bağımsız ekstraktlarının ana kimyasal bileşimlerinin sonuçları ..... 116

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

|                                                                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tablo 1.</b> Patojen suşlar ve gelişim koşulları .....                                                                                             | 28  |
| <b>Tablo 2.</b> Çalışmada kullanılan besiyeri çözelti ve kimyasalların içerikleri.....                                                                | 30  |
| <b>Tablo 3.</b> HPLC koşulları .....                                                                                                                  | 46  |
| <b>Tablo 4.</b> Çalışmada kullanılan kültürler, gelişim koşulları ve kaynakları.....                                                                  | 49  |
| <b>Tablo 5.</b> İzolatların MALDI-TOF analizi neticesinde tür düzeyindeki tanımlama sonucu .....                                                      | 53  |
| <b>Tablo 6.</b> Trüf mantarı ekstraktlarının patojenlere karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapları.....                                             | 55  |
| <b>Tablo 7.</b> Aerobik koşullarda kültüre edilen LAB izolatlarına ait HBE'lerin patojenlere karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapları .....        | 56  |
| <b>Tablo 8.</b> Anaerobik koşullarda kültüre edilen LAB izolatlarına ait HBE'leri patojenlere karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapları .....       | 57  |
| <b>Tablo 9.</b> <i>T. aestivum</i> ekstraktlarının sitotoksik aktiviteleri .....                                                                      | 83  |
| <b>Tablo 10.</b> LAB hücre bağımsız ekstraktlarının sitotoksik aktiviteleri .....                                                                     | 94  |
| <b>Tablo 11.</b> Kanseri hücrelerinde canlılıkta % azalma.....                                                                                        | 95  |
| <b>Tablo 12.</b> Hekzan ekstraktındaki ana kimyasal bileşimlerinin gözlemlendiği alıkonma zamanları ve konsantrasyonları (ekran görüntüsü) .....      | 103 |
| <b>Tablo 13.</b> Etil asetat ekstraktındaki ana kimyasal bileşimlerinin gözlemlendiği alıkonma zamanları ve konsantrasyonları (ekran görüntüsü) ..... | 103 |
| <b>Tablo 14.</b> Etanol ekstraktındaki ana kimyasal bileşimlerinin gözlemlendiği alıkonma zamanları ve konsantrasyonları (ekran görüntüsü) .....      | 104 |
| <b>Tablo 15.</b> Metanol ekstraktındaki ana kimyasal bileşimlerinin gözlemlendiği alıkonma zamanları ve konsantrasyonları (ekran görüntüsü) .....     | 104 |
| <b>Tablo 16.</b> Su ekstraktındaki ana kimyasal bileşimlerinin gözlemlendiği alıkonma zamanları ve konsantrasyonları (ekran görüntüsü).....           | 105 |
| <b>Tablo 17.</b> (+) Tr1 HBE ana kimyasal bileşimlerinin gözlemlendiği alıkonma zamanları ve konsantrasyonları (ekran görüntüsü).....                 | 114 |
| <b>Tablo 18.</b> (+) Tr2 HBE ana kimyasal bileşimlerinin gözlemlendiği alıkonma zamanları ve konsantrasyonları (ekran görüntüsü).....                 | 114 |
| <b>Tablo 19.</b> (+) Tr3 HBE ana kimyasal bileşimlerinin gözlemlendiği alıkonma zamanları ve konsantrasyonları (ekran görüntüsü).....                 | 115 |
| <b>Tablo 20.</b> (+) Tr4 HBE ana kimyasal bileşimlerinin gözlemlendiği alıkonma zamanları ve konsantrasyonları (ekran görüntüsü).....                 | 115 |
| <b>Tablo 21.</b> (-) Tr1 HBE ana kimyasal bileşimlerinin gözlemlendiği alıkonma zamanları ve konsantrasyonları (ekran görüntüsü).....                 | 116 |

## FOTOĞRAF LİSTESİ

### Sayfa

|                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Fotoğraf 1.</b> Trüf mantarı toplama aşamaları .....                                                                                   | 31 |
| <b>Fotoğraf 2.</b> Trüf mantarı genel görüntüsü .....                                                                                     | 32 |
| <b>Fotoğraf 3.</b> Toplanan trüf örneklerine ait kesitler .....                                                                           | 33 |
| <b>Fotoğraf 4.</b> Liyofilizasyon işlemi genel görüntüsü .....                                                                            | 33 |
| <b>Fotoğraf 5.</b> Toz forma getirilen mantar numuneleri genel görüntüsü .....                                                            | 34 |
| <b>Fotoğraf 6.</b> Farklı çözücülerle yapılan mantar ekstraksiyonunun temsili görüntüsü .....                                             | 34 |
| <b>Fotoğraf 7.</b> Ekstraktların filtre kağıdı yardımı ile süzülme aşaması .....                                                          | 35 |
| <b>Fotoğraf 8.</b> Ekstraktların döner buharlaştırıcı yardımıyla konsantre edilmesi .....                                                 | 36 |
| <b>Fotoğraf 9.</b> Ekstraktların liyofilizasyon sonrası genel görüntüleri .....                                                           | 36 |
| <b>Fotoğraf 10.</b> Laktik asit bakterileri HBE eldesi aşamaları .....                                                                    | 39 |
| <b>Fotoğraf 11.</b> Kolorektal kanser hücre hattı (HT-29) mikroskop görüntüsü .....                                                       | 43 |
| <b>Fotoğraf 12.</b> Karaciğer kanser hücre hattı (Hep40) mikroskop görüntüsü .....                                                        | 43 |
| <b>Fotoğraf 13.</b> Keratinosit hücre hattı (HaCaT) mikroskop görüntüsü .....                                                             | 44 |
| <b>Fotoğraf 14.</b> Analizde kullanılan Shimadzu Prominence LC-20A Model HPLC cihazı .....                                                | 45 |
| <b>Fotoğraf 15.</b> HPLC enjeksiyon sistemi için hazırlık aşamaları .....                                                                 | 46 |
| <b>Fotoğraf 16.</b> Gram boyama yapılmış LAB izolatlarının ışık mikroskopundaki görüntüleri (1000x) .....                                 | 50 |
| <b>Fotoğraf 17.</b> Seçilen izolatların HBE'lerinin <i>L. monocytogenes</i> ATCC 13932 patojenine karşı inhibisyon zon çapları (mm) ..... | 59 |
| <b>Fotoğraf 18.</b> Seçilen izolatların HBE'lerinin <i>S. aureus</i> ATCC 25923 patojenine karşı inhibisyon zon çapları (mm) .....        | 59 |
| <b>Fotoğraf 19.</b> Seçilen izolatların HBE'lerinin <i>E. coli</i> O157 ATCC 43888 patojenine karşı inhibisyon zon çapları (mm) .....     | 60 |
| <b>Fotoğraf 20.</b> Seçilen izolatların HBE'lerinin <i>S. Enteritidis</i> NCTC 12694 patojenine karşı inhibisyon zon çapları (mm) .....   | 60 |
| <b>Fotoğraf 21.</b> Seçilen izolatların HBE'lerinin <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 patojenine karşı inhibisyon zon çapları (mm) .....    | 61 |
| <b>Fotoğraf 22.</b> Seçilen izolatların HBE'lerinin <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 patojenine karşı inhibisyon zon çapları (mm) .....       | 61 |
| <b>Fotoğraf 23.</b> Seçilen izolatların HBE'lerinin MRSA ATCC 43300 patojenine karşı inhibisyon zon çapları (mm) .....                    | 62 |

## KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

|                                                  |                                                                       |
|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| <b>ABD</b>                                       | : Amerika Birleşik Devletleri                                         |
| <b>AD</b>                                        | : Atopik Dermatit                                                     |
| <b>AlCl<sub>3</sub></b>                          | : Alüminyum Klorür                                                    |
| <b>ANOVA</b>                                     | : Analysis of Variance, Varyans Analizi                               |
| <b>ATCC</b>                                      | : Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu                                     |
| <b>ATP</b>                                       | : Adenozin Trifosfat                                                  |
| <b>Bç</b>                                        | : Baz Çifti                                                           |
| <b>BHI</b>                                       | : Brain Heart Infusion                                                |
| <b>BLAST</b>                                     | : Basic Local Alignment Search Tool                                   |
| <b>C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub></b> | : Sodyum Asetat                                                       |
| <b>C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O</b>               | : Saf Etanol                                                          |
| <b>CFE</b>                                       | : Cell Free Extract                                                   |
| <b>cm<sup>2</sup></b>                            | : Santimetrekare                                                      |
| <b>dH<sub>2</sub>O</b>                           | : Distile Su                                                          |
| <b>DMEM</b>                                      | : Dulbecco's Modified Eagle's Medium                                  |
| <b>DNA</b>                                       | : Deoksiribo Nükleik Asit                                             |
| <b>dNTP</b>                                      | : Deoksinükleotidtrifosfat                                            |
| <b>DPPH</b>                                      | : 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil                                        |
| <b>EDTA</b>                                      | : Etilendiamin Tetraasetik Asit                                       |
| <b>EFSA</b>                                      | : The European Food Safety Authority, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi |
| <b>FAO</b>                                       | : Food and Agriculture Organization; Gıda ve Tarım Örgütü             |
| <b>FDA</b>                                       | : U.S. Food and Drug Administration, ABD Gıda ve İlaç Dairesi         |
| <b>g</b>                                         | : Gram                                                                |
| <b>GA</b>                                        | : Gallik Asit                                                         |
| <b>GC-MS</b>                                     | : Gaz Kromatografi-Kütle Spektroskopisi                               |
| <b>GIT</b>                                       | : Gastrointestinal                                                    |
| <b>GM17</b>                                      | : Glukoz M17 Besiyeri                                                 |
| <b>GRAS</b>                                      | : Generally Recognized As Safe, Genel Olarak Güvenli                  |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>                | : Hidrojen Peroksit                                                   |
| <b>HaCaT</b>                                     | : Keratinocyte Cells, Keratinosit Hücreleri                           |
| <b>HBE</b>                                       | : Hücre Bağımsız Ektrakt                                              |
| <b>Hep40</b>                                     | : Hepatocellular Carcinoma Cells, Hepatoselüler Karsinom Hücreleri    |
| <b>HPLC</b>                                      | : Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi                                  |
| <b>HT-29</b>                                     | : Colorectal Adenocarcinoma Cell, Kolorektal Adenokarsinom Hücresi    |
| <b>IC<sub>50</sub></b>                           | : İnhibitör Konsantrasyonu                                            |
| <b>Kob</b>                                       | : Koloni Oluşturan Birim                                              |
| <b>L</b>                                         | : Litre                                                               |
| <b>LAB</b>                                       | : Laktik Asit Bakterileri                                             |
| <b>LC-MS</b>                                     | : Likit Kromatografi Tandem Kütle Spektroskopisi                      |
| <b>M</b>                                         | : Molar                                                               |
| <b>MALDI-TOF</b>                                 | : Matrix Assisted Laser Desorption IonizationTime of Flight           |
| <b>mg</b>                                        | : Miligram                                                            |
| <b>MH</b>                                        | : Mueller Hinton                                                      |
| <b>MIK</b>                                       | : Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu                                   |
| <b>mL</b>                                        | : Mililitre                                                           |

|                                     |                                                                    |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| <b>mm</b>                           | : Milimetre                                                        |
| <b>mM</b>                           | : Milimolar                                                        |
| <b>MRS</b>                          | : De Man, Rogosa and Sharpe besiyeri                               |
| <b>MRSA</b>                         | : Metisilin-dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>                  |
| <b>N</b>                            | : Normal                                                           |
| <b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b> | : Sodyum Karbonat                                                  |
| <b>NaCl</b>                         | : Sodyum Klorür                                                    |
| <b>NCBI</b>                         | : National Center for Biotechnology Information                    |
| <b>ng</b>                           | : Nanogram                                                         |
| <b>nm</b>                           | : Nanometre                                                        |
| <b>°C</b>                           | : Santigrat (Celcius) Derece                                       |
| <b>PBS</b>                          | : Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu                                    |
| <b>pH</b>                           | : Hidrojen Konsantrasyonunun Kologaritması                         |
| <b>PZR</b>                          | : Polimeraz Zincir reaksiyonu                                      |
| <b>QPS</b>                          | : Nitelikli Güvenlik Tahmini                                       |
| <b>rDNA</b>                         | : Ribozomal Deoksiribo Nükleik Asit                                |
| <b>ROS</b>                          | : Reaktif Oksijen Türleri                                          |
| <b>rRNA</b>                         | : Ribozomal Ribonükleik Asit                                       |
| <b>SF</b>                           | : Serum Fizyolojik                                                 |
| <b>SPME</b>                         | : Katı Faz Mikroekstraksiyon                                       |
| <b>SPSS</b>                         | : Statistical Package for the Social Sciences                      |
| <b>TBE</b>                          | : Tris Borik Asit EDTA                                             |
| <b>U</b>                            | : Unite                                                            |
| <b>WHO</b>                          | : World Health Organization; Dünya Sağlık Örgütü                   |
| <b>WiDr</b>                         | : Colorectal Adenocarcinoma Cell, Kolorektal Adenokarsinom Hücresi |
| <b><math>\alpha</math></b>          | : Alfa                                                             |
| <b><math>\beta</math></b>           | : Beta                                                             |
| <b><math>\gamma</math></b>          | : Gama                                                             |
| <b><math>\mu</math>g</b>            | : Mikrogram                                                        |
| <b><math>\mu</math>L</b>            | : Mikrolitre                                                       |
| <b><math>\mu</math>M</b>            | : Mikromolar                                                       |
| <b><math>\mu</math>m</b>            | : Mikrometre                                                       |

## TEŞEKKÜR

Öncelikle danışmanlığımı üstlenen, bu yolda bana her zaman güvenen sevgili danışman hocam Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR'a (Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Gıda Mühendisliği ABD), hayatıma kattığı değeri asla unutmayacağım, bana imkanlarını sonuna kadar açan saygıdeğer eş danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fadime KIRAN'a (Ankara Üniversitesi, Biyoloji ABD), tez izleme komitesinde yer alan ve değerli görüşleriyle araştırmamın şekillenmesine katkı sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Serap COŞANSU AKDEMİR'e (Sakarya Üniversitesi, Gıda Mühendisliği ABD), Dr. Öğr. Üyesi İlker Turan AKOĞLU'na (Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Gıda Mühendisliği ABD), laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan hocam Ozan HALİŞCELİK'e, Hazal KİBAR DEMİRHAN'a, Emine OMER OGLOU'na, Seval TALİBOĞLU'na, Buket ÇELİK'e, Sultan GÖLPEK'e, İlknur AĞUN'a ve Buse SAFRANCI'ya (Ankara Üniversitesi, Biyoloji ABD, Farmabiyotik Teknolojileri Araştırma Laboratuvarı)

Manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili dostlarım F. Gökçe CANKARA, Fevziye ASLAN, Selin SANCI BAYRAK, Gülçin MERGEN ve Orhan DEMİR'e

Hayatım boyunca bana inanan, düştüğümde ayağa kalkmamı sağlayan sevgili annem Arzu ÖNBAŞ'a, arazi süreci dahil tüm süreçlerde yanımda olan canım babam Bünyamin ÖNBAŞ'a, ve her zaman manevi desteğini eksik etmeyen sevgili kardeşim Dr. Berat ÖNBAŞ'a

Bu doktora tezi, “Farklı Coğrafi Ortamlardan Örneklenen Trüf Mantarının Antioksidan ve Antiproliferatif Etkinliğinin Belirlenmesi” başlıklı “Diğer Çalışmalar” adı altında desteklenmiş olup, katkılarından dolayı Orman Genel Müdürlüğü, Orman Ağaçları ve Tohumları Islah Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Akademik hayatın bu taşlı yollarında yürümeye çalışırken hala pes etmemiş olan kendime

TEŞEKKÜRLER....

Tuğçe ÖNBAŞ

Ankara, Mart 2024

## 1. GİRİŞ

Günümüzde trüf mantarı ile gerçekleştirilen araştırmaların çoğunluğu tür tanımlamasına ve kimyasal özelliklerine (beslenme ve aromatik profil) odaklanmaktadır. Ancak, trüf mantarının katma değerini artırmak ve ülkemizde bulunan bu ürünün potansiyelini ortaya çıkartmak için daha fazla bilimsel çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Birçok mantar türü, besinsel özellikleri nedeniyle oldukça değerli kabul edilmekte ve yerel kültürel kimlikte önemli bir rol oynamaktadır. Aynı türlerin farklı coğrafi bölgelerden toplanan örnekleri ise farklı görünüm ve kimyasal profiller sergileyebilmekte ve bunlara bağlı olarak da farklı terapötik özelliklere sahip olabilmektedir. Dolayısıyla, herhangi bir bölgeden toplanan trüf mantarının kimyasal bileşiminin ve terapötik özelliklerinin sistematik bir analizi, gelecekte farklı alanlarda etkili bir şekilde kullanılmasının temelini hazırlayabilecektir. Ülkemizdeki trüf mantar türlerinin gıda açısından önemli içerikleri barındırmalarının yanı sıra sağlık açısından önemini de vurgulamak, yerel trüfün ticari pazardaki önemine büyük ölçüde katkı sağlayacaktır. Mantar bileşenlerinin sağlık üzerine olumlu etkilerini içeren patentlerin varlığı ise trüf orijinli metabolitleri ya da probiyotik özellikli laktik asit bakterilerini içeren ürünleri endüstriyel olarak işleyerek ticari olarak kullanma arzusunun kanıtıdır (Thomas vd., 2021). Bu tez çalışması kapsamında, İstanbul Belgrad Ormanı'ndan toplanan *Tuber aestivum* trüf mantarı ekstraktları ile bu mantarın trüf bölümü ve rizosfer örneklerinden izole edilen laktik asit bakteri (LAB) izolatlarının hücre dışı ekstraktlarının (HBE) antimikrobiyal, antioksidan ve antikanserojen özelliklerinin belirlenmesi ve en etkin ekstraktın metabolit profilinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma dahilinde, ülkemizin önemli ekonomik ve besin değerlerinden biri olarak kabul edilen trüf mantarının mikrobiyotasına yönelik potansiyel bakteriler izole edilmiş olunacak ve trüf türünün özgünlüğünü yansıtacak terapötik etkinliklerine yönelik veriler elde edilmiş olunacaktır. Trüf mantarları ve trüf mantarı rizosfer örneklerinden elde edilen çıktılar ileride yüksek katma değerli yeni tıbbi ürünlere kaynak oluşturabilecektir. Türkiye'de belirlenen bölgede daha önce *T. aestivum* türünün metabolit içeriklerini belirlemeye ve trüf mantarı ile rizosfer tabakasından izole edilen LAB suşlarının terapötik etkilerini tespit etmeye yönelik yürütülmüş herhangi bir çalışma olmaması doktora tezini özgün kılmaktadır.

### **Tezin sonunda varılması öngörülen nokta;**

Trüf mantarı ekstraktlarının, trüf mantarı ve rizosfer örneklerinden izole edilen LAB izolatları HBE'lerinin potansiyel antimikrobiyal, antioksidan ve antikanserojen etkinliğinin tespit edilmesi ve etkin ekstraktların içerik analizinin yapılması amaçlanmaktadır.

**Araştırma sorusu:** Trüf mantarı ekstraktları ile trüf mantarı ve rizosfer örneklerinden izole edilen LAB izolatlarının HBE'leri antimikrobiyal, antioksidan ve antikanserojen etkinlik açısından terapötik özellikler sergiliyor mu?

**Hipotez:** Bölgeye spesifik metabolit ve mikrobiyota parmak izi sergileyen trüf mantarının ülkemize özgü ekstraktları ile, trüf mantarı ve rizosfer örneklerinden izole edilen LAB izolatlarının HBE'leri terapötik bir etkinliğe sahip olup katma değeri yüksek yeni ve doğal bir hammadde olarak tıbbi amaçla kullanılabilir.

### **Kısa dönemli hedefler:**

- Trüf mantar örneklerinin Trüf Mantarı Tanıtım ve Araştırma Derneği katkılarıyla İstanbul Belgrad Ormanı'ndan toplanması ve analizler için hazırlanması
- Farklı çözücüler kullanılarak trüf mantar ekstraksiyonunun yapılması
- Trüf mantarı ve rizosfer örneklerinden seçici besiyeri kullanılarak mikrobiyolojik yöntemlerle kültüre edilebilir bakterilerin izolasyonu ve HBE'lerin hazırlanması
- Tüm ekstraktların önemli patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi
- Antimikrobiyal etkinlik gösteren ekstraktların spektrofotometrik yöntemler kullanılarak antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi (fenolik ve flavonoid madde miktar tayini ve DPPH radikal giderme aktivitesi)
- Etkin ekstraktların seçilmesi, kolon kanseri ve karaciğer kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi
- En etkin ekstraktın metabolit içeriklerinin kromatografik yöntemlerle belirlenmesi
- En etkin ekstraktı üreten LAB izolatlarının tanımlanması

**Uzun dönemli hedefler:**

- Trüf mantarına değer katan metabolitlerin ve mikrobiyota üyelerinin belirlenmesi neticesinde ülkemiz trüf türünün özgünlüğünün ortaya çıkarılması
- Yerel kültürel kimlikte var olan trüf türünün ve trüf mantarı ve rizosfer örneklerinden izole edilen LAB izolatlarının gıda ve sağlık alanında değerlendirmek üzere kültür koleksiyonlarına dahil edilmesi
- Etkin maddelerin terapötik özelliklerinin geliştirilmesi
- Dış pazarda trüf mantarının ekonomik değerini artıracak veri sağlanması
- Terapötik özellik sergilemek üzere yerel ve doğal hammadde kaynağı olarak kullanılabilmesi
- Etkin molekülün keşfi neticesinde “küçük (small) molekül” olarak tasarlanması ve ekonomik olarak üretilerek tıp alanında kullanılması

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 Trüf Mantarı Hakkında Genel Bilgi

#### 2.1.1 Trüf Mantarının Önemi

Türkiye ormanlarındaki biyolojik çeşitlilik; defne, ıhlamur, kekik, adaçayı, mantar gibi odun dışı ürünler olarak bilinen ürünlerin varoluşuna imkan vermektedir. Ülkemiz ormancılık sektöründe yer alan odun dışı orman ürünleri ile, hem yerel ekonominin hammadde ihtiyacının karşılanması hem de hammadde ve mamul madde olarak ihracatının yapılması mümkün olmakta ve elde edilen çıktılar ülke ekonomisine önemli katkılar sağlanmaktadır (Çevre ve Orman Bakanlığı, Türkiye Ulusal Ormancılık Programı, 2004). Sosyo-ekonomik açıdan değerlendirildiğinde ise dünya nüfusunun sağlık ve gıda ihtiyaçlarının büyük bir kısmının bu ürünler ile karşılanması dikkat çekmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre, çeşitli amaçlarla kullanılan 20.000 odun dışı ürünün 4.000'e yakını ilaç olarak yaygın bir şekilde kullanılırken, yaklaşık %10'unun da ticareti yapılmaktadır (Kurt vd., 2016). Orman Genel Müdürlüğü Stratejik Planı 2019-2023 hedefleri kapsamında, trüf mantarının da yer aldığı odun dışı orman ürün kullanımının iyileştirilmesi neticesinde üretilen ve pazarlanan ürünlerden köylülerin elde edecekleri gelirin en az %25 olması hedeflenmektedir. Bununla birlikte, odun dışı orman ürünlerinin sürdürülebilir gelişimini sağlamak amacıyla, kaynağın mevcut durumunun iyileştirilmesi ve en potansiyel olan odun dışı orman ürünlerinin belirlenerek işleme, pazarlama ve ihracatının yapılması öngörülmektedir (Dünya Bankası Türkiye Ormancılık Politika Belgesi, 2017). Bu kapsamda Orman Genel Müdürlüğü, orman alanlarındaki biyolojik çeşitliliğini korumak ve öneminin giderek arttığı odun dışı ürünlerin sürdürülebilir üretimini sağlamak için gerekli çalışmaları yıllardır devam ettirmektedir. Bu bilgiler ışığında, ülkemizde var olan odun dışı orman ürünlerinin gıda ve sağlık açısından potansiyellerinin belirlenmesi ve katma değeri yüksek ürünler elde edilmesi önemli hedefler arasında öncelikli sıralarda yerini almaktadır. Bu hedefler kapsamında, ülkemiz için yüksek kırsal kalkınma aracı olan, ortakçısı olan bitkiye yarar sağlayan ve ülke ekonomisine de önemli katkı potansiyeli olan trüf mantarı önemli bir stratejik yere sahiptir. Bu önemi dolayısıyla "Trüf Ormanı Eylem Planı 2014-2018; Trüf Ormanı Eylem Planı 2022-2026" oluşturulmuştur. Trüf Ormanı Eylem Planları kapsamında; doğal trüf mantarı türleri tespit edilmeye, doğal trüf alanları koruma altına

alınmaya ve trüf ormanları oluşturulmaya başlanmıştır. Hayata geçirilen bu eylem planları sayesinde, doğada var olan trüf ormanlarının varlığı tespit edilmiş, yüksek ticari önemi olan trüf mantarı gen kaynağını korumaya yönelik trüf bahçeleri oluşturulmuş ve ticari öneminin yanı sıra akademik çalışmaların artışına yönelik teşvikler oluşturulmuştur.

### 2.1.2 Trüf Mantarı Türleri

*Tuber* cinsine ait hipojen bir mantar grubu olan ve 5 ile 10 cm derinlikte büyüyen trüf, besin değeri ve sağlık üzerine olan faydalı etkileri nedeniyle dünya çapında oldukça yaygın bir kullanım alanına sahiptir (Chen vd., 2019; Lee vd., 2020; Wu vd., 2021). Dünya genelinde yüzden fazla farklı türde trüf mantar türü bilinmekte ve sürekli olarak yeni türler keşfedilmektedir. Taksonomik olarak yenilebilir trüf mantar türleri ise Tuberaceae ve Pezizaceae familyalarına aittir (Lee vd., 2020). Trüf mantarı yumuşak ve kırılgan mantarlara kıyasla sert, yoğun ve odunsu olma eğilimindedir. Beyaz trüf, *Tuber magnatum*, *Tuber borchii*, *Tuber maculatum*, *Tuber oregonense*, *Tuber latissporum*, *Tuber japonicum* ve *Tirmania nivea* türlerini içermektedir. Siyah trüf ise *Tuber melanosporum*, *T. aestivum*, *Tuber indicum*, *Tuber himalayense* ve *Terfezia clavayi* türlerini kapsamaktadır (Wang ve Marcone, 2011). Trüf mantarı ile ilgili tür bilgilerini ortaya koyacak çalışmalar son yıllarda artarak devam etmektedir. Ülkemizde ticari öneme sahip olan türler ise; *T. borchii*, *T. aestivum* (sinonim *T. uncinatum*), *Tuber brumale*, *T. melanosporum*, *Tuber macrosporum*, *Tuber mesentericum* türleri olarak belirtilmektedir. Bu türler arasında trüf kültivasyonu yapılarak bahçesi oluşturulan tür *T. aestivum* (Solak, 2007), doğal yayılış gösteren tür ise *T. borchii* (Kaya, 2009) olarak rapor edilmektedir.

Trüf mantarı, simbiyotik kök ilişkisine sahip ektomikorizal bir mantar türüdür. Mikoriza, bitki kökleri ile toprak mantarları arasındaki mutualistik (ortak) yaşam durumunu tanımlamaktadır. Ektomikoriza ise, tarım ve ormancılıkta kritik rol oynayan mikoriza türünü ifade etmektedir (Kibar ve Pekşen, 2007). Yaşam döngüsü henüz tam olarak aydınlatılamamış olsa da ev sahibi bitkinin kök sistemi ve rizosfer tabaka ile yapılar oluşturma yeteneğinden dolayı ektomikorizanın yaygın olduğu bilinmektedir (Daba vd., 2019). Karmaşık yaşam döngüsünde miselyum ağırlıklı olarak meşe, kavak, okaliptüs gibi angiosperm ve çam gibi gymnosperm olmak üzere çeşitli ağaçların kökleriyle konakçı organizmalarla simbiyotik bir etkileşim kurmaktadır (Wang ve Marcone, 2011).

### 2.1.3 Trüf Mantarı Makro Bileşenleri

Trüf mantarları, karmaşık kimyasal bileşimlere sahip olup aromatik özelliklerinden dolayı mutfak uygulamalarında oldukça değerli kabul edilmektedir. Benzersiz aromalarının yanı sıra, besinsel değeri yüksek ve önemli olan bileşikler de bulundurmaktadır. Trüf mantarlarının içeriğinde önemli miktarda bulunan suyun yanı sıra, glukoz ve fruktoz gibi basit şekerlerle temsil edilen karbonhidratları, mantarın büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan çeşitli amino asitleri içeren önemli miktarda proteinleri, yağ asitlerini, sindirim sağlığı için gerekli olan ve bağırsak sağlığını destekleyen diyet liflerini, potasyum, fosfor, kalsiyum, demir ve magnezyum gibi çeşitli mineralleri, B-kompleks vitaminleri (B1, B2, B3, B5, B6), C vitamini ve E vitamini dahil olmak üzere çeşitli vitaminleri ve antioksidan özellikleriyle bilinen flavonoidleri, fenolik bileşikler içerdiği belirtilmektedir (Lee vd., 2020). Kesin içerikleri farklı türler arasında değişkenlik sergilese de, literatürde bulunan mevcut çalışmalar trüf mantarlarının C vitamini, likopen, gallik asit gibi antioksidanlar içerdiğini göstermektedir (Yan vd., 2017). *T. pseudohimalayense*'den elde edilen metanol ekstraktının, yüksek radikal temizleme aktivitesine sahip olduğu ve yüksek toplam fenol içeriğine (735.01 mg/100 g dw) sahip olduğu rapor edilmektedir. *T. subglobosum* ise yüksek flavonoid içeriği (1355,43 mg/100 g ka) ile dikkat çekmektedir. Elde edilen veriler, trüf mantar ekstraktlarının oksidatif hasara bağlı oluşan hastalıkları önlemek için “potansiyel antioksidan kaynaklar” olarak kullanılabileceğine işaret etmektedir (Yan vd., 2017). Siyah yaz mantarı (*T. aestivum* Vittad.) ile beyaz (*T. magnatum* Pico) mantarın fenolik profil, antioksidan, anti-inflamatuar ve sitotoksik aktivite açısından analiz edildiği farklı bir çalışmada ise maserasyon ve Soxhlet ekstraksiyonuyla elde edilen metanol ve su ekstraktlarında 4-hidroksibenzoik asit, baicalein, kaempferol epikateşin ve kateşinin en baskın antioksidan bileşikler olduğu rapor edilmektedir (Beara vd., 2014).

Trüf mantarlarının bileşenleri türden türe ve bölgeden bölgeye değişmesine rağmen, en yoğun besin içerikleri arasında genellikle karbonhidratlar ve proteinler yer almaktadır (El Enshasy vd., 2013). *T. magnatum*, *T. melanosporum*, çöl ve Çin trüflerinde ise oleik asit ve linoleik asit gibi doymamış yağ asitlerinin de önemli miktarlarda bulunduğu ve bunların toplam yağ asit içeriklerinin %60'ından fazlasını oluşturduğu bildirilmektedir (Angelini vd., 2015; Yan vd., 2017). Bunlara ilaveten, önemli miktar ve çeşitlilikte mineral de içermektedir. Özellikle potasyum, magnezyum, kalsiyum ve fosfor

gibi başlıca mineraller Avrupa ve çöl trüflerinde bol miktarda bulunmaktadır (Kıvrak, 2015; Hamza vd., 2016b; Vahdani vd., 2017). Çeşitli amino asitlerin önemli bir kaynağı olarak da dikkat çeken trüf mantarları, diğer bitki kökenli gıdaların aksine kükürt içerikli amino asitler (sistein ve metionin) açısından da zengin bir içerik sergilemektedir (Sawaya vd., 1985). Ayrıca, gerçekleştirilen bazı çalışmalar *T. pinoyi*'nin siyanür, oksalat, civa, arsenik ve kadmiyum gibi riskli bileşikler (besinlerde bulunan ve vücuttaki besinlerin emilimini veya kullanımını etkileyebilen) ya hiç içermediğini ya da oldukça düşük seviyelerde içerdiğini rapor etmektedir (Bouatia vd., 2018). Bu açıdan trüf mantarları, güvenli bir potansiyel besin kaynağı olarak tüketilebilir.

Trüf mantarları her ne kadar değerli bir protein kaynağı olarak kabul edilse de yüksek fiyatları nedeniyle lüks bir tüketim malzemesi olarak değerlendirilmektedir. Dolayısıyla, tüketici tarafından günlük diyetler için tercih sebebi olamamaktadır (Wang ve Marcone, 2011). Bu noktada, trüf mantarının oldukça küçük miktarlarda bile yoğun bir aroma ve lezzet sunabilme özelliğine vurgu yapmak önemli olmaktadır. Bu özellikleri ile trüf mantarı genellikle tıraşlanmış veya yemeklerin üzerine kıyılmış olarak idareli olarak kullanılmaktadır.

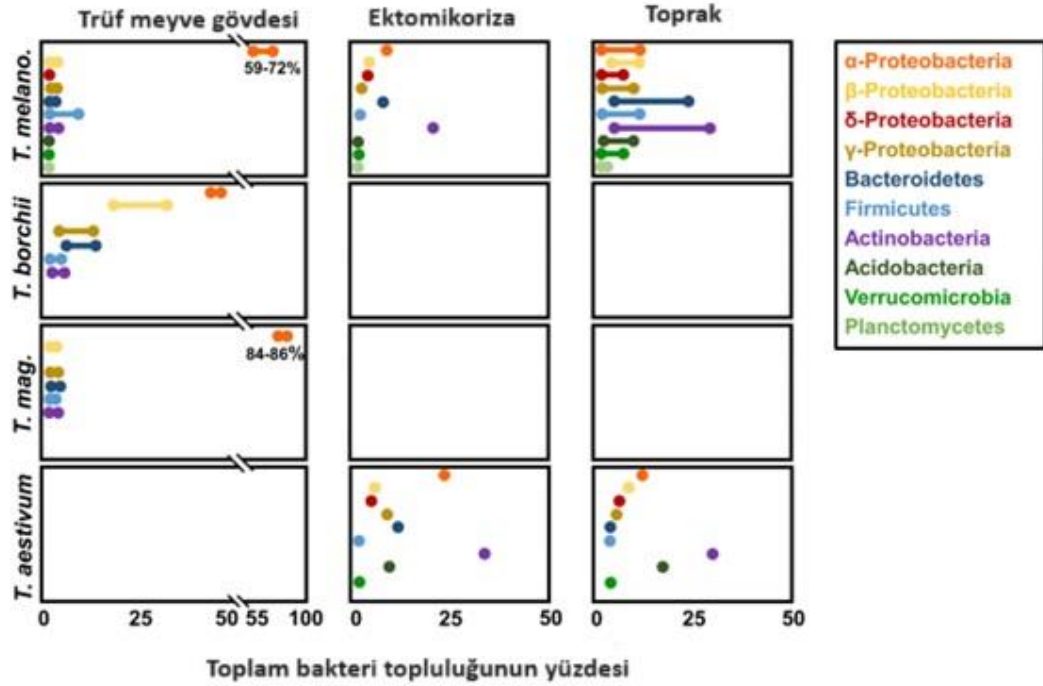
#### **2.1.4 Trüf Mantarı ve Rizosfer Mikrobiyotası**

Doğal ekosistemlerde yetişen bitkiler; virüs benzeri parçacıklar, bakteriler, mantarlar ve omisitler gibi birçok mikroorganizma ile yakın ilişki içinde yaşarlar, bu mikroorganizmaların hepsine bir arada mikrobiyota denmektedir. Bu mikroorganizmalardan bazıları bitki büyümesini teşvik ederken, diğerleri ortak yaşayanlar veya patojenlerdir, ancak insan mikrobiyotasında olduğu gibi aralarında denge sağlanması bitki sağlığını garanti etmek için hayati bir öneme sahiptir. Bitkilerin mikrobiyotaları ile arasındaki etkileşimi, bitkilerin bu mikroorganizmalara nasıl tepki verdiği, mikrobiyotanın yapısı, çeşitlilik, rizosferde ve bitki organlarındaki işlevini belirleyen ana faktörlerin kimliği hakkında temel soruları gündeme getirmiştir (Chialva vd., 2022).

İlk kez 1904 yılında Lorenz Hiltner tarafından kullanılan rizosfer kelimesi, canlı köklerle doğrudan ve anında etkileşime giren toprak hacmini tanımlamaktadır. Rizosfer tabakası toprak, bitki, virüs, böcek, nematod, protozoa, alg, arke, bakteri ve mantarların etkileşime girdiği çok dinamik ve heterojen bir ortamdır. Bitki biyolojik aktif maddelerine ilaveten birçok mikrobiyal popülasyon için ayrıcalıklı bir yaşam alanı yaratmanın yanı

sıra besleyici maddeler de (eksüdalar) salmaktadır. Rizosferde yer alan mikroorganizmalar bitkinin beslenmesini ve sağlığını iyileştirmede, kirlenen ve insan faaliyetleri tarafından bozulmuş ortamların biyolojik olarak iyileştirilmesi veya ekosistem çeşitliliği açısından rehabilitasyonu için faydalı olabilmektedir. Kökleri çevreleyen toprakta çoğunlukla bakteri ve mantar olmak üzere mikroorganizmaların çoğalması, rizosfer etkisi olarak adlandırılan etkiye hayat vermektedir (Hiltner, 1904). Bu şekilde bitkiler çevrelerini değiştirebilmekte, çevredeki toprağı dönüştürebilmekte ve büyümeleri için uygun bir habitatı sürdürebilmektedir (Jones vd., 2004). Rizosferik örneklerin bakteri izolasyonu için özgülüğü hem bitki ve mantar hem de toprak ile doğrudan temasından kaynaklanmaktadır. Buradaki bakteri topluluğunun bitki patojenik bakterileri ve mantarlarla birlikte evrimleştiği belirtilmektedir (Fhoula vd., 2013).

Trüf mantarı yaşam döngüsü boyunca (sporlar, miselyum, ektomikorizalar, askokarplar), mantar miselleri, toprak ve bakteri toplulukları ile yakın temas halinde olmaktadır (Benucci ve Bonito, 2016). Trüf mantarı mikrobiyotası üzerine yapılan son araştırmalar bakteri, mantar ve mayaların; rizosfer tabakasında ve trüf meyve veren gövdelerinde bol miktarda bulunduğunu ve aromatik uçucu bileşiklerin üretimi yoluyla trüf mantarlarının farklı aromasına katkı sağladığını göstermektedir (Barbieri vd., 2005; Buzzini vd., 2005; Pacioni vd., 2007; Quandt vd., 2015). Ayrıca, trüf mantarında bulunan bakterilerin ektomikorizal simbiyoz (ortak yaşam) oluşumunu destekleyebildiği belirtilmektedir (Frey-Klett vd., 1997; Frey-Klett vd., 2005; Aspray vd., 2006). Bazı bakterilerin ise saprobik (cansız veya çürük organik malzemeleri kullanarak beslenen) veya patojenik (hastalıklara yol açma potansiyeli olan) mantarların meyve gövdesi oluşumunu etkilediği de bilinmektedir. *T. magnatum* ile ilişkili bakteri topluluklarının çeşitliliği kültürden bağımsız ve bağımlı 16S rRNA gen tabanlı yaklaşımları kullanarak araştırılmıştır (Vahdatzadeh vd., 2015). Bu çalışma ile trüf mantarı ve rizosfer tabakasında  $\alpha$ -Proteobacteria (%85.8),  $\beta$ -Proteobacteria (%1.5),  $\gamma$ -Proteobacteria (%1.9), Bacteroidetes (%2.1), Firmicutes (%2.4) gibi bakteri topluluklarının baskın bileşenler olduğu doğrulanmıştır (Barbieri vd., 2007). Yine Herrero de Aza ve arkadaşları (2022) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, *T. melanosporum* meşe plantasyonlarında ektomikoriza ile ilişkili mantar ve bakteri topluluklarının kompozisyonu araştırılmış ve Proteobacteria (tür zenginliğinin %40'ı), Actinobacteria (%23), Bacteroidetes (%11) ve Firmicutes (%9) en temsili gruplar olarak rapor edilmiştir (Şekil 1).



**Şekil 1.** Mantar gövdelerinde, ektomikorizalarında ve toprakta bulunan bakteriyel topluluklar (Çubuklar literatürde rapor edilen minimum ve maksimum değerleri temsil ederken, noktalar tek bir literatür değerini göstermektedir. Literatür verisi bulunmayan bölümler boş bırakılmıştır) (Vahdatzadeh vd., 2015)

## 2.2 Laktik Asit Bakterileri

Firmicutes şubesinin üyeleri olarak bilinen laktik asit bakterileri (LAB), son ana ürün olarak laktik asit üreten ve genellikle güvenli organizmalar olarak kabul edilen, spor oluşturmeyen, katalaz negatif ve Gram pozitif, kok veya çubuk şeklindeki bakteri grubu olarak tanımlanmaktadır (Konings vd., 2000). LAB suşları, fermente gıdaların doğal mikrobiyotasının yanı sıra insanlar da dahil olmak üzere çeşitli canlı konak mikrobiyotasının önemli bir parçasını oluşturmaktadır (Oppegard vd., 2007). LAB'lar, sitokromları ve porfirinleri sentezleyemedikleri için oksijensiz koşullarda adenozin trifosfat (ATP) üretememekte ve genellikle şekerlerin fermantasyonu ile enerji elde etmektedir. Bu durum, anaerobik koşullarda gelişimlerini teşvik ederken, bazı türler oksijen varlığında da gelişebilmektedir. Oksijenin yan ürünlerinden korunmalarını sağlayan peroksidazlara sahip olan LAB'lar, aerotolerant anaeroblar olarak da bilinmektedir (Pessione, 2012). Bu bakterilerin temelde iki farklı şeker fermantasyon

yolağı bulunmaktadır. Glikoliz yolağında, standart koşullar altında laktik asit oluşumu hakim olup, bu metabolik yol homolaktik fermantasyon olarak adlandırılmaktadır. Diğer bir yol olan 6-fosfoglukonat/fosfoketolaz yolunda ise laktik asit üretiminin yanı sıra etanol, asetat ve CO<sub>2</sub> gibi farklı son ürünler meydana gelmektedir. Bu metabolik yol ise heterolaktik fermantasyon olarak adlandırılmaktadır (Kang vd., 2013). LAB suşları, fermantasyon süreçlerinde karbonhidratları laktik aside dönüştürmenin yanı sıra organik asitler, diasetil, asetoin, polioller, hidrojen peroksit, mantar önleyici ve antibakteriyel peptitler gibi diğer biyolojik olarak aktif bileşikleri üretmektedir (Egan vd., 2016). LAB'ların büyük çoğunluğu, ABD Gıda ve İlaç Dairesi'ne (FDA) göre "Genel Olarak Güvenli Olarak Tanınan" (GRAS) statüsüne sahiptir. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) ise *Carnobacterium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* ve eski cinsler de dahil olmak üzere birçok LAB cinslerine "Nitelikli Güvenlik Tahmini" (QPS) statüsü vermektedir (Panel, 2020; Zheng vd., 2020). Bazı LAB türleri ise konak üzerinde sağlık açısından potansiyel etkiler sergilemeleri dolayısıyla probiyotik olarak tanımlanmaktadır (Skjermo ve Vadstein, 1999; Fernandez vd., 2003).

Probiyotikler, FAO/WHO tarafından "yeterli miktarlarda tüketildiğinde konakçıya sağlık açısından yararlı etkiler sağlayan canlı mikroorganizmalar" olarak tanımlanmaktadır (FAO/WHO, 2002). Probiyotik suşların konak üzerindeki etki mekanizması çok yönlü ve karmaşıktır. Özellikle laktik ve asetik asit başta olmak üzere ürettikleri organik asitler, bakteriyosinler ve hidrojen peroksit gibi diğer antimikrobiyal metabolitler patojenlerin gelişimini engellemekte ve ortamın pH değerini patojen bakteriler için öldürücü bir düzeye düşürmektedir (Commane vd., 2005; Fayol-Messaoudi vd., 2005; Daşkiran vd., 2012; He vd., 2019). Ayrıca probiyotikler, bağırsak epiteline yapışma yeteneği göstererek patojenik bakterilerin iletişim süreçlerine müdahale edebilmektedir (Medellin-Pena vd., 2007; Mookiah vd., 2014). Probiyotiklerin kullanımıyla desteklenen gastrointestinal sistemdeki (GIT) bakteri popülasyonunun bileşimi, besinlerin daha verimli sindirimini ve emilimini etkilemekte ve bağışıklığı desteklemektedir (Niba vd., 2009; Hung vd., 2012; Barba-Vidal vd., 2019; Xin vd., 2020). Bununla beraber, LAB suşları sahip oldukları fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri ile de (aromatik bileşik, ekzopolisakkarit, antimikrobiyal madde ve organik asit üretimi, düşük su aktivitesine tolerans gibi) (Giraffa, 1994; Mataragas vd., 2003); biyokoruyucu veya tekno-koruyucu olarak farklı endüstriyel uygulamalarda da

kullanılmaktadır (Bizzarro vd., 2000; Cirlincione vd., 2021). Endüstriyel açıdan büyük öneme sahip olan LAB suşları en etkili probiyotikler olarak kabul edilmektedir (Marchwinska ve Gwiazdowska, 2022).

### **2.2.1 Trüf Mantarı Kaynaklı Laktik Asit Bakterileri**

Literatürde araştırma konusu olan ve çeşitli kaynaklardan izole edilen LAB suşları olmasına rağmen rizosferik örneklerden LAB izolasyonunu bildiren veriler oldukça sınırlıdır. Bununla birlikte, bitki ve toprak arasındaki doğrudan temas, özellikle ilgili bakterilerin bitki patojenik bakterileri ve mantarlarla birlikte evrimleşmesi göz önüne alındığında, rizosferik örneklerin bakteri izolasyonu için oldukça özgül olduğu kabul edilmektedir (Cirlincione vd., 2021). Trüf mantarı ve trüf mantarı ektomikorizaları, bakteri, maya ve filamentli mantarlar da dahil olmak üzere farklı bir mikrobiyal topluluğu barındırmaktadır (Barbieri vd., 2005; Buzzini vd., 2005; Barbieri vd., 2007; Pacioni vd., 2007). Trüf mikrobiyotası üzerine yapılan son araştırmalar, bakterilerin trüf meyve veren bölümlerinde bol miktarda bulunduğunu ve aromatik uçucu bileşiklerin üretimi yoluyla trüf mantarlarının belirgin aromasına dahil olduğunu göstermektedir. Bu bakteriler aynı zamanda trüf mantarının saklanması ve korunmasına da katkıda bulunmaktadır (Amin vd., 2009).

Trüf mantar mikrobiyotasından izole edilen ve özellikle de *Lactobacillus* cinsine dahil olan LAB suşlarının varlığı bilinmektedir. Trüflerden izole edilen LAB suşlarını içeren çalışmalar her ne kadar sınırlı olsa da elde edilen veriler bu ortamlarda bulunan belirli *Lactobacillus* suşlarının benzersiz özelliklere sahip olduğuna işaret etmektedir. Bu bakteriler, trüflerin fermentasyonunda veya korunmasında potansiyel katkı sağlayabilmekte, lezzetlerini artırabilmekte ve gıda üretim süreçlerinde kullanıldıklarında probiyotik faydalar sağlayabilmektedir.

Trüflerden veya diğer doğal kaynaklardan elde edilen LAB'ların gıda üretimine dahil edilmesi, özellikle çeşitli gıda ürünlerinin fermentasyonuna, lezzet geliştirilmesine ve gıdaların korunmasına yönelik potansiyel kullanımları oldukça önemli kabul edilmektedir. Bununla birlikte, probiyotik özellikler sergiledikleri taktirde sağlık açısından da kullanım potansiyelleri bulunmaktadır. Ancak, trüf mikrobiyotasından izole edilen belirli suşların ve bunların gıda üretiminde ve sağlık alanında kullanımının detaylı olarak araştırılması gerekmektedir.

## 2.3 Gıda ve İnsan Kaynaklı Önemli Patojenler

### 2.3.1 *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes*; Gram pozitif bir bakteri olup fakültatif anaerobiktir. Hücreleri kısa, yuvarlak uçlu çubuk veya kokobasil morfoloji sergilemekte ve genellikle 0.5-2.0 µm uzunluğunda ve 0.4-0.5 µm eninde olmaktadır. Optimum gelişme sıcaklığı genellikle 35-37 °C arasında olmak birlikte genellikle 1-45°C gibi geniş bir sıcaklık aralığında gelişebildikleri belirtilmektedir (Meloni, 2014). Peritrik flagellaları sayesinde 20-25 °C’de 24 saatlik kültürlerde aktif hareket göstermekte iken, 37 °C’de hareketi daha az belirgin olmaktadır (Shen ve Higgins, 2006). Halotoleransları sayesinde yüksek NaCl konsantrasyonlarında (%10-12) çoğalabilmektedir.

Minimum su aktivitesi (aw) 0.92 olarak belirtilmektedir (Saleh vd., 2012). Geniş bir pH aralığında (4.1-9.6) çoğalabilirken, optimum çoğalma değerlerinin genellikle 6.0-8.0 pH arasında olduğu rapor edilmektedir. Bu bakteri, Metil Red, Voges-Proskauer ve katalaz testlerinde pozitif sonuç verirken, indol, oksidaz ve üre testlerinde negatif sonuçlar göstermektedir. Karbonhidratlardan asit üretebilmekte, ancak gaz oluşturmamaktadır (Müller, 1988). Ayrıca, hemolitik özellik sergileyerek kanlı agar ortamında β-hemoliz sonuç vermektedir (Lee vd., 2007). ATCC 13932 gibi referans suşları, laboratuvar çalışmalarında kullanılarak bakterinin özellikleri, davranışları veya duyarlılıkları üzerine yapılan araştırmalarda standart bir referans noktası kabul edilmektedir (Capita vd., 2019).

*L. monocytogenes*, özellikle çiğ veya az pişmiş gıdalardan kaynaklanabilen gıda kaynaklı enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Çiğ et, deniz ürünleri, süt ve süt ürünleri gibi çeşitli gıdalarda bulunabilen bu patojen, özellikle buzdolabı sıcaklıklarında çoğalabilmesi nedeniyle soğutulmuş ve tüketilmeye hazır gıdalar için önemli bir tehdit oluşturmaktadır (Shamloo vd., 2019). *Listeria* enfeksiyonları genellikle ateş, kas ağrıları, mide bulantısı ve ishal gibi semptomlarla başlamaktadır. Genellikle bağışıklık sistemi zayıf olan bireylerde veya hamile kadınlarda, daha ciddi sonuçlar doğurabilmekte hatta fetüs üzerinde olumsuz etkilere sebep olabilmektedir (Schlech, 2019). Gebelik dışı yetişkinlerde genellikle sepsisemi, menenjit ve meningoensefalite neden olmakta ve ölüm oranı %20 ile %25 arasında rapor edilmektedir (Vazquez-Boland vd., 2001).

### 2.3.2 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus*; kok formunda, spor oluşturmayan, Gram pozitif, hareketsiz, mezofilik, biyofilm oluşturan ve enterotoksin üreten fakültatif anaerob bir bakteridir (Kroning vd., 2016). *S. aureus* suşları, burun deliklerinin derisine ve mukozasına etkili bir şekilde tutunarak kolonize olabilmekte, kan dolaşımını istila edebilmekte, konakçının immünolojik tepkilerinden kaçınabilecek koruyucu biyofilmler oluşturabilmekte ve çeşitli antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilmektedir (Naber, 2009). Bu bakteri birçok insan için normal mikrobiyota üyesi olarak kabul edilmesine rağmen uygun olmayan koşullarda veya bağışıklık sistemi zayıflamış kişilerde enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Tong vd., 2015). Deri enfeksiyonları, yara enfeksiyonları, zatürre, gıda zehirlenmesi gibi durumlar *S. aureus*'un neden olduğu enfeksiyonlar arasında yer almaktadır. Ayrıca, bu bakteri bazı durumlarda antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilmektedir (Tong vd., 2015; Ondusko ve Nolt, 2018).

Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA), antibiyotik metisilin ve diğer benzilpenisilin türevlerine dirençli *S. aureus* bakterisinin bir alt türüdür. MRSA hem toplumda hem de sağlık bakım ortamlarında bakteriyemi vakalarında %30'a varan mortalite oranıyla oldukça dikkat çekmektedir (Chang vd., 2003). İlk kez 1961'de Birleşik Krallık'ta ortaya çıkan ve temel olarak tüm  $\beta$ -laktam antibiyotiklerine intrinsik (kendisinde var olan) olarak dirençli olduğu tespit edilen MRSA, folikülit ve gıda zehirlenmesinden endokardit ve nekrotizan pnömoni gibi yaşamı tehdit eden durumlara kadar geniş bir hastalık yelpazesinden sorumludur (Duckworth, 2003). MRSA'nın  $\beta$ -laktam direnci,  $\beta$ -laktam antibiyotiklere dikkate değer şekilde azalmış bağlanma özellikleri gösteren yeni bir penisilin bağlayıcı protein (PBP) olan (PBP2a) üretimi tarafından oluşmaktadır (Hartman ve Tomasz, 2018). MRSA, dünya çapında ciddi morbidite ve mortalite oranlarıyla, uluslararası enfeksiyon kontrol çabalarının ana odak noktası haline gelmektedir (Lee vd., 2018). WHO (2017) tarafından yeni antibiyotiklere acil ihtiyaç duyulan bakteriler listesinde "Öncelik sırası 1 (yüksek)" olarak listelenmektedir. Birçok çalışma, MRSA enfeksiyonunun artmış toplam hastane maliyeti, uzamış hastane kalış süresi ve daha yüksek hastane ölüm oranı ile önemli derecede ilişkilendirildiğini ortaya koymaktadır (Cosgrove vd., 2003; Nelson vd., 2015). Birçok ülkede MRSA oranı %20'nin üzerinde olup, bazı durumlarda %80'e ulaşmaktadır (Lee vd., 2018). MRSA'nın ilk bulaşması klinik ortamlarda meydana gelmesine rağmen, gıda ve gıda üreten hayvanlar da dahil

olmak üzere hastane ortamı dışındaki ortamlarda da varlığı rapor edilmektedir (Da Silva vd., 2020). *S. aureus* tarafından üretilen toksinlerle kontamine olmuş gıdaların tüketimi, kontamine gıdanın tüketilmesini takip eden 1 ile 6 saat içinde ciddi gastroenterit, bulantı, kusma, ishal ve karın ağrısına neden olabilen stafilokokal gıda zehirlenmesine yol açabilmektedir (Crago vd., 2012).

### **2.3.3 *Escherichia coli* O157:H7**

*Escherichia coli*; Gram negatif, çubuk şeklinde, fakültatif anaerobik bir bakteridir. Bu mikroorganizma ilk kez 1885 yılında Theodor Escherich tarafından tanımlanmıştır (Lim vd., 2010). *E. coli* O157:H7 suşu, çeşitli hastalıklara neden olduğu bilinen Shiga toksinini üreten bir bakteri olarak dikkat çekmektedir (Rangel vd., 2005). O157:H7 suşunun yatay gen transferi yoluyla Shiga toksinlerini ve diğer virülans faktörleri üretme yeteneği kazandığı düşünülmektedir. *E. coli* O157:H7, sağlıklı sığırların dışkıсында düzenli olarak bulunmakta ve kontamine gıda, su ve enfekte insan veya hayvanlarla doğrudan temas yoluyla insanlara bulaşmakta ve gıdadan gelen bulaşı gıda zehirlenmelerine neden olabilmektedir. Bu bakterilerin toksinleri ise sindirim sisteminde ciddi enfeksiyonlara sebebiyet verebilmektedir. Semptomlar arasında şiddetli karın ağrısı, kanlı ishal ve bazen böbrek hasarı yer alabilmektedir (Su ve Brandt, 1995). Bu tür enfeksiyonlar özellikle çocuklar, yaşlılar ve bağışıklık sistemi zayıf olan bireylerde daha ciddi olabilmektedir. Enfeksiyon; kanlı olmayan ishal, hemorajik kolit, hemolitik üremik sendrom ve ölüm dahil olmak üzere çok çeşitli klinik bulgu ile ilişkilendirilmektedir (Mead ve Griffin, 1998).

### **2.3.4 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis**

*Salmonella* cinsine ait bakteriler Gram negatif ve fakültatif anaerob olup hem insanlar hem de hayvanlar için önemli bir hücre içi patojen olarak tanımlanmaktadır. Gıda kaynaklı *Salmonella* enfeksiyonu dünya genelinde önemli bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır (Silbergleit vd., 2020). *S. enterica* subsp. *enterica* serotip Enteritidis (*S. Enteritidis*), insanlarda kontamine hayvansal gıda ürünlerinin tüketimiyle ilişkili gıda kaynaklı enfeksiyonların önde gelen nedenlerinden biri olarak rapor edilmektedir. Kümes hayvanları ürünleri ve yumurtalar genellikle bu patojen için önemli rezervuarlar olarak kabul edilmektedir (Andino ve Hanning, 2015; Hald vd., 2016). *Salmonella* enfeksiyonları genellikle ateş, karın ağrısı, ishal, bulantı ve kusma gibi semptomlarla kendini göstermektedir (Guthrie, 2018). Bununla beraber, *Salmonella* enfeksiyonunun

insanlarda kolorektal kanser riskini artırabileceğine dair endişeler de bulunmaktadır (Silbergleit vd., 2020).

### 2.3.5 *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis*; ısıya dayanıklı, hareketsiz, sporlar oluşturan, Gram pozitif, çubuk şeklinde ve genellikle toprak ortamında doğal olarak bulunan bir bakteridir (Piggot, 2009). *B. subtilis*, toprakta, bitkilerde ve çeşitli hayvanların sindirim sistemlerinde bulunabilmektedir. Subtilis grubunu oluşturan *B. licheniformis*, *B. subtilis* ve *B. pumilus*, çeşitli hastalıklara ve gıda kaynaklı gastroenterit vakalarına neden olan çeşitli insan enfeksiyonlarıyla ilişkilendirilmektedir (Salkinoja-Salonen vd. 1999; Veith vd., 2004). Özellikle bağışıklık sistemi zayıf olan kişilerde veya ağır hastalıkları olan kişilerde, *B. subtilis* enfeksiyonlarına sıklıkla rastlanmaktadır. Bu durumlarda, genellikle vücudun normal mikrobiyotasından kaynaklanan bir enfeksiyon söz konusu olabilmektedir. Bununla birlikte, *B. subtilis*'in patojenitesi diğer patojenik bakterilere kıyasla oldukça düşüktür. Özellikle; probiyotiklerde, antibiyotiklerin üretiminde, gıda fermentasyonunda ve biyoteknolojik süreçlerde *B. subtilis*'in kullanımı yaygındır. Sporlu olduğundan dolayı ekmeğin iç kısmı pişerken bu sıcaklıkta ölmezse, ekmekteki karbonhidratı kullanarak ekmeğin içinde lifli bir yapı oluştururlar. Yapılan bir çalışma, analiz edilen ekmeklerin, ekmeğin bozulmasından veya insanlarda gıda zehirlenmesinden sorumlu olabilecek *Bacillus* türlerini barındırdığını göstermiştir (Yıbar vd., 2012). Özellikle sütte çoğaldıkları zaman kazeini parçalayarak zehirli maddeler açığa çıkarırlar. Diğer besin maddelerinde üredikleri zaman toksin oluştururlar. Proteolitik aktivite analizi ile, *B. subtilis*'in süt proteinlerini, özellikle de  $\kappa$ -kazeini parçalayabildiğini, bunun da süt kazeinlerinin varlığında *Streptococcus mutans* tarafından biyofilm oluşumunu mümkün kıldığını ileri sürülmüştür. Bu nedenle bu bulgular, özellikle karmaşık mikrobiyal ortamda sütün dış için "çürüğe karşı güvenli" olduğu varsayımını çürütebilir (Duanis vd., 2020).

### 2.3.6 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas* cinsi, *Pseudomonadaceae* ailesine ait olup genellikle çubuk şeklinde ve çoğunlukla hareketli bakterilerden oluşmaktadır (Krieg vd., 1984). *P. aeruginosa* tarafından üretilen piyoverdin (eski adıyla fluorescein) ve piyosiyanin iki önemli patojenik faktör olarak tanımlanmaktadır (Cox ve Adams, 1985). *P. aeruginosa* kistik fibroz, yanık yaraları, bağışıklık yetmezliği, kronik obstrüktif akciğer hastalığı

(KOA), kanser ve COVID-19 gibi ventilasyon gerektiren ciddi enfeksiyonlar gibi durumlarda hastalara bulaşabilen Gram negatif fırsatçı bir patojen olarak tanımlanmaktadır (Del Mar Cendra ve Torrents, 2021; Rossi vd., 2021). Özellikle hastane ortamında ve bağışıklık sistemi zayıf olan bireylerde enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Çin Antimikrobiyal Gözetim Ağı (CHINET) *P. aeruginosa*'nın *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *S. aureus*'tan sonra %7,96 oran ile hastane enfeksiyon etmenleri sıralamasında dördüncü olduğunu bildirmektedir. Bu nedenle, *P. aeruginosa* insan sağlığına yönelik küresel büyük bir tehdit olmaya devam etmektedir (Qin vd., 2022).

*P. aeruginosa* ciddi solunum yolu enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları, cilt enfeksiyonları ve kan dolaşımı enfeksiyonlarına sebebiyet verebilmektedir. Ancak, *P. aeruginosa* enfeksiyonunun tedavisi, bakterinin hızlı mutasyona uğraması ve antibiyotiklere direnç kazanmaya yönelik adaptasyonu nedeniyle son derece zor olmaktadır (Diggle ve Whiteley, 2020). Biyofilm halindeki *P. aeruginosa*, hipoksik bir atmosferde veya diğer aşırı zorlu ortamlarda hayatta kalabilmektedir (Qin vd., 2022).

#### **2.4 Trüf Mantarının Gıda ve Sağlık Alanındaki Fonksiyonları**

Trüf mantarlarının eşsiz tadı, aroması ve önemli miktarda karbonhidrat, protein, vitamin ve mineral içeriği tüketici talebini ve piyasa değerini artırmaktadır (Cullere vd., 2013; Dahham vd., 2018). Trüf mantarları hem taze hem de işlenmiş ürünler olarak değerlendirilebilmektedir. Trüf yağı, baharat ya da parfümeri endüstrisinde etken madde olarak kullanılabilir (Geloğlu vd., 2014). Trüf mantarlarının besin değerleri ve eşsiz lezzetleri ile dikkat çeken özelliklerinin yanı sıra elde edilen çeşitli ekstraktlarının tıbbi özellikleri üzerine yapılan çalışmalar da son yıllarda artarak devam etmektedir. Bu çalışmalar kapsamında trüf mantar ekstraktlarının antiviral, antimikrobiyal, antikanser, antioksidan, hepatoprotektif, anti-inflamatuar ve antimutajenik aktivitelere sahip oldukları rapor edilmektedir (Wang ve Marcone, 2011; Çayan vd., 2022). Sağlık üzerine olan bu etkileri ise içeriğinde bulunan fenolik, flavonoid, vitamin ve  $\beta$ -glukan gibi biyoaktif bileşiklerin varlığına atfedilmektedir (Al-Laith, 2010; Patel, 2012; Friedman, 2015;). Bununla beraber, çeşitli yer mantarı türlerinin de ergosterol, brassicasterol (Jinming vd., 2001) ve yağ asitleri (Alirezalu vd., 2016) gibi steroller içerdiği de bildirilmektedir. Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar çeşitli trüf mantar türlerinden

elde edilen biyoaktif bileşiklere ve bunların beslenme ve tıbbi uygulamalardaki potansiyel etkilerine odaklanmaktadır (Lee vd., 2020).

Geleneksel tedavilere olan ilginin artması ve bu tedavilerle elde edilen başarılı sonuçlar, alternatif tıbbın popülerliğinde artışa sebep olmuştur (Yuan vd., 2016). Mantarlar alternatif tıbbın önemli yapı taşlarından biri olarak kabul edilmektedir. Doğal olarak yetiştirilen ve şifalı olarak nitelendirilen trüf mantarlarına olan ilginin her geçen gün artmasının temel nedenlerinden biri ise sentetik kökenli ilaçlar gibi insan vücudunda istenmeyen ve beklenmeyen yan etkilere neden olmamalarıdır (Lew vd., 2020). Mantarlardan elde edilen etken maddelerin ilaç olarak eski çağlardan beri kullanılıyor olması yan etkilerinin çok daha iyi bilinmesine olanak sağlamaktadır (Gajos vd., 2014). Yeni ve doğal alternatif ilaçlar keşfetme konusunda bilim adamlarının en çok ilgisini çeken biyoaktif özellikler arasında antikolinesteraz, antidiyabetik, antimikrobiyal, antioksidan, antitümör, antikanser, antiviral ve hipokolesterolemik aktiviteler yer almaktadır (De Silva vd., 2013). Trüf mantarı, son yıllarda nutrasötiklere yönelik gerçekleştirilen araştırmalar kapsamında antikanser ve kardiyovasküler etki, immünolojik direnç ve kan lipidlerinde azalma gibi potansiyel rolleri ile yeni nesil biyoterapötikler olarak tanıtılmaktadır (Patel ve Goyal, 2012; Çayan vd., 2022).

#### **2.4.1 Trüf Mantarının Antimikrobiyal Aktivite Özellikleri**

Patojenlere ve antibiyotik direncine karşı mücadelede yeni antimikrobiyallerin geliştirilmesi zamanımızın en önemli küresel zorluklarından biri olarak kabul edilmektedir. Trüf mantarlarının antimikrobiyal etkinliğine yönelik çok sayıda çalışma rapor edilmektedir. Çöl trüf mantarı türlerinden *Tirmania pinoyi* ve *Terfezia claveryi*'nin asitte çözünür protein ekstraktlarının ve organik ekstraktlarının *in vitro* antimikrobiyal aktivitesi, Gram pozitif insan patojenik referans suşları *S. aureus* ATCC 29213, *L. monocytogenes* ATCC 7644'e karşı araştırılmıştır. Gram negatif *P. aeruginosa* ATCC 15442 ve *E. coli* ATCC 10536 suşlarına karşı *T. pinoyi*'nin asitte çözünür protein özütü denenmiş test edilen tüm patojenlere karşı 57 ile 114 µg/mL arasında değişen minimum inhibitör konsantrasyon oranları tespit edilmiştir. Aynı çalışmada hem *T. pinoyi* hem de *T. claveryi* mantarlarının hekzan ve aseton kullanılarak elde edilen organik ekstraktları, 5 mg/mL'lik konsantrasyonda *P. aeruginosa*'nın gelişimini engellemiştir (Schillaci vd., 2015). Casarica ve arkadaşları (2016) tarafından yürütülen başka bir çalışmada ise *T. claveryi*'den su kullanılarak elde edilen ekstrakt, *E. coli*, *Staphylococcus epidermidis* ve

*S. aureus*'a karşı antimikrobiyal özellik sergilemiş ve sonuç olarak bu üç bakteri türünün neden olduğu göz enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanımları önerilmiştir. Tunus kurak bölgesinde yayılım gösteren bir başka çöl trüfö olan *Tirmania nivea*'da, *S. Typhimurium*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermis* ve *B. subtilis* dahil olmak üzere üç Gram pozitif bakteri ve dört Gram negatif bakteri türüne karşı dikkat çekici bir inhibitör aktivite sergilemiştir (Hamza vd., 2016a). Dib-Bellahouel ve Fortas (2011), *B. subtilis* ve *S. aureus*'un gelişiminin, antimikrobiyal aktif bileşikler olarak pirazinler ve türevlerini içeren *T. pinoyi*'nin etil asetat ekstraktı tarafından inhibe edildiğini rapor etmişlerdir. Diğer bir çalışmada ise *Terfezia clavaryi* sulu ekstraktından elde edilen kısmen saflaştırılmış proteinlerin antimikrobiyal aktivitesi *S. aureus*'a karşı test edilmiş ve %5'lik sulu ekstraktın *S. aureus*'un gelişimini %66,4 oranında inhibe ettiği metanol ekstraktın ise etkisiz olduğu tespit edilmiştir (Janakat vd., 2004). Ancak, tüm bu bulguların klinik uygulamalara dönüşmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bilim dünyası, trüf mantarlarının antimikrobiyal özelliklerini daha iyi anlamak ve potansiyel tıbbi kullanımını araştırmak için çalışmalarını sürdürmektedir.

#### **2.4.2 Trüf Mantarının Antioksidan Aktivite Özellikleri**

Trüf mantarının antioksidan ve radikal yakalama aktiviteleri birçok çalışmada rapor edilmiştir (Hamza vd., 2016b; Al Obaydi vd., 2020). Oksidasyon, normal fizyolojik aktiviteleri desteklemek ve enerji üretimi için hemen hemen tüm organizmalarda önemli kabul edilmektedir (Al-Laith, 2010). Ancak bazı durumlarda insan vücudundaki kontrolsüz metabolik süreç başta reaktif oksijen türleri (ROS) olmak üzere serbest radikaller üretebilmesine ve sonrasında da lipitler, DNA, karbonhidratlar ve proteinler gibi biyolojik moleküllerin ROS tarafından oksitlenerek bu moleküllerin zarar görmesine neden olabilmektedir. Buna karşılık, antioksidan maddeler ROS için indirgeyici ajanlar olarak görev yapmakta ve bu olumsuz durumu engelleyebilmektedir (Dubost vd., 2007). *T. indicum* mantarı fenolikler, flavonoidler (Li vd., 2019), steroidler (Jinming vd., 2001), polisakaritler ve tuberosid (Qing vd., 2015) gibi çeşitli biyoaktif moleküller içermektedir. Bu ikincil metabolitler, indirgeyici ajanlar olarak hareket ederek çeşitli biyolojik serbest radikalleri temizleme yeteneklerinden dolayı antioksidanlar olarak kabul edilmektedir (Dubost vd., 2007). Antioksidanların kardiyovasküler hastalık, kanser, diyabet, siroz ve diğer yaşlanma ile ilgili hastalıklarda oksidatif stresi azaltarak oksidatif hasarı önlediği yaygın olarak kabul edilmektedir (Kris-Etherton vd., 2002; Adebayo vd., 2012).

Antioksidan aktivitenin belirlenmesi için ABTS radikal katyon yakalama deneyi, DPPH serbest radikal yakalama deneyi ve demiri indirgeyen antioksidan güç deneyi gibi çeşitli testler kullanılmaktadır. *Tuber* trüflerinden izole edilen polisakkaritler yüksek antioksidan ve antitümör aktivite sergilemiştir (Attia vd., 2018). Guan ve arkadaşlarının (2022) yapmış oldukları çalışmada kullanılan polisakkaritler, mikrodalga destekli sıcak su kullanılarak *T. aestivum* ve *T. melanosporum*'dan elde edilmiş ve iki polisakkarit bileşeninin antioksidan aktivitesi değerlendirilmiştir. Polisakkaritlerin, porcine jejunal epitel (IPEC-J2) hücrelerini H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oluşturulan oksidatif hasardan koruyabildiği belirtilmiştir. Karşılaştırma yapıldığında *T. aestivum* polisakkaritinin daha güçlü bir antioksidan etki sergilediği, özellikle *T. aestivum* polisakkaritinin IPEC-J2 hücrelerinde hücre içi antioksidan enzimlerin (süperoksit dismutaz ve katalaz) salgı seviyesini artırabildiği ve hücrelerin toplam antioksidan kapasitesi üzerinde önemli bir etkisi olduğu rapor edilmiştir. Bir başka çalışmada, siyah (*T. aestivum* Vittad.) ve beyaz (*T. magnatum* Pico) trüf mantarları; fenolik profil, antioksidan, anti-inflamatuar ve sitotoksik aktivite açısından incelenmiştir. Ekstraktlardaki 45 fenolik içeriği LC-MS/MS kullanılarak araştırılmış ve 14 bileşik tespit edilmiştir. Bunlar arasında *T. aestivum*'da en yoğun bulunan fenolik içerik 4-hidroksibenzoik asit, baicalein ve kaempferol iken *T. magnatum* için ise epikateşin ve kateşin olarak belirtilmiştir. DPPH radikali üzerindeki temizleme etkisi, süperoksit anyonunu ve nitrik oksit radikalini nötralize etme yeteneği, lipid peroksidasyonunu engelleme potansiyeli ve ekstraktların azaltma gücü (FRAP tahlili) belirlenmiş her iki tür tarafından ifade edilen orta derecede bir antioksidan aktivitenin yanı sıra, yalnızca *T. magnatum* bir miktar anti-inflamatuar aktivite sergilediği rapor edilmiştir (Beara vd., 2014).

#### 2.4.3 Trüf Mantarının Antikanser Aktivite Özellikleri

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre yaklaşık olarak 14,1 milyon yeni kanser vakası rapor edilmektedir. Önümüzdeki yirmi yıl içerisinde bu rakamın 22 milyona çıkması beklenmektedir. Güncel istatistiksel veriler, kanser kaynaklı ölümlerin %70'inin düşük ve orta gelirli ülkelerde meydana geldiğini göstermektedir (Dünya Sağlık Örgütü, 2022). Tüm bu veriler, kanserin dünya genelinde önemli bir sağlık sorunu olduğunu vurgulamaktadır (Richardson vd., 2015). Diyet, kanserin oluşumu ve önlenmesi için en önemli faktörlerden biri olarak belirtilmesine rağmen aralarındaki bağlantı en az hastalığın kendisi kadar hala gizemini korumaktadır (Talib, 2017a). Araştırmalar, belirli

kanser türlerinin gelişimine katkıda bulunabilecek veya tam tersine belirli kanser türlerini önlemeye yardımcı olabilecek besin ve gıdalara işaret etmektedir (Block vd., 2015). Yüksek miktarda antioksidan ve lif içeren gıdaların tüketimi çeşitli bölgelerde kanser riskini azaltma eğilimindedir (Turati vd., 2015). Geleneksel antikanser tedavilerinin (kemoterapi ve radyasyon) kullanımı ciddi yan etkilerle ilişkilendirilmektedir (Talib ve Abukhader, 2013). Bu yan etkiler, bilim insanlarını mevcut tedavilerin etkinliğini artırmak ve toksisiteyi azaltmak için alternatif kanser tedavilerini araştırmaya teşvik etmektedir. Bu tedaviler için sıklıkla tercih edilen alternatif kaynaklar doğal ürünlerdir (Talib, 2017b). Bunlar arasında, tıbbi açıdan önemli metabolitler üreten veya biyoteknolojik yöntemler kullanılarak bu tür metabolitleri üretmeye teşvik edilebilen yenilebilir tıbbi mantarlar ilk sıralarda yer almaktadır (Wasser vd., 2004). *Picoa* cinsinde ve birçok trüf cinsinde antimitojenik ve antikanserojenik özellikler keşfedilmiştir (Stojkovic vd., 2013). Bu mantarların, bağışıklık sisteminin işlevini artırarak kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe edebileceği rapor edilmektedir (Markman ve Shiao, 2015).

Modern tıp, mantarların kanserle mücadele ve kanseri önleme için potansiyel olarak olumlu gıdalar arasında olduğuna dair artan bir kanıt olarak mantarın da yer aldığı antik süper yiyecekleri (eski uygarlıklar tarafından beslenme, tıbbi ve dini amaçlar için kullanılan gıdalar) yeniden keşfetmiştir (Patel ve Goyal, 2012). *Tuber* cinsi üzerine yapılan bir çalışmada, antitümör aktiviteyi artırma potansiyeline sahip 52 polisakkarit izole edilmiştir (Zhao vd., 2014). *Terfezia boudieri* ile ilgili önceki araştırmalar, bu trüfün flavonoidler açısından zengin ekstraktının dikkate değer bir antibakteriyel, antioksidan ve antikanserojen aktivite sergilediğini bildirmiştir (Akyüz, 2013; Hamza vd., 2016b; Al Obaydi vd., 2020). Farklı bir çalışmada ise çeşitli türlere ait trüf özlerinin farklı tümör hücrelerinin büyümesini engelleme potansiyeli değerlendirilmiştir. *Terfezia* ve *T. gennadii* ekstraktları, NCI-H460'de 19 ile 78 µg/mL arasında; HeLa'da 33 ile 206 µg/mL arasında; HepG2'de 83 ile 321 µg/mL arasında ve MCF-7'de 102 ile 321 µg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda anti-proliferatif aktivite göstermiştir. *T. aestivum*, *T. magnatum* ve *T. melanosporum* ekstraktları test edilen tüm tümör hücrelerinde 400 µg/mL üzerinde sitotoksikite sergilemiştir (Tejedor-Calvo vd., 2021). Beara ve arkadaşları (2014), maserasyon ve Soxhlet ekstraksiyonuyla elde edilen trüf mantarı metanol ve su ekstraktlarının etkinliğini araştırmışlardır. LC-MS/MS kullanılarak 45 fenolik madde analiz edilmiştir. Her iki türün de orta derecede antioksidan aktivitesi

sergilediği belirlenmiştir. Yalnızca *T. magnatum*, COX-1 ve 12-LOX yolu ürünlerinin sentezini inhibe ederek anti-inflamatuar potansiyel sergilemiştir. Metanol ekstraktları, su ekstraktlarının meme adenokarsinomuna (MCF7) karşı belirgin aktivitesinin yanı sıra bazı tümör hücre hatlarına (HeLa, MCF7, HT-29) karşı yüksek derecede sitotoksikite göstermiştir.

Literatür verileri çeşitli trüf mantar ekstraktlarının antikanser potansiyelini vurgulamakta ve bu umut verici etkiyi steroller ve polisakkaritler gibi aktif bileşenlere bağlamaktadır. Ancak, diğer ekstraktlara göre daha az çalışılmış olan trüf türlerinde içerik ve biyoaktivite arasında net bir ilişki kurabilmek adına daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

## **2.5 Laktik Asit Bakterilerinin Gıda ve Sağlık Açısından Önemi**

LAB suşları; gıda üretiminde starter kültür olarak kullanılmaları, bakteriyosin gibi antimikrobiyal madde üretmeleri ve probiyotik ürünlerde yer almaları nedeniyle endüstriyel açıdan büyük öneme sahiptir. Bu bakterilerin doğal asit toleransı, gastrik yolda yaşama yetenekleri, insan tüketimi sırasında güvenilirlik kayıtları onları genel olarak güvenilir ve probiyotik olarak kabul edilen mikroorganizmalar haline getirmektedir. Literatür çalışmaları incelendiğinde günümüze kadar pek çok kaynaktan LAB suşlarının izole edilerek tanımlandığı ve antimikrobiyal, antioksidan ve antikanserojen aktivite bakımından analiz edildiği birçok çalışmaya rastlanmaktadır. Ancak, trüf mantar mikrobiyotası kaynaklı LAB suşlarının izolasyonuna ve biyolojik aktivitelerini belirlemeye yönelik araştırmalar oldukça sınırlıdır.

Fermantasyon sürecinde LAB suşları tarafından üretilen biyolojik ve fizyolojik olarak etkin moleküller ve enzimler, ürünün temel besin değerinin ötesinde işlevselliğini ve besin değerini artırabilmektedir (Marccone vd., 2017). Bu nedenle, bu tür ürünler aynı zamanda biyo-fonksiyonel gıdalar olarak da tanınmaktadır (Linares vd., 2017). Biyo-fonksiyonel gıda kavramı, fermantasyon süreci sırasında bakteriyel metabolik aktivite sonucu üründe oluşan metabolitlerin, tüketildiğinde insan sağlığı üzerinde faydalı etkileri olduğunu belirtmektedir (biyoaktif). Ancak sağlık etkisi, fermente süt ürünündeki canlı bakterilerin tüketilmesiyle insan vücut sistemi üzerinde olabilir (probiyotik etki) (Joshi, 2016). Bu nedenle, bakterilerin tüketilmesine kadar canlı kalmamasına rağmen biyoaktif etki oluşturulur. Fermantasyon ürünlerinin geliştirilmesinde kullanılan suş ve işleme yöntemine bağlı olarak biyoaktif bileşiklerin üretimi ve çeşitliliği değişse de, hücre

bağımsız ekstraktların yani biyoaktif moleküllerin bile düşük miktarlarda dahi sağlık üzerinde önemli etkileri bulunur ve insan sağlığını koruma ve iyileştirmeye büyük katkı sağlar (Sharma vd., 2023).

### 2.5.1 Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Aktivite Özellikleri

Akademik çalışmalardan elde edilen veriler, *S. aureus*, *S. Typhimurium*, *E. coli* ve *L. monocytogenes* gibi bazı gıda kaynaklı patojenlerin gelişiminin çeşitli LAB suşları tarafından inhibe edilebildiğini göstermektedir (Jamuna ve Jeevaratnam, 2004; Darsanaki vd., 2012). Bununla beraber, mikotoksikojenik mantarların da (*Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* ve *Fusarium graminearum*) (Lavermicocca vd., 2000; Trias Mansilla vd., 2008) fitopatojenik bakterileri (*Xanthomonas campestris* ve *Erwinia carotovora* gibi) inhibe etmede etkili oldukları rapor edilmektedir (Trias Mansilla vd., 2008).

Yapılan bir çalışmada, *Lb. sakei* ve *E. faecium* gibi LAB türlerinin de içinde olduğu suşlardan oluşan koruyucu kültürler, farklı peynirlerde patojen ve bozulma yapan bakterilerin büyümesini kontrol etmek için kullanılmıştır. Koruyucu kültürlerin uygulanmasının, peynir yapım sürecinde patojenlerin, özellikle *L. monocytogenes*'in ve bozulma bakterilerinin kontrolü için önemli ve etiketli bir strateji olduğu gösterilmiştir (Bintsis ve Papademas, 2024). Todorov ve arkadaşları (2013) çalışmasında domuz ürünlerinden izole edilmiş *L. sakei* izolatları arasında önemli farklılıklar olduğunu ve seçilen izolatlar, *Enterococcus* spp., *Listeria* spp., *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. ve *Streptococcus* spp.'nin çoğalmasını engellediğini bildirmişlerdir. Onbas ve arkadaşları (2019) yapmış oldukları çalışmada sağlıklı anne sütüyle beslenen bebeğin dışkı mikrobiyotasından izole edilen umut verici bir suş olan *Lactobacillus plantarum* F-10 hücresiz ekstraktının (HBE), *P. aeruginosa* PAO1/ATCC 27853 ve metisiline dirençli *S. aureus* ATCC 43300 suşları ile bunların kronik deri yara örneklerinden izole edilen hastane kaynaklı suşlarının gelişimini engellediğini rapor etmişlerdir. Test edilen tüm patojenlerin biyofilm oluşumunda yüzde yüz azalma tespit edilmiştir. *P. aeruginosa* suşlarının virülans faktörlerinin üretiminin ise (hareketlilik, proteaz ve elastaz aktivitesi, piyosiyenin ve ramnolipit üretimi) engellendiği gözlemlenmiştir. HBE'nin DPPH radikal yakalama aktivitesi %88.57±%0.49 olarak belirlenmiş ve sonuç olarak, *L. plantarum* F-10'un antimikrobiyal, antibiyofilm ve antioksidan aktivitesi ile cilt enfeksiyonlarına karşı alternatif bir biyo-kontrol stratejisini

temsil edebileceği gösterilmiştir. Fhoula ve arkadaşları (2013), çöl trüflerinin ve zeytin ağaçları rizosfer örneklerinden toplam 119 laktik asit bakterisi izole etmiş ve farklı biyoteknolojik özellikler açısından değerlendirmişlerdir. İzolatlar *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas savastanoi* gibi bitki patojenik bakterileri ile gıda kaynaklı *S. aureus* ve *L. monocytogenes* gibi patojenlere karşı güçlü bir antibakteriyel aktivite sergilemiştir. LAB suşlarının sergilemiş oldukları antimikrobiyal aktivite ise üretmiş oldukları çeşitli biyoaktif bileşenlerle ilişkilendirilmiştir.

LAB suşları genellikle düşük moleküler ağırlıklı antimikrobiyal maddeler üretebilmektedir. Bu maddeler genellikle bakteriyosinler gibi peptidik antimikrobiyal bileşikler, organik asitler, enzimler ve diğer metabolitler olarak tanımlanmaktadır. Ürettiği antimikrobiyal bileşikler, LAB suşlarının çevrelerindeki diğer mikroorganizmalarla rekabet etmelerine ve çoğalma alanlarını korumalarına yardımcı olabilmektedir (İbrahim vd., 2021). LAB suşları tarafından üretilen bu antimikrobiyal maddelerin çeşitli etki mekanizmaları bulunmaktadır. Örneğin, laktik asit gibi organik asitler çevredeki pH'yı düşürmekte ve bu da patojen mikroorganizmalar için olumsuz bir ortam oluşturmaktadır (Narvhus ve Axelsson, 2003). Bunun yanı sıra nisin, pediosin, sakasin gibi bakteriyosinler diğer patojenlere karşı doğrudan bir antibakteriyel etki sergilemektedir. Bu etki bakteriyosinleri gıda ve sağlık endüstrisinde önemli hale getirmektedir. Özellikle gıda endüstrisinde, LAB suşlarının ürettiği bakteriyosinler gıdaların bozulmasını önlemek ve patojen mikroorganizmaların çoğalmasını engellemek için koruyucu bir rol oynamaktadır. Aynı zamanda, sağlık üzerinde faydaları (antikanserojen etkileri) da bu antimikrobiyal maddelerin etkisiyle bağlantılı olabilmektedir (Molujin vd., 2022; Aljohani vd., 2023).

### **2.5.2 Laktik Asit Bakterilerinin Antioksidan Aktivite Özellikleri**

Ürettikleri fenolik ve flavonoid gibi maddeler, LAB suşlarının çevrelerini kontrol etmelerine ve çeşitli endüstriyel, gıda koruma ve sağlık uygulamalarında kullanılmalarına olanak sağlamaktadır (Rodriguez vd., 2009; Martillanes vd., 2017). Fenolik bileşikler bitkisel gıda ürünlerinin önemli bileşenleri arasında yer almakta ve antioksidan özelliklerinin yanı sıra tat, sertlik (gıdanın dokusal yapısı) ve renk gibi gıdaların duyuşal özellikleri ile de doğrudan ilişkilendirilmektedir (Rupasinghe vd., 2014; Minatel vd., 2017; Bakrim vd., 2022). LAB suşları fenolik ve flavonoid açısından zengin ham

sebzelerin yerel mikrobiyota üyeleridir. Fermente bitkisel gıda ürünlerinde istenen özellikleri elde etmek için LAB suşlarının fenolik bileşiklerin bol miktarda bulunduğu bitki ham maddelerinin özelliklerine adapte olması gerekmektedir. *L. plantarum* bitkisel gıda ürünlerinin fermentasyonunda en sık kullanılan ticari başlatıcıdır (Rodriguez vd., 2009). Literatür çalışmaları, *L. plantarum*'un bazı gıda fenolik bileşiklerini parçalayabildiğini ve gıda aromasını etkileyen bileşikler ile artan antioksidan aktiviteye sahip bileşikler oluşturduğunu göstermiştir (Kachouri vd., 2015).

Flavonoidler, bitkilerde bulunan doğal bileşiklerdir. Antioksidan, anti-inflamatuar ve antikanser aktiviteleri de dahil olmak üzere insan sağlığı üzerinde faydalı etkileri olduğu rapor edilmiştir (Park vd., 2021). Flavonoidler, LAB suşları tarafından üretilen önemli bileşenlerdir. LAB'ların flavonoidler gibi bileşikleri üretme kapasitesi türden türe değişebilmektedir (Zhao vd., 2023). Bazı LAB suşları flavonoidlerin bir türü olan flavonol türevleri gibi bileşikler üretebilmektedir. Bu bileşiklerin antioksidan etki yanı sıra antimikrobiyal etki sergiledikleri de rapor edilmektedir. Örneğin bazı LAB suşlarının flavonoidleri hidroliz ederek daha basit bileşenlere parçalayabildiği ve bakteriyel hücre duvarlarına etki ederek patojenlerin gelişmesini engellediği bildirilmektedir (Kotik vd., 2023).

Literatür çalışmaları, çeşitli LAB suşlarının ürettiği bileşiklere bağlı olarak antioksidan etki sergilediklerini rapor etmektedir. Avokado yaprakları ile çeşitli LAB suşları fermentasyonu sonucunda elde edilen hidroalkolik ekstraktlarda toplam fenolik içerik ve antioksidan aktivite DPPH ve FRAP testleri neticesinde belirlenmiştir (De Montijo-Prieto vd., 2023). *L. plantarum* CECT 748T ve *P. pentosaceus* CECT 4695T suşları en yüksek antioksidan aktivite sergilemiştir. Fenolik bileşiklerin toplamı, *P. pentosaceus* CECT 4695T, *L. brevis* CECT 5354, *P. acidilactici* CECT 5765T ve *L. plantarum* CECT 9567 ile yapılan fermentasyonlarda sırasıyla %71, %62, %55 ve %21 oranında artmıştır. Avokado yapraklarının fenolik bileşik profili, bakteriyel metabolizma tarafından indüklenen biyotransformasyonlarla suşa özgü bir şekilde değiştirilmiştir. *P. pentosaceus* CECT 4695T ile fermentasyon neticesinde kemferol bileşiğinin önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir (De Montijo-Prieto vd., 2023). Başka bir çalışmada, antioksidan etkinlik DPPH serbest radikalın temizlenmesi, metal ( $Fe^{+2}$ ) iyonunun kelasyonu, hidroksil ve süperoksit radikallerinin temizlenme ve anti-lipit peroksidasyonu açısından değerlendirilmiştir. *Streptococcus salivarius* ST59HK suşu %85.24'lük bir

oranla en yüksek DPPH serbest radikal temizleme özelliği sergilemiştir. En yüksek  $Fe^{+2}$  kelasyon aktivitesi %98.2 ile *Str. salivarius* ST62HK suşunda tespit edilirken en düşük aktivite *Str. salivarius* ST48HK suşunda %71.5 olarak kaydedilmiştir. Hidroksil radikalini en fazla azaltan suş *Str. salivarius* ST59HK (%98.6) olarak belirlenmişken en az azaltan suş *Lactiplantibacillus plantarum* ST63HK (%35.60) olarak rapor edilmiştir. Süperoksit anyon radikal temizleme aktivitesi en yüksek *Str. salivarius* ST61HK (%54.62) suşunda tespit edilmiştir. En yüksek tarafından anti-lipit peroksidasyon seviyesi ise *E. faecium* ST7319 (%69.43) suşunda gösterilmiştir (Rwubuzizi vd., 2023). Gıda kaynaklı bakteri suşunun DPPH ve ABTS radikal giderme yeteneği ile nitrik oksit (NO) üretimi üzerindeki inhibisyon etkisinin araştırıldığı farklı bir çalışmada ise çalışılan tüm suşların indüklenabilir nitrik oksit sentaz ekspresyonunu azalttığı ifade edilmiştir (Kim vd., 2022).

### 2.5.3 Laktik Asit Bakterilerinin Antikanser Aktivite Özellikleri

Laktik asit bakterileri, son yıllarda kolon kanseri tedavisi ve önlenmesi üzerine gerçekleştirilen çalışmaların odak noktası haline gelmiştir. Çeşitli araştırma bulguları, probiyotik metabolitlerin (postbiyotik/hücre bağımsız ekstrakt) kolorektal kanserde hücre proliferasyonunu düzenleyebileceğini ve kemorezistan kolorektal kanser tedavisi için terapötik bir alternatif olarak düşünülebileceğini göstermektedir. Kısa zincirli yağ asitleri, ekzopolisakkaritler, vitaminler, bakteriyosin,  $H_2O_2$ , vb. metabolitlerin, farklı sinyal yollarını etkileyerek kanser hücrelerinin canlılığının azaltılmasında ve apoptozun indüklenmesinde rol oynadığı rapor edilmektedir (Noroozi vd., 2021).

LAB suşlarına ait HBE'lerin antioksidan aktivitesinin ve kolon kanseri WiDr hücre hattı üzerindeki sitotoksitesinin belirlendiği bir çalışmada, en yüksek antioksidan aktivitenin %81 ile S.34 suşu tarafından sergilendiği, aynı suşa ait HBE'nin 200  $\mu\text{g/mL}$  dozunun ise WiDr kolon kanseri hücreleri üzerinde %73 toksisite sergilediği rapor edilmiştir (Wisnuwardhani vd., 2021). Pahumunto ve Teanpaisan (2023) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, potansiyel probiyotiklerin (*Lacticaseibacillus paracasei* SD1, *Lacticaseibacillus rhamnosus* SD4, *Lacticaseibacillus rhamnosus* SD11 ve *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG) ve HBE'lerin kolorektal kanser üzerindeki antikanser etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar hem probiyotik suşlarına ait hücre duvarı ekstraktlarının hem de HBE'lerin, Caco-2 hücreleri üzerinde sitotoksik etki sergilediği ancak HIEC-6 hücrelerinde etkili olmadığı rapor edilmiştir. *Lactobacillus* suşları (*L.*

*acidophilus* HM1, *L. buchneri* FD2 ve *L. fermentum* HM3) ile gerçekleştirilen farklı bir çalışmada ise karaciğer kanseri HepG2 hücreleri üzerinde güçlü bir inhibisyon tespit edilirken normal hücrelerde toksik etki gözlemlenmemiştir. Bu etki kanser hücrelerinin seçici olarak apoptoza yönlendirildiğini göstermiştir (Shokryazdan vd., 2017). Sonuç olarak, potansiyel laktik asit bakterilerinin test edildiği bu çalışmalar, kolon ve karaciğer kanserinin önlenmesi veya ilerlemesinin geciktirilmesi için biyoterapi olarak kullanılabilecek iyi adaylar olabilecek çeşitli antikanser özellikler sergilediğini göstermektedir.

## **2.6 Fenolik Bileşikler ve Etkileri**

Fenolik bileşikler, gıdalarda bulunan ve yapılarında en az bir hidroksil grubuyla değiştirilmiş bir benzen halkasına sahip yüzlerce molekülü tanımlanır. Bu bileşikler, içerdikleri fenol halkalarının sayısına ve bu halkaları birbirine bağlayan yapısal unsurlara göre farklı gruplara ayrılmaktadır. Örneğin, fenolik asitler (benzoik veya hidroksisinnamik asit türevleri), flavonoidler, stilbenler ve lignanlar bu gruplara örnek olarak verilebilir. Flavonoidler ise flavonoller, flavonlar, izoflavonlar, flavanonlar, antosiyanidinler ve flavanol (kateşinler ve proantosiyanidinler) olarak sınıflandırılmaktadır (Manach vd., 2004).

Fenolik bileşiklerin antioksidan özellikleri, oksidatif stresle ilişkilendirilen hastalıkların önlenmesinde etkili olabilmektedir. Antioksidan olarak, hücre bileşenlerini oksidatif hasara karşı koruyabileceği ve dolayısıyla, oksidatif stresle ilişkilendirilen çeşitli dejeneratif hastalıkların riskini sınırlayabileceği giderek artan kanıtlar bulunmaktadır (Cliforrd, 2000; Vitrac vd., 2002). Antioksidanların tüketilmesi, lenfositik DNA'da oksidatif hasar düzeylerinin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. Benzer şekilde, polifenol açısından zengin yiyecekler ve içeceklerle yapılan gözlemler, polifenollerin koruyucu etkilerini göstermektedir (Arts vd., 2005). Fenol açısından zengin yiyecekler ve içeceklerin plazma antioksidan kapasitesini artırabileceği de iyi bilinmektedir. Polifenol açısından zengin yiyeceklerin tüketilmesini takiben plazma antioksidan kapasitesindeki bu artış, ya plazmadaki azaltıcı polifenollerin veya metabolitlerinin varlığıyla ya da diğer azaltıcı maddelerin konsantrasyonları üzerindeki etkileriyle (polifenollerin diğer endojen antioksidanlar üzerindeki koruyucu etkileri) veya pro-oksidan gıda bileşenleri, örneğin demirin emilimi üzerindeki etkileriyle açıklanabilir (Scalbert, 2005). Ayrıca, fenolik bileşiklerin yapısal modülasyonu veya değişiklikleri, bakteriyel patojenlere karşı güçlü

inhibitörler sağlayabilir ve çeşitli hastalıkların gelişimini önleyebilir (Kumar vd., 2014). Fenolik bileşikler, mikroorganizmaların gelişimini ve metabolizmasını etkileyerek inhibe etmektedir. Bakteri gelişmesindeki inhibisyon mekanizmaları arasında plazma membranının etkilenmesi ve mikrobiyal enzimlerin inhibisyonu bulunur (Dietrich ve Pour-Nikfardjam, 2009; Campos vd., 2016). Fenoller, apoptosisin indüksiyonu, büyüme durdurma ve DNA sentezinin inhibisyonu ve sinyal iletim yollarının modülasyonu ile kanser için umut verici ajanlar olarak bulunmuştur. Kanser gelişimini önlemek için başlatma, teşvik etme ve ilerleme aşamalarında her biriyle müdahale edebilirler (Sabu vd., 2001; Di Domenico vd., 2012).

Bu bileşiklerin tüketilmesi, kronik insan hastalıklarının riskini azaltabilir ve bakteriyel patojenlerle mücadelede etkili olabilir. Bu nedenle, fenolik bileşiklerin sağlık üzerindeki etkileri ve kullanım potansiyeli üzerine yapılan çalışmalar, gelecekteki araştırmalar için önemli bir temel oluşturabilir.

### 3. MATERİYAL ve YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Bakteri Kùltürleri ve Gelişme Koşulları

Tez çalışması kapsamında kullanılan gıda ve insan kaynaklı referans patojenler Amerikan Tip Kùltür Koleksiyonundan (ATCC) seçilmiş olup Ankara Üniversitesi Farmabiyotik Teknolojileri Araştırma Laboratuvarı ve Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı kùltür koleksiyonlarından temin edilmişlerdir. Çalışma kapsamında kullanılan patojen suşlar ve gelişim koşulları Tablo 1’de sunulmuştur.

**Tablo 1.** Patojen suşlar ve gelişim koşulları

| No | Bakteriler                                                                          | Gelişim koşulları               |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| 1  | <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 13932                                            | MH, BHI besiyeri, 37°C, Aerobik |
| 2  | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923                                             | MH, BHI besiyeri, 37°C, Aerobik |
| 3  | <i>Escherichia coli</i> O157 ATCC 43888                                             | MH, BHI besiyeri, 37°C, Aerobik |
| 4  | <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i><br>serovar Enteritidis NCTC 12694 | MH, BHI besiyeri, 37°C, Aerobik |
| 5  | <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633                                                  | MH, BHI besiyeri, 37°C, Aerobik |
| 6  | Metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i><br>(MRSA) ATCC 43300                | MH, BHI besiyeri, 37°C, Aerobik |
| 7  | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853                                            | MH, BHI besiyeri, 37°C, Aerobik |

MH: Mueller Hinton, BHI: Brain Heart Infusion

##### 3.1.2 Bakteri Kùltürlerinin Saklanması

Bakteri kùltürleri Man, Rogosa, Sharpe (MRS), Man, Rogosa, Sharpe-B (MRS-B), Glukoz M17 (GM17), Mueller Hinton (MH), Brain Heart Infusion (BHI) gibi uygun sıvı besiyerlerinde ve uygun sıcaklıkta, oksijen gereksinimlerine göre koşulların oluşturulduğu ortamda 24 saat boyunca geliştirilmiştir. İnkübasyon süresini takiben kùltürler 5.000 devirde 2 dakika boyunca santrifüj (Nüve, NF 1200R) edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında elde edilen hücreler (pellet kısmı), 1 mL steril serum fizyolojik (SF; %0.85 NaCl) ile yıkanmıştır. Yıkanan hücreler, %50’lik gliserol çözeltisinde dondurularak saklanmak üzere -80°C’de muhafaza edilmiştir (Todorov vd., 1999).

### 3.1.3 Tampon ve Çözeltiler

Çalışma kapsamında kullanılan tampon ve çözeltilerin bileşenleri Tablo 2’de sunulmuştur. Tampon, çözelti ve tüm besiyerlerinin sterilizasyonu 121°C’de 15 dakikalık protokolü takiben otoklavda, cam malzemelerin sterilizasyonu ise 175°C’de 1 saatlik protokolü takiben fırında gerçekleştirilmiştir. MRS-B besiyeri sterilizasyonu ise 121°C’de 12 dakikada gerçekleştirilmiştir.



**Tablo 2.** Çalışmada kullanılan besiyeri çözelti ve kimyasalların içerikleri

| Besiyeri/Çözelti/Tampon                   | Bileşenler                                                                                                                                                                                                                                 |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>GM17 Besiyeri</b>                      | Kazein 5 g/L<br>Soy pepton 5 g/L<br>Et ekstraktı 5 g/L<br>Maya ekstraktı 2.5 g/L<br>Askorbik asit 0.5 g/L<br>Magnezyum sülfat 0.25 g/L<br>Disodyum-β-gliserofosfat 10 g/L<br>Glukoz %10<br>pH 6.9 ± 0.2                                    |
| <b>MRS Besiyeri</b>                       | Pepton 10 g/L<br>Et ekstraktı 10 g/L<br>Maya ekstraktı 5 g/L<br>Dekstroz 20 g/L<br>Polisorbat 1 g/L<br>Amonyum sitrat 2 g/L<br>Sodyum asetat 5 g/L<br>Magnezyum sülfat 0.1 g/L<br>Mangan sülfat<br>Dipotasyum fosfat 2 g/L<br>pH 6.5 ± 0.2 |
| <b>MH Besiyeri</b>                        | Et ekstraktı 2,0 g/L<br>Kazein hidrolizat 17,5 g/L<br>Nişasta 1,5 g/L<br>Agar-agar 13,0 g/L<br>pH 7,4 ± 0,2                                                                                                                                |
| <b>BHI Besiyeri</b>                       | Beyin, kalp ekstraktı ve peptonlar 27,5 g/L<br>D(+) Glukoz 2,0 g/L<br>NaCl 5,0 g/L<br>Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,5 g/L<br>Agar-agar 15,0 g/L                                                                                       |
| <b>DMEM</b>                               | Glukoz 4500 mg/L, L-glutamin, sodyum pirüvat, sodyum bikarbonat                                                                                                                                                                            |
| <b>PBS Tamponu(1X)</b>                    | 10mM fosfat, 137mM sodyum klorür ve 2.7 mM potasyum klorür                                                                                                                                                                                 |
| <b>Tris Borik asit EDTA (TBE) Tamponu</b> | Tris 108 g, borik asit 55 g, EDTA 9.3 g                                                                                                                                                                                                    |
| <b>Fetal sıgır serumu</b>                 | NaCl %0.75                                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>Hekzan</b>                             | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> saf                                                                                                                                                                                                         |
| <b>Etil asetat</b>                        | C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> saf                                                                                                                                                                                           |
| <b>Etanol</b>                             | C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O %95                                                                                                                                                                                                        |
| <b>Metanol</b>                            | CH <sub>3</sub> OH %60                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>Gallik asit</b>                        | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>                                                                                                                                                                                               |
| <b>Kuersetin</b>                          | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>                                                                                                                                                                                             |
| <b>Folin</b>                              | C <sub>10</sub> H <sub>5</sub> NaO <sub>5</sub> S                                                                                                                                                                                          |
| <b>Alüminyum klorür</b>                   | AlCl <sub>3</sub>                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>Sodyum asetat</b>                      | C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub>                                                                                                                                                                                             |
| <b>Sodyum karbonat</b>                    | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                                                                                                                                                                                                            |
| <b>DPPH</b>                               | C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>                                                                                                                                                                              |
| <b>MTT Solüsyonu</b>                      | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid                                                                                                                                                                                |

### 3.2 Yöntem

#### 3.2.1 Saha Çalışmaları

Tez materyalini oluşturacak olan *T. aestivum* türüne ait trüf mantarlarını taze olarak toplamak için özel eğitilmiş köpekler kullanan trüf avcılarından ve Trüf Mantarı Tanıtım ve Araştırma Derneği'nden yardım alınmıştır (Fotoğraf 1). Olgunlaşan *T. aestivum* bireyleri doğal yayılış gösteren Belgrad Ormanı'ndan 2022 Mart sonu toplanmıştır (Fotoğraf 2).



**Fotoğraf 1.**Trüf mantarı toplama aşamaları



**Fotoğraf 2.** Trüf mantarı genel görüntüsü

Toplanan mantarın tür doğrulaması, Trüf Mantarı Tanıtım ve Araştırma Derneği tarafından yönlendirilen uzman kişiler tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, toplanan mantarların bir kısmı kesilerek ilgili kişiye gönderilmiştir. Trüf mantarlarının kalan diğer kısımları ve rizosfer numuneleri (n=30) ise diğer analizleri gerçekleştirmek üzere aseptik koşullarda ve soğuk zincir eşliğinde Ankara Üniversitesi, Farmabiyotik Teknolojileri Araştırma Laboratuvarına nakledilmiştir. Tür teşhisi doğrulanmış örnekler bir sonraki aşamalara dahil edilmiştir.

### **3.2.2 Trüf Mantar Ekstraktlarının Elde Edilmesi**

Doğal ortamından toplanan trüf mantarları nazikçe temiz bir fırça kullanılarak temizlenmiş, soyulmuş ve dilimlenmiştir (Fotoğraf 3). Ön aşamadan geçen trüf mantar numuneleri -20°C’de 48 saat dondurulduktan sonra -86° C’de 24 saat bekletilmiş ve ardından 72 saat boyunca liyofilizatör (Buchi, Lyovapor L-200) kullanılarak kurutulmuştur (Fotoğraf 4). Mekanik olarak havanda ezilerek öğütülen mantar numuneleri toz forma getirilmiş (Fotoğraf 5) ve 10 g numune farklı çözücüler kullanılarak (hekzan, etil asetat, %95’lik etanol, %60’lık metanol ve su) 30° C’de çalkalamalı ortamda (150 rpm/dakika) 24 saat süresince sıcak maserasyon yöntemi ile ekstrakte edilmiştir (Fotoğraf 6) (Altuner vd., 2014).



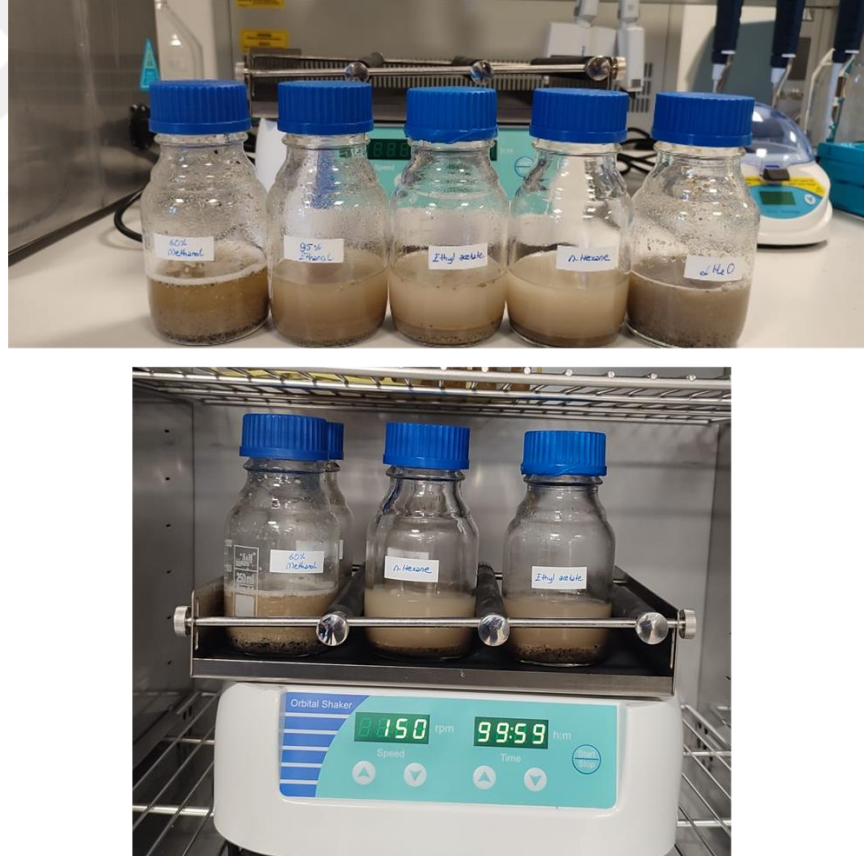
**Fotoğraf 3.** Toplanan trüf örneklerine ait kesitler



**Fotoğraf 4.** Liyofilizasyon işlemi genel görüntüsü

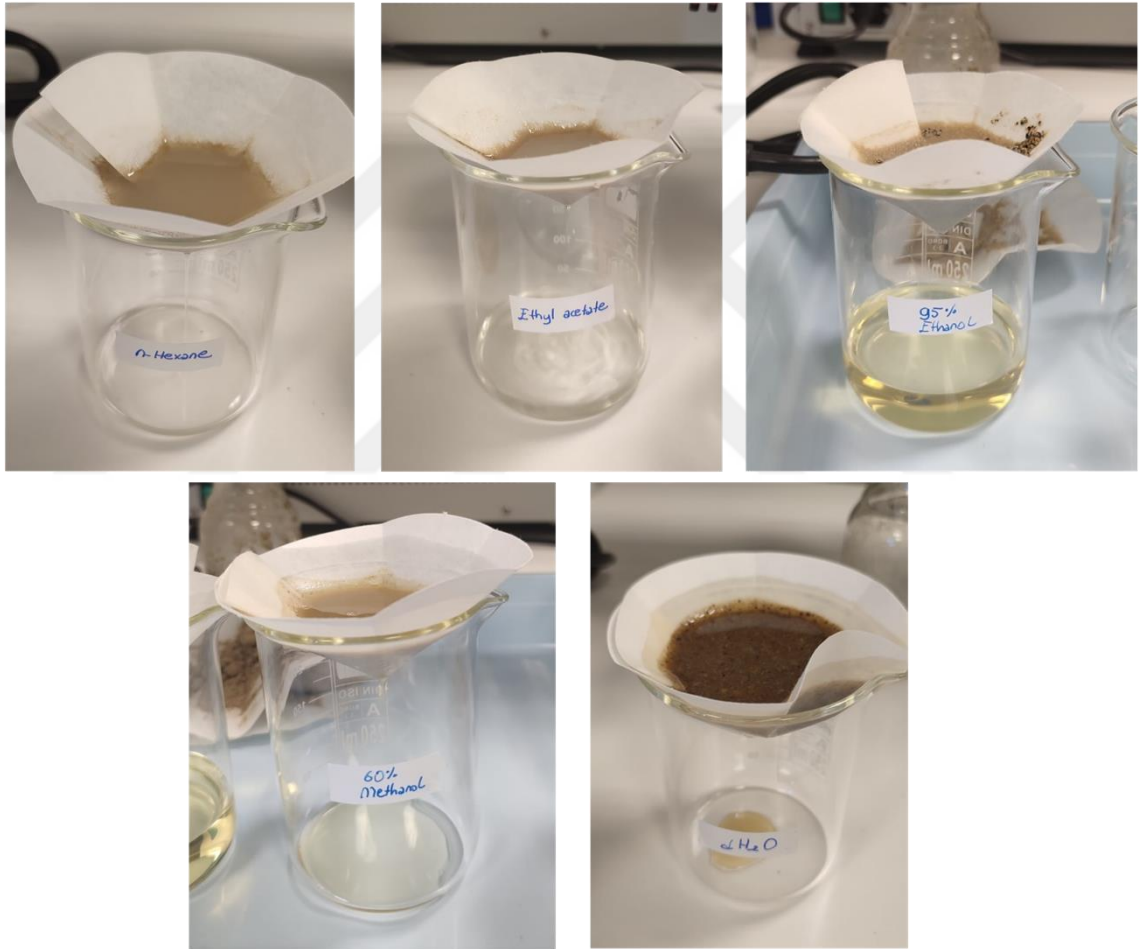


**Fotoğraf 5.** Toz forma getirilen mantar numuneleri genel görüntüsü



**Fotoğraf 6.** Farklı çözücülerle yapılan mantar ekstraksiyonunun temsili görüntüsü

İnkübasyon süresini takiben mantar ekstraktları filtre kağıdı (Whatman filter paper no 1) yardımıyla süzölmüş (Fotoğraf 7) ve döner buharlaştırıcı (Buchi, ABD) kullanılarak konsantre edilmiştir (Fotoğraf 8). Su ve %60'lık metanol kullanılarak hazırlanan ekstraktlar konsantre edildikten sonra kalan suyu uzaklaştırmak için tekrar liyofilize edilmiştir (Fotoğraf 8). Konsantre edilen tüm ekstraktlar 100 mg/mL olacak şekilde DMSO (%0,1) ve ddH<sub>2</sub>O'da çözölerek 0.22 µm por çapına sahip selölöz membran filtreden geçirilmiş ve ilerleyen analizlerde kullanılmak üzere -20°C'de saklanmışır (Fotoğraf 9).



**Fotoğraf 7.** Ekstraktların filtre kağıdı yardımı ile süzölme aşaması



**Fotoğraf 8.** Ekstraktların döner buharlaştırıcı yardımıyla konsantre edilmesi



**Fotoğraf 9.** Ekstraktların liyofilizasyon sonrası genel görüntüleri

### 3.2.3 Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Trüf mantarı ve rizosfer örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu Chen ve diğerleri (2005) tarafından önerilen yöntem takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Trüf mantarı ve rizosfer örneklerinden 1 g'lık numuneler tartılmış ve 5 mL MRS, MRS-B ve M17 broth içeren 15 mL'lik tüplere aktarılmıştır. 37°C'de aerobik koşullarda ve anaerobik jar ortamında 3 gün inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Bakterilerin fakültatif anaerob oldukları düşünülerek, anaerobik koşullarda yetiştirilen bakteriler daha sonra aerobik ortamda yetiştirilmeye çalışılmış fakat başarısız olunmuştur. Bu nedenle, çalışmalara hem aerobik hem de anaerobik koşullarda devam edilmiştir. İnkübasyonu takiben gelişen kültür %0.75 NaCl solüsyonu kullanılarak seri dilüsyon işlemine tabi tutulmuştur.  $10^{-5}$  ve  $10^{-8}$  arasında değişen dilüsyon faktörleri MRS, MRS-B ve M17 agar yüzeyine 0.1 mL olarak damlatılmış ve yayma ekim yöntemi ile mikrobiyolojik ekimleri gerçekleştirilmiştir. Tüm bu aşamalarda mantar gelişimini engellemek amacıyla besiyerlerine %0.01 sikloheksimid ilave edilmiştir. Ekimlerin yapıldığı petriler daha önce kültüre edildikleri koşullarda inkübe edilmiş ve inkübasyonu takiben agar yüzeyinde gelişen farklı tek koloniler seçilerek sıvı besiyerine aktarılmıştır. Gelişen kültürlerin saflığı çizgi ekimler neticesinde kontrol edilmiş ve ardından fenotipik tanımlama işlemine geçilmiştir.

### 3.2.4 İzolatların Ön Seçimi

Trüf mantarı ve rizosfer örneklerinden MRS, MRS-B ve M17 besiyeri kullanılarak elde edilen izolatların ön seçimi Gram boyama ve katalaz testi neticesinde gerçekleştirilmiştir. Gram boyama işlemi için lamın üzerine yayılan bir miktar kültür havada kurutulmuş ve alevden geçirilerek fikse edilmiştir. Fiksasyonu takiben kit kullanılarak Gram boyama gerçekleştirilmiştir (Merck). İlk olarak kristal viyole boyası fikse edilen yüzeye damlatılarak 60 saniye bekletilmiş ve boyanın uzaklaştırılmasını takiben distile su ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından lugol çözeltisinde 60 saniye bekletilmiş ve distile su ile yıkamayı takiben 15 saniye süresince etanole tabi tutulmuştur. 60 saniye süresince safranin ile muamelenin ardından yıkama işlemi tekrarlanmış ve hava akımı ile kurutulan lam üzerine immersiyon yağı damlatılarak 1000X büyütmeli ışık mikroskopunda (Zeiss AxiCam MRc5 Imager system) incelenmiştir. Mor renk veren izolatlar Gram pozitif (+) olarak değerlendirilmiştir. Katalaz testi için, agar ortamında geliştirilen kolonilerin üzerine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damlatılmış ve gaz

çıkışı gözlemlenmiştir. Pozitif kontrol olarak *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşu kullanılmıştır. Gram pozitif ve katalaz negatif izolatlar seçilmiş ve ilerleyen aşamalarda kullanılmak üzere muhafaza için -80°C’de %50 gliserol içeren viyallerde saklanmıştır (Beasley ve Saris, 2004).

### 3.2.5 İzolatların MALDI-TOF Analizi ile Tanımlanması

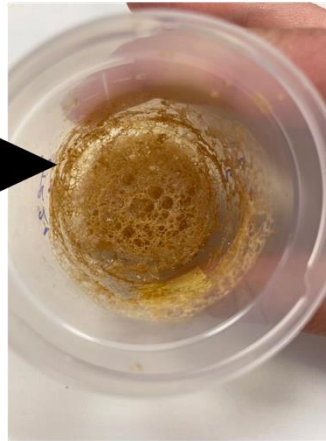
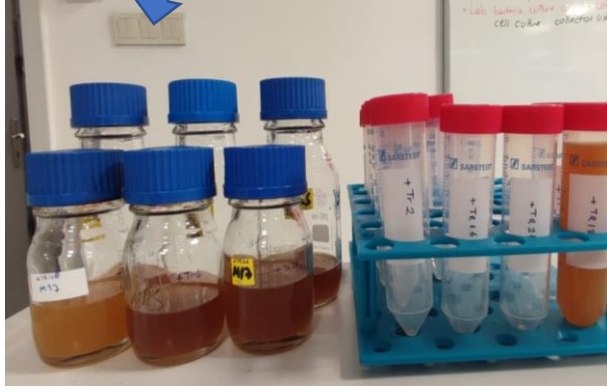
Gram pozitif ve katalaz negatif özellik sergileyen izolatların tanımlanması hücre yüzey protein profillerinin esas alındığı MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight) analiz ile gerçekleştirilmiştir. MALDI plağı, N2 lazeri ile donatılmış Microflex TOF kütle spektrometresine (Bruker Daltonics, Almanya) yerleştirilmiştir. MALDI-TOF kütle spektrumları, MALDI-bioTyper 3.0 yazılımı (Bruker Daltonics, Almanya) ile analiz edilmiştir.

Agar yüzeyinde 37°C’de 24 saat inkübasyonu takiben geliştirilen izolatlara ait koloniler alınarak MALDI plakası üzerine konulmuş, matriks solüsyonuyla süspanse edilerek kurumaya bırakılmıştır. MS analizi, Autoflex MALDI-TOF kütle spektrometresi, MS spektrumları Flex Control 3.4 yazılımı (Bruker Daltonics, Almanya) kullanılarak analiz edilmiştir. 1.700’den küçük skorlar güvenilir bulunmazken, 1.700-1.999 arasında belirtilen skorlar cins düzeyinde tanımlama, 2.000’den büyük skorlar ise tür düzeyinde tanımlama için kullanılmıştır (Lee vd., 2015). Bu aşamada tanımlaması yapılan türler bir sonraki aşamaya dahil edilmiştir.

### 3.2.6 LAB İzolatlarına Ait Hücre Bağımsız Ekstraktların Hazırlanması

LAB izolatlardan HBE eldesi amacıyla sıvı besiyerine %1 oranında inokülasyon gerçekleştirilmiş ve aerobik/anaerobik ortamlarda gelişim isteklerine göre 37°C’de 24 saat inkübasyonu takiben santrifüj işlemi (9.000 rpm 20 dakika) ile hücreler uzaklaştırılarak üst faz (süpernatant) alınmıştır. Hücrelerinden tamamen arındırmak amacıyla 0.22 µm çaplı steril membran filtreden geçirilen üst faz bir gece -20°C’de, ardından -86°C’de dondurularak liyofilizasyon işlemine tabi tutulmuştur (Rajoka vd., 2019, *modifiye edilmiştir*). Toz formda elde edilen HBE’ler (Fotoğraf 10), ana stok konsantrasyonu 500 mg/mL olacak şekilde steril distile su ile sulandırılmış ve 0.22 µm çaplı membran filtreden geçirilerek sterilizasyonları gerçekleştirilmiştir. HBE’ler daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -80°C’de saklanmıştır.

%1 inokulasyon



**Fotoğraf 10.** Laktik asit bakterileri HBE eldesi aşamaları

### **3.2.7 Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi**

Trüf ekstraktlarının ve LAB HBE'lerinin, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan (ATCC) seçilen referans patojen suşlara karşı antimikrobiyal aktiviteleri agar kuyu difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bu amaçla; test suşları (patojen suşlar) uygun besiyerine %1 oranında inoküle edilmiş ve optimum gelişme koşullarında inkübe edilmiştir. Gelişen patojen suşlar McFarland 0.5 standartına göre hazırlanmış ve yarı-katı besiyerine (5 mL) inoküle edildikten sonra agar bulunan Petri yüzeylerine yayılmıştır. Besiyerleri katı hale geldikten sonra yüzeyde 6 mm çapında kuyular açılmıştır. Farklı çözücüler kullanılarak hazırlanan trüf mantar ekstraktları ile izolatlarla ait HBE'ler 100 µL olacak şekilde kuyulara aktarılmıştır. Ayrıca, ekstrakt içindeki düşük pH'nın neden olabileceği antagonistik etkiyi ortadan kaldırmak amacıyla, süpernatant pH'sı 6 N NaOH (Merck) ile 6.5-7.0 aralığına ayarlanmış ve 0.22 µm çaplı membran filtreden geçirilmiştir (Savado vd. 2004). Uygun koşullarda 24 saat inkübasyon neticesinde kuyucuklar etrafında oluşan zon çapları mm olarak ölçülmüştür (Tagg ve McGiven, 1971). Negatif kontrol amacıyla kuyulara ayrı ayrı olmak üzere besiyeri ve steril distile su eklenmiştir. Her bir deney 3 kez tekrar edilmiş ve inhibisyon zonlarının ortalaması alınmıştır. Elde edilen veriler; 8 mm veya altı çap oranları için duyarlı değil (-); 8 ile 14 mm arasında belirlenen çap değerleri için hassas (+); 14 ile 20 mm arasındaki ölçülen çap oranları için çok hassas (++) ve 20 mm'ye eşit veya daha büyük tespit edilen çap değerleri için son derece hassas (+++) olarak nitelendirilmiştir (Elaissi vd., 2011). Bu aşamada, test edilen patojenlerin çoğuna karşı 9 mm ve üzerinde inhibisyon çapı sergileyen ekstraktlar seçilerek bir sonraki aşamaya dahil edilmiştir.

### **3.2.8 Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi**

#### **3.2.8.1 Fenolik madde miktarının belirlenmesi**

Antimikrobiyal aktivite sergileyen ekstraktların fenolik madde miktarları spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir. Bu amaçla gallik asit (GA) (fenolik madde standardı), %50 Folin reaktifi ve %2'lik sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) kullanılmıştır. Gallik asit (1 mg/mL) standart çözeltileri 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.5, 0.9, 1 mg/mL olarak distile su ile hazırlanmıştır. Kör (sadece  $\text{dH}_2\text{O}$ ) 100 µL, GA standartları ve ekstrakt içeren tüplere 100 µL Folin (%50) reaktifi ayrı ayrı eklenmiş ve karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında karanlıkta 3 dakika boyunca bekletilmiştir. Süre sonunda kör, standart ve ekstrakt içeren tüplere 2 mL %2'lik sodyum karbonat eklenmiş, vortekslemeyi takiben

oda sıcaklığında karanlık ortamda 30 dakika inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrasında numunelerdeki renk değişimi 750nm dalga boyuna ayarlanmış mikropilok okuyucuda (Biotek Epoch, ABD) ölçülmüştür. Tüm ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarı galik asidin farklı konsantrasyon değerleriyle oluşturulan standart kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplanmıştır (Singleton ve Rossi, 1965). Deney iki farklı zaman aralığında 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.8.2 Flavonoid madde miktarının belirlenmesi**

Antimikrobiyal aktivite sergileyen ekstraktların flavonoid madde miktarı alüminyum klorür kolorimetrik analizi neticesinde belirlenmiştir (Zhishen vd., 1999). Bu amaçla kuersetin (Q), saf etanol ( $C_2H_6O$ ), %10'luk alüminyum klorür ( $AlCl_3$ ) ve 1 M sodyum asetat ( $C_2H_3NaO_2$ ) çözeltileri kullanılmıştır. Kuersetin standard çözeltileri 0.025, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.7, 0.9 mg/mL olarak distile su ile hazırlanmıştır. Kör (sadece  $dH_2O$ ) 100 µL, kuersetin standartları ve ekstrakt içeren tüplere 300 µL etil alkol, 20 µL %10'luk alüminyum klorür, 1 M sodyum asetat ve 560 µL distile su eklenerek oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika boyunca bekletilmiştir. İnkübasyon neticesinde numunelerde meydana gelen renk değişimi 415nm dalga boyuna ayarlanmış mikropilok okuyucuda (Biotek Epoch, ABD) ölçülmüştür. Ekstraktlardaki toplam flavonoid madde miktarı kuersetinin farklı konsantrasyon değerleriyle oluşturulan standart kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplanmıştır. Deney iki farklı zaman aralığında 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.8.3 DPPH radikal yakalama aktivitenin belirlenmesi**

Antimikrobiyal aktivite sergileyen ekstraktların antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi için 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) giderim analizi gerçekleştirilmiştir (Blois, 1958). Yöntem DPPH radikali kaynaklı mor rengin antioksidanlar tarafından giderilmesi temeline dayanmaktadır. Mantar ve bakteri ekstraktlarının (200 µL) üzerine 500 µL 120 µM DPPH etanol çözeltisi ve 500 µL saf etanol eklenerek karıştırılmış ve 30 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon neticesinde numunelerdeki mor rengin şiddeti 517nm dalga boyunda gerçekleştirilen spektrofotometrik okumalar neticesinde belirlenmiştir. Ekstraktların absorbans ölçümlerinin değerlendirmesi hazırlanan negatif kontrole (200 µL  $dH_2O$ , 500 µL DPPH, 500 µL etanol) göre yapılmıştır. Galik asitin 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3 mg/mL olarak distile

su ile hazırlanan standart çözeltileri pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Deney iki farklı zaman aralığında 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

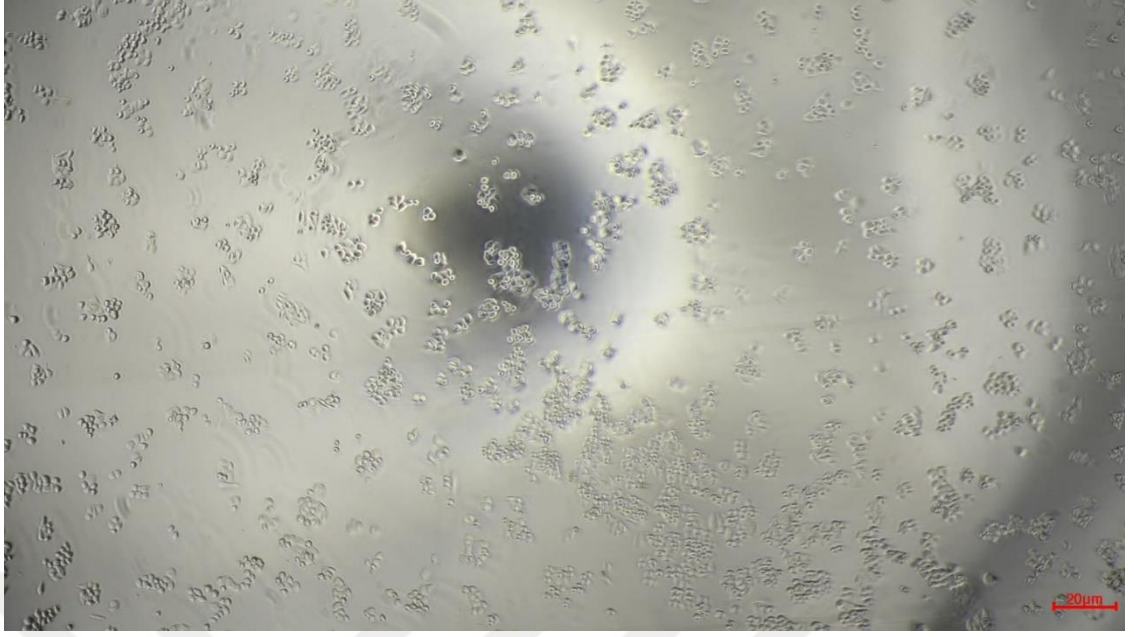
Ekstraktların % antioksidan aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir.

$$\% \text{ DPPH} = [( \text{Kontrol OD} - \text{Örnek OD} ) / \text{Kontrol OD}] \times 100$$

Tüm bu analizler neticesinde antioksidan aktivite sergileyen ekstraktlar bir sonraki aşamaya dahil edilmiştir.

### **3.2.9 Antikanser Etkinin Belirlenmesi**

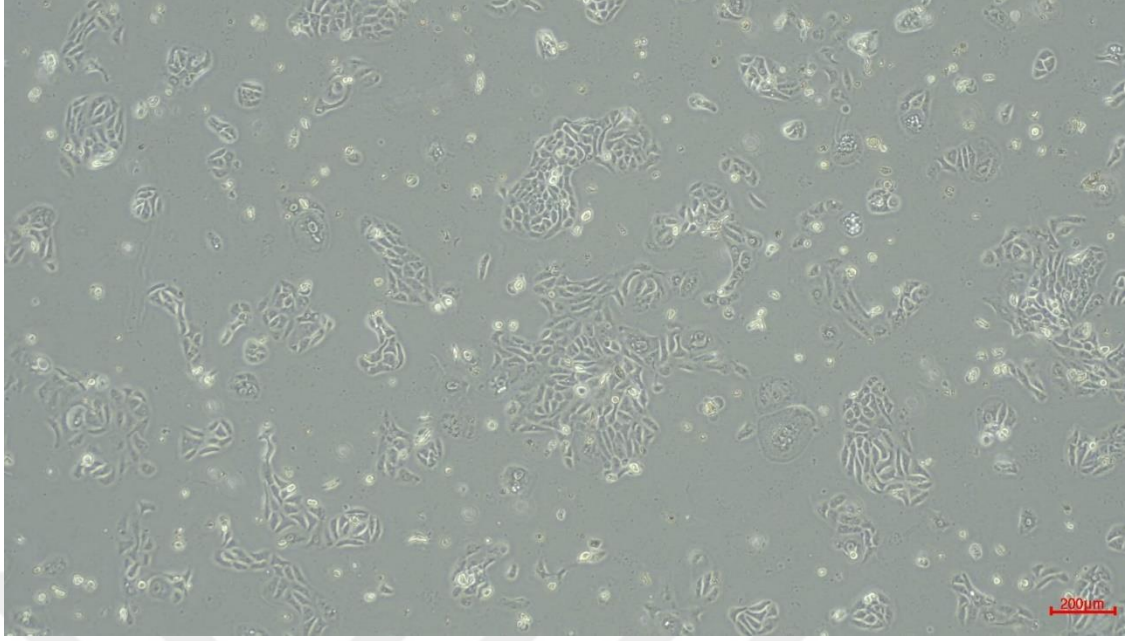
Çalışma kapsamında seçilen mantar ve bakteri ekstraktlarının kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla insan kolon kanser hücre hattı (HT-29) (Fotoğraf 11) ve karaciğer kanser hücre hattı (Hep40) (Fotoğraf 12) kullanılmıştır. Seçici sitotoksik etkinin tespiti amacıyla HaCaT (Fotoğraf 13) insan keratinosit hücre hattı seçilmiş ve kontrol olarak kullanılmıştır. Hücreler %10 fetal sıgır serumu (FBS, Sigma), 200 mM L glutamin, 1000 U/mL penisilin/streptomisin içeren DMEM taze kültür ortamında ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinde 3 günde bir besiyeri tazelenmiştir. İnkübasyon neticesinde belli bir seviyeye ulaşmış hücreler (%60-80) tripsinizasyon ile kaldırılmış ve 96 kuyucuklu doku kültür plaklarına her kuyuda 5x10<sup>5</sup> hücre/mL yoğunluğunda olacak şekilde hücre dağıtılmıştır. Hücre sayımı tripan mavisi kullanılarak otomatik hücre sayım cihazında (BioRad, ABD) gerçekleştirilmiştir.



**Fotoğraf 11.** Kolorektal kanser hücre hattı (HT-29) mikroskop görüntüsü



**Fotoğraf 12.** Karaciğer kanser hücre hattı (Hep40) mikroskop görüntüsü



**Fotoğraf 13.** Keratinosit hücre hattı (HaCaT) mikroskop görüntüsü

24 saat inkübasyonun ardından kuyulardaki besiyeri çekilmiş ve her bir kuyuya değişen konsantrasyonlarda trüf ekstraktları (150-500 µg/mL) ve LAB HBE'leri (100-2000 µg/mL) içeren taze besiyeri eklenmiştir. Ekstrakt içermeyen besiyeri eklenen kuyular kontrol grubu olarak kullanılmıştır. 48 saat inkübasyon neticesinde ekstraktların hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri MTT analizi ile belirlenmiştir (Denizot, vd. 1986). MTT testi, proliferasyona uğrayan hücrelerin dehidrogenaz enzim aktivitesinin artmasıyla sarı renkteki tetrazolyum tuzunu (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; MTT, Merck) kullanması ve mor renkteki formazan kristallerini oluşturması ve 570 nm dalga boyunda bu rengin ölçülmesi esasına dayalı kolorimetrik bir yöntemdir. MTT solüsyonu (steril PBS içinde 5 mg/mL) 0.22 µm çaplı filtreden geçirilerek hazırlanmıştır. Inkübasyon sürelerini takiben kuyulardaki besiyerleri uzaklaştırılmış 10 µL (0.5 mg/mL) MTT eklenmiş ve 4 saat süreyle 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Inkübasyon neticesinde kuyulardaki MTT solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra formazan kristalleri 150 µL dimetilsülfoksit (DMSO, Merck) ile çözündürülmüş ve oluşan mor rengin absorbansı, 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Biotek Epoch, ABD). Kontrole kıyasla ekstraktlar ile muamele edilen hücrelerdeki canlılık % azalma olarak belirlenmiştir. Tüm ekstraktlar 3 tekrarlı olarak analiz edilmiştir.

### 3.2.10 Fenolik Madde İçerik Analizi

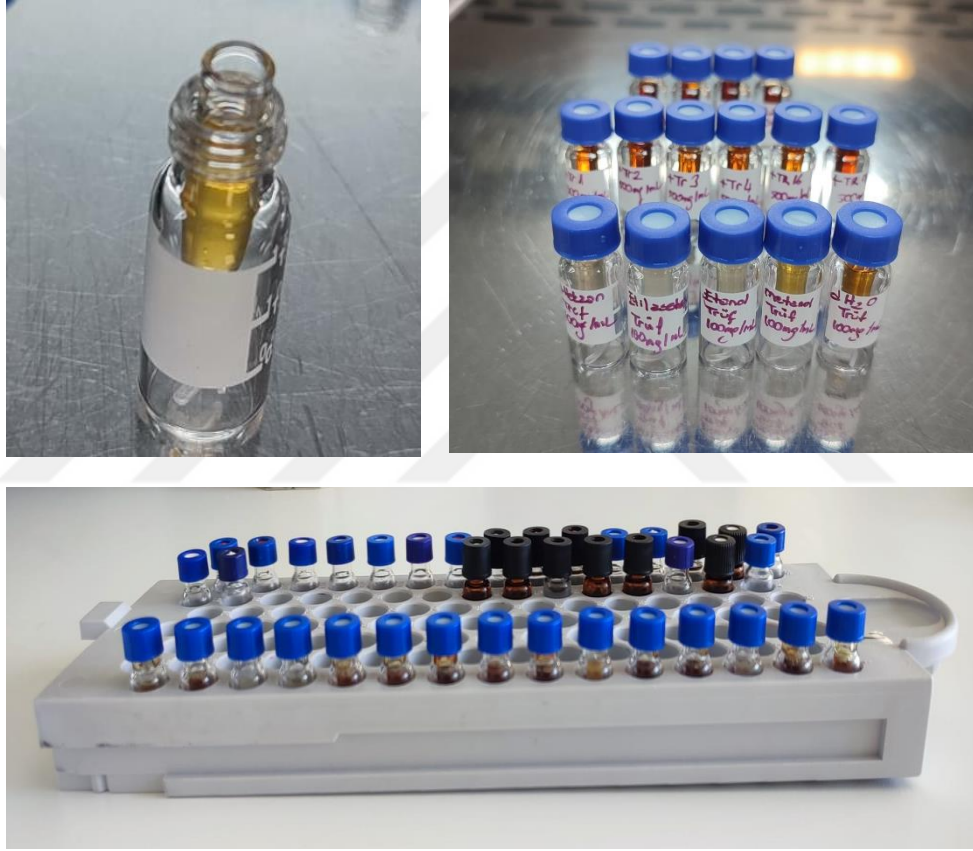
Tüm analizler neticesinde etkili bulunan mantar ekstraktlarının ve LAB HBE'lerinin fenolik bileşen içerikleri kromatografik yöntemler neticesinde Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü altyapısı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fenolik bileşiklerin analizi, Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (Shimadzu Prominence series HPLC, LC-20A, Fotoğraf 14) cihazında Tablo 3'te sunulan analitik sistem koşulları kullanılarak analiz edilmiştir. Mobil faz olarak %2'lik asetik asit ve metanol, çözücü olarak da %50 metanol ve %50 su karışımı kullanılmıştır. Metanol-saf su (50-50) karışımı ile 100 mg fenolik asit standartları karıştırılmış ve 1000 ppm'lik standart ana stok çözeltisi hazırlanmıştır (Fotoğraf 15). Standart olarak kullanılan fenolik bileşikler ise gallik asit, 4-hidroksibenzoik asit, klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, ellajik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, kateşin ve naringenindir. Ekstraktların fenolik madde içerikleri standartlardan elde edilen pikler ile karşılaştırılmış ve miktarsal olarak belirlenmiştir.



**Fotoğraf 14.** Analizde kullanılan Shimadzu Prominence LC-20A Model HPLC cihazı

**Tablo 3.** HPLC koşulları

|                              |                                    |
|------------------------------|------------------------------------|
| <b>Cihaz</b>                 | : Shimadzu                         |
| <b>Model</b>                 | : Prominence LC-20A HPLC           |
| <b>Kolon</b>                 | : ODS/ODS-3 (250X4.6 mm i.d., 5µm) |
| <b>Dedektör</b>              | : PDA dedektör                     |
| <b>Mobil Faz Akış Hızı</b>   | : 1.0 mL/min                       |
| <b>Enjeksiyon Hacmi</b>      | : 20 µl                            |
| <b>Dalgaboyu</b>             | : 280, 320 ve 360 nm               |
| <b>Numuneye ait Dilüsyon</b> | : 20                               |



**Fotoğraf 15.** HPLC enjeksiyon sistemi için hazırlık aşamaları

### 3.2.11 İstatiksel Analizler

Deneyler iki farklı zaman aralığında en az 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Analizler SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) versiyonu kullanılarak değerlendirilmiştir. ANOVA, bağımsız t-testi ve Tukey posthoc testi kullanılarak veriler analiz edilmiş ve  $p < 0.05$  tüm analizler için anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1 Trüf Mantarı Toplanması ve Ekstraksiyonu

Literatür çalışmaları incelendiğinde *T. aestivum*'un iki meyve verme dönemi olduğu görülmektedir. İlki Şubat ortasında olan dönemin ardından, erken ilkbaharda ikinci bir ana meyve verme aşaması gelmektedir. Bu da hasatın genellikle Şubat, Mart; Haziran, Temmuz ve Ağustos ayları arasında kademeli olarak gerçekleşmesine neden olmaktadır (Le Tacon, 2016). Bu çalışma kapsamında *T. aestivum* türüne ait aynı olgunluktaki bireyler 2022 yılı Mart sonuna doğru taze olarak toplanmıştır. Trüf mantarları, hem içerdikleri özel kimyasal bileşenlerinin hem de aromalarının zamansal olarak değişmesi nedeniyle aynı ay içerisinde toplanması gerekmektedir. Yine içerik analiz değişkenliğini önlemek amacıyla *T. melanosporum* için yapılan ticari kategori sınıflandırması (Ekstra, Birinci, İkinci, Olgunlaşmamış) (Tejedor-Calvo vd., 2023) dikkate alınarak aynı olgunluk derecesine giren örnekler seçilmiştir.

Çalışma kapsamına dahil edilen *T. aestivum* türüne ait trüf mantarları Belgrad Ormanı'ndan toplanmıştır. Literatür çalışmaları coğrafi kökenin mantar ekstraktlarının bileşenlerini etkilediğine işaret etmektedir. Tejedor-Calvo ve diğerleri (2023) tarafından gerçekleştirilen bir çalışma kapsamında Arjantin'de üretilen *T. melanosporum* trüf mantarlarının aromatik profili karakterize edilmiş ve daha önce açıklanan aromatik profillere ek olarak yerel biyotik ve abiyotik faktörlere bağlı olası varyasyonları belirlenmiştir (Tejedor-Calvo vd., 2023). Bu amaçla trüf mantarının gelişim faktörleri, coğrafi faktörler ve meyve bahçesi yönetimine ilişkin faktörler (olgunluk aşaması, coğrafi konum, konukçu ağaç, trüf mantarlarının ticari sınıflandırması ve aromatik bileşikler) dikkate alınmıştır. Sonuç olarak, coğrafi kökenin konukçu ağaç türleri uçucu madde profilini değiştirebileceği gösterilmiştir. Belirtilen bulgulara benzer şekilde, Slovenya'da *T. aestivum* mantarları içindeki uçucu maddelerin farklılıkları Siskovic ve diğerleri (2021) tarafından ortaya konulmuştur. Sonuçlar, sub-Akdeniz iklimine sahip bir lokasyon ile diğer lokasyonlar arasında güçlü farklılıklar olduğunu göstermiştir. Bu bilgiler dikkate alındığında, mevcut çalışmada kullanılan *T. aestivum* aynı coğrafi bölgeden (Belgrad Ormanları) ve yalnızca konukçu ağaç olarak Meşe, *Quercus* cinsine ait bitki türünün bulunduğu yerden toplanmıştır.

Ekstraksiyon aşamasından önce mantar örnekleri liyofilize edilmiştir. Siskovic ve arkadaşları (2021), dünya çapında ticareti yapılan 4 trüf mantarı türünü (*T. aestivum*, *T.*

*brumale*, *T. magnatum* ve *T. melanosporum*) liyofilize edilmiş hali ve taze hali olmak üzere uçucu bileşen analizi bakımından incelemiştir. Uçucu bileşen içeriğinin türe özgü olduğunu ve dondurularak kurutulmuş 4 trüf mantarı türünün tamamının taze örneklerde olduğu gibi eşit derecede içerik sergilediklerini rapor etmişlerdir. Bu çalışmada da, içerik kaybı yaşamamak adına dilimlenen trüf mantarı numuneleri -20°C’de 48 saat derin dondurucuda dondurulduktan sonra -86°C’de bekletilmiş ve ardından liyofilizatörde dondurularak kurutulmuştur. Ardından ekstraksiyon işlemine geçilmiştir. Bu yöntem biyoterapötik etki ve temel bileşen analizi için ideal bir yaklaşım olarak önerilmektedir (Tejedor-Calvo vd., 2022). Kullanılan çözücüye bağlı olarak da, ekstraksiyon sonrası farklı biyolojik aktif bileşenler elde edilmektedir. Örneğin su kullanılarak yapılan ekstraksiyonda hidrofilik (suda çözünür) karaktere sahip belirli moleküller elde edilirken, etil asetat hem polar hem de non-polar bileşiklerin ekstraksiyonu için uygundur. Mantar sterollerini elde etmek için etanol kullanılmışken (Gil-Ramirez vd., 2013), yüksek polisakkarit verimleri elde etmek için basınçlı su daha uygun bulunmuştur (Palanisamy vd., 2014; Smiderle vd., 2017). Ekstraksiyonda kullanılacak olan çözücüler elde edilmek istenen bileşiklerin türüne ve ekstraksiyonun amacına bağlı olarak seçilmektedir.

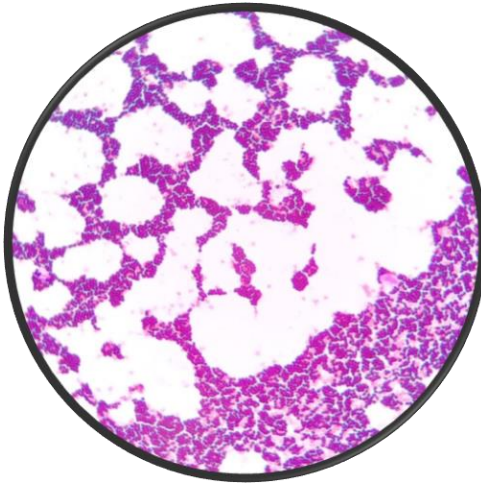
#### **4.2 Trüf Mikrobiyotasından İzole Edilen Laktik Asit Bakterileri**

Çalışma kapsamında 30 farklı trüf örneğinin mantar ve rizosfer bölümleri LAB izolasyonu için kullanılmıştır. Numuneler; MRS, MRS-B ve M17 besiyerinde, aerobik ve anaerobik koşullar altında mikrobiyolojik analizlere tabi tutulmuş ve bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyonu takiben toplamda tek düşürülen 50 adet koloni kültüre edilmiş ve Gram pozitif ve katalaz negatif özellikler sergileyen 14 adet izolat çalışmanın ilerleyen aşamalarında kullanılmak üzere seçilmiştir (Tablo 4). Seçilen izolatlara ait Gram boyama görüntüleri Fotoğraf 16’da sunulmuştur.

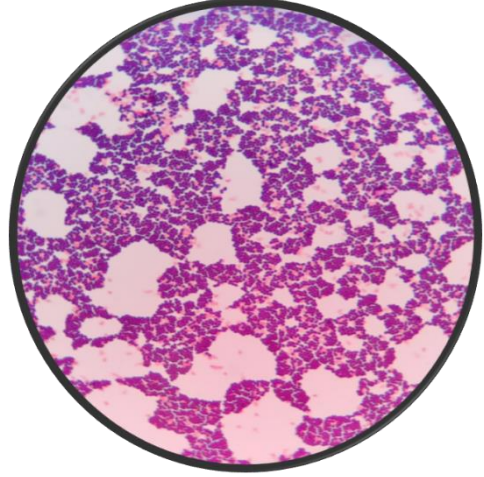
**Tablo 4.** Çalışmada kullanılan kültürler, gelişim koşulları ve kaynakları

| No | İzolat kodları | Gelişim koşulları                   | Kaynak       |
|----|----------------|-------------------------------------|--------------|
| 1  | +Tr1           | MRS besiyeri, 37°C, Aerobik ortam   | Trüf mantarı |
| 2  | +Tr2           | MRS besiyeri, 37°C, Aerobik ortam   | Rizosfer     |
| 3  | +Tr3           | MRS besiyeri, 37°C, Aerobik ortam   | Trüf mantarı |
| 4  | +Tr4           | MRS besiyeri, 37°C, Aerobik ortam   | Rizosfer     |
| 5  | +TR16          | M17 besiyeri, 37°C, Aerobik ortam   | Rizosfer     |
| 6  | +TR18          | M17 besiyeri, 37°C, Aerobik ortam   | Trüf mantarı |
| 7  | -Tr1           | MRS besiyeri, 37°C, Anaerobik ortam | Trüf mantarı |
| 8  | -Tr3           | MRS besiyeri, 37°C, Anaerobik ortam | Trüf mantarı |
| 9  | -Tr7           | MRS besiyeri, 37°C, Anaerobik ortam | Trüf mantarı |
| 10 | -TR16          | M17 besiyeri, 37°C, Anaerobik ortam | Rizosfer     |
| 11 | -TR18          | M17 besiyeri, 37°C, Anaerobik ortam | Rizosfer     |
| 12 | -TR19          | M17 besiyeri, 37°C, Anaerobik ortam | Trüf mantarı |
| 13 | -TR20          | M17 besiyeri, 37°C, Anaerobik ortam | Trüf mantarı |
| 14 | -TR26          | M17 besiyeri, 37°C, Anaerobik ortam | Rizosfer     |

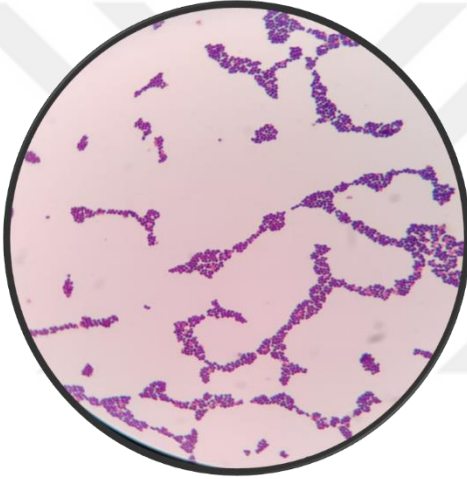
+, aerobik ortamda gelişen, -, anaerobik ortamda gelişen, Tr; MRS besiyerinde gelişen, TR; M17 besiyerinde gelişen kültür



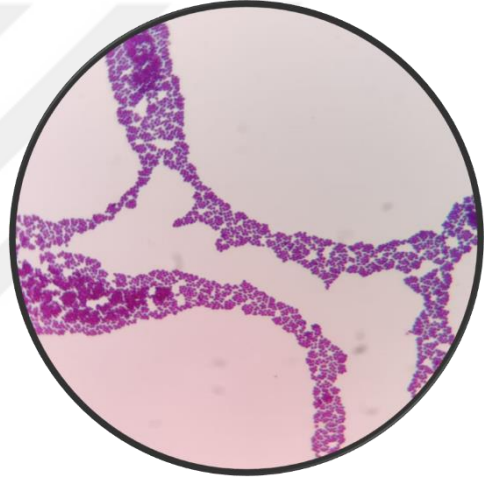
(+)Tr1



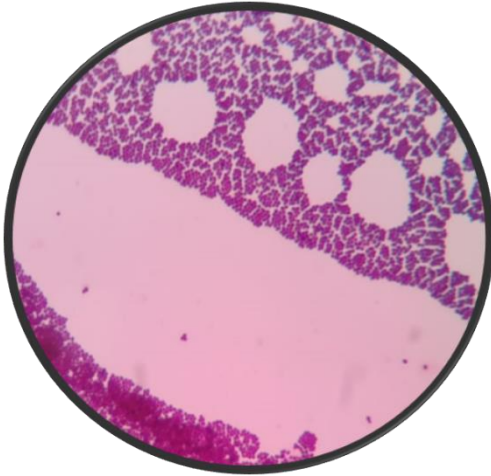
(+)Tr2



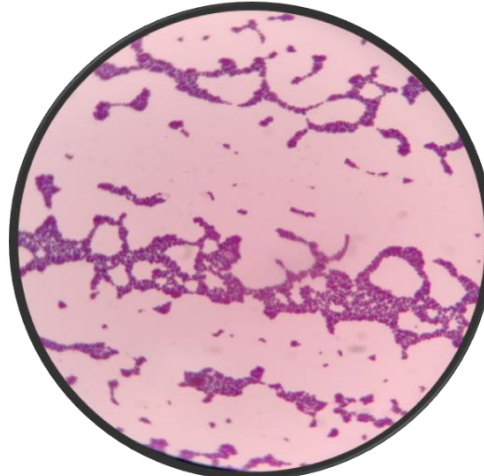
(+)Tr3



(+)Tr4



(+)TR16

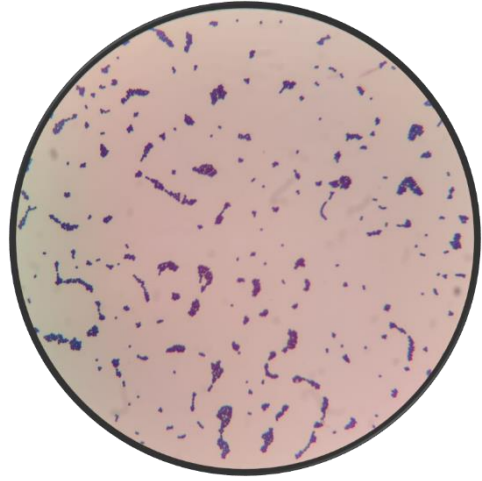


(+)TR18

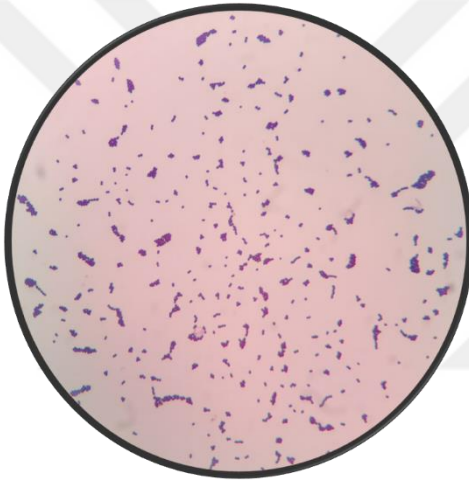
**Fotoğraf 16.** Gram boyama yapılmış LAB izolatlarının ışık mikroskopundaki görüntüleri (1000x)



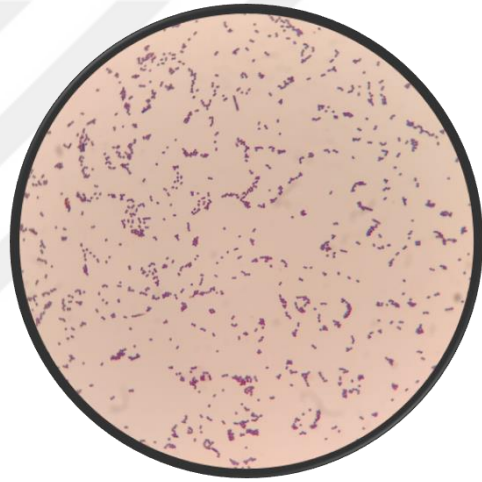
(-)Tr1



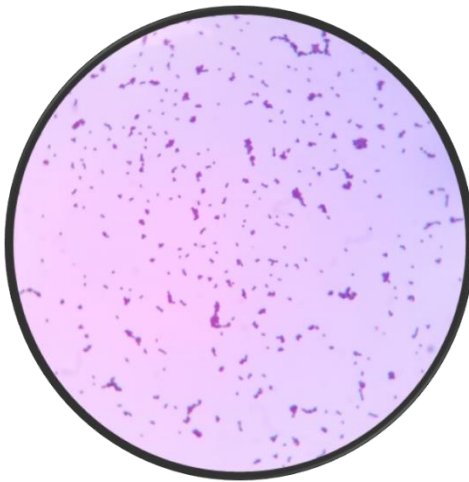
(-)Tr3



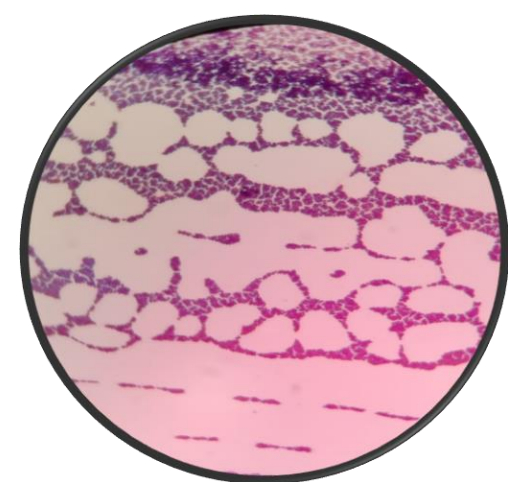
(-)Tr7



(-)TR16

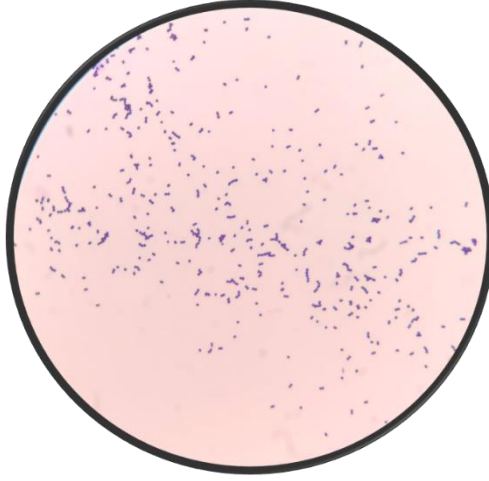


(-)TR18

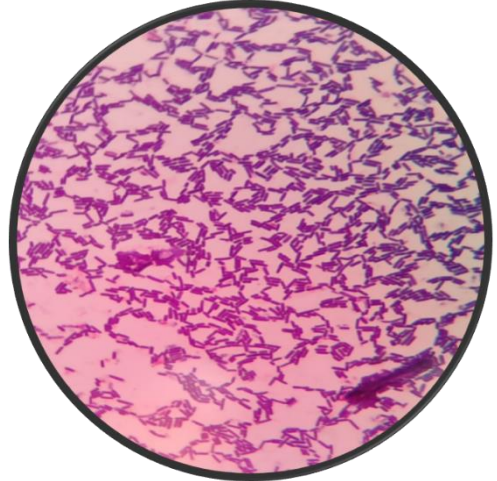


(-)TR19

**Fotoğraf 16. Devamı.**



(-)TR20



(-)TR26

**Fotoğraf 16. Devamı.**

#### **4.3.Trüf Mikrobiyotasından İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması**

Trüf mantarı ve trüf mantarı rizosfer tabakasından izole edilen bakteriler hücre yüzey protein profillerinin esas alındığı MALDI-TOF analizi ile tanımlanmıştır. Tüm izolatların skorum değeri 2.000'den büyük olarak tespit edilmiştir (Tablo 5). Elde edilen veriler neticesinde 12 izolat *E. faecium*, 2 izolat ise *L. sakei* olarak tanımlanmıştır.

**Tablo 5.** İzolatların MALDI-TOF analizi neticesinde tür düzeyindeki tanımlama sonucu  
**İzolatların tür düzeyindeki tanımlama sonucu**

| No | İzolat kodları | Bakteri adı                 | Kütüphanede eşleşen bakteri kodu | Skor  |
|----|----------------|-----------------------------|----------------------------------|-------|
| 1  | +Tr1           | <i>Enterococcus faecium</i> | 11037 CHB                        | 2.430 |
| 2  | +Tr2           | <i>Enterococcus faecium</i> | DSM 17050 DSM                    | 2.386 |
| 3  | +Tr3           | <i>Enterococcus faecium</i> | 20218_1 CHB                      | 2.238 |
| 4  | +Tr4           | <i>Enterococcus faecium</i> | 13589 DSM                        | 2.405 |
| 5  | +TR16          | <i>Enterococcus faecium</i> | 11037 CHB                        | 2.470 |
| 6  | +TR18          | <i>Enterococcus faecium</i> | PX_21086109_III MLD              | 2.262 |
| 7  | -Tr1           | <i>Lactobacillus sakei</i>  | DSM 20494 DSM                    | 2.441 |
| 8  | -Tr3           | <i>Enterococcus faecium</i> | DSM 6177 DSM                     | 2.353 |
| 9  | -Tr7           | <i>Enterococcus faecium</i> | 20218_1 CHB                      | 2.174 |
| 10 | -TR16          | <i>Enterococcus faecium</i> | 11037 CHB                        | 2.054 |
| 11 | -TR18          | <i>Enterococcus faecium</i> | 20218_1 CHB                      | 2.092 |
| 12 | -TR19          | <i>Enterococcus faecium</i> | 11037 CHB                        | 2.324 |
| 13 | -TR20          | <i>Enterococcus faecium</i> | 11037 CHB                        | 2.246 |
| 14 | -TR26          | <i>Lactobacillus sakei</i>  | DSM 20101 DSM                    | 2.394 |

+, aerobik ortamda gelişen, -, anaerobik ortamda gelişen, Tr; MRS besiyerinde gelişen, TR; M17 besiyerinde gelişen

Çalışmamızda tanımlanan izolatlara benzer şekilde Fhoula ve arkadaşları (2013) tarafından Tunus'un çeşitli coğrafi bölgelerinden toplanan çöl trüf mantarından ve zeytin ağaçlarının rizosferik örneklerinden izole edilen LAB suşları *L. sakei* ve *E. faecium* olarak tanımlanmıştır. Farklı tür bir trüf mantarı kullanılmasına rağmen izole edilen LAB türleri bakımından benzer sonuçlar tespit edilmiştir. Özel ekosistemlerdeki bakteriyel çeşitliliğin anlaşılması, potansiyel antimikrobiyal, antioksidan ve antikanserojen kaynakların keşfi açısından önem taşımaktadır.

#### 4.4 Antimikrobiyal Aktivite Sergileyen İzolat ve Ekstraktların Seçimi

Farklı çözücüler kullanılarak hazırlanan trüf mantar ekstraktları ile trüf mantar ve rizosfer bölümlerinden izole edilen LAB suşlarına ait HBE'lerin *L. monocytogenes* ATCC 13932, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* O157 ATCC 43888, *S. Enteritidis* NCTC 12694, *B. subtilis* ATCC 6633, MRSA ATCC 43300 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 gibi gıda ve insan kaynaklı patojenlere karşı antimikrobiyal etkinliği kuyu difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bu aşamada izole edilen LAB suşlarına ait HBE'lerin liyofilize formu

çalışmaya dahil edilmiştir. Saadatzadeh ve arkadaşları (2013), liyofilize edilmiş *Lactobacillus casei* suşuna ait HBE'nin normal süpernatantla karşılaştırıldığında daha yüksek etkinlik sergilediğini rapor etmiştir. Bununla birlikte, aktivitede depolama süresi boyunca tüm liyofilize edilmemiş süpernatant numunelerinde liyofilize edilmiş örneklerle oranla gözle görülür biçimde bir azalma tespit edilmiştir. Liyofilizasyon işlemi dahilinde dondurarak kurutma işlemi gerçekleştirilmektedir. Bu süreçte elde edilen biyoekstraktlar veya süpernatant yüksek sıcaklıklara maruz bırakılmadan dehidrasyona uğratılmakta ve bu durumda maddenin yapısının korunmasına imkan sağlanmaktadır (Aubuchon, 2006). Liyofilizasyon süreci genellikle suyun alındığı ve maddelerin yoğun hale getirildiği bir işlem olduğundan, yoğunlaştırılmış aktivite, maddelerin saklama stabilitesinin artması, etkin formda metabolit oluşması gibi faktörlerin kombinasyonu; liyofilize edilmiş *L. casei* suşunun süpernatantı normal süpernatantla karşılaştırıldığında daha yüksek etkinlik göstermesine neden olabilir. Yirminci yüzyılın son yarısında dondurarak kurutma, biyofarmasötik ürünlerin korunmasına yönelik köklü bir yöntem dönüşmüştür (Kasper vd., 2013).

Liyofilize ekstraktının kullanılması, probiyotik ürünlerin hazırlanmasında yenilikçi bir strateji olarak değerlendirilebilir. Başta süt ürünleri, diyet ve tıbbi takviyeler olmak üzere gıda ürünlerine ve son zamanlarda tedavi edici ve profilaktik ilaçlara yoğun bir şekilde LAB içeren ürünler eklenirken, HBE'nin liyofilize edilerek kullanımı canlı hücrelerin kullanımına pratik bir alternatif olabilir. Bu yüzden, mevcut çalışmada, LAB HBE'lerinin liyofilize edilmiş örnekleriyle çalışmaya karar verilmiştir.

Çalışma kapsamında kullanılan 5 farklı trüf mantarı ekstraktı ile 14 LAB suşuna ait HBE'lerinin 7 patojen bakteriye karşı antimikrobiyal etkileri belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar inhibisyon çapının ölçülmesi neticesinde mm olarak sunulmuştur. Sonuçlar trüf mantar ekstraktları açısından değerlendirildiğinde, en yüksek aktivitenin 14 mm inhibisyon zonu ile *E. coli* O157 ATCC 43888 ve *S. Enteritidis* NCTC 12694 suşlarına karşı metanol ekstraktında elde edildiği belirlenmiştir. Etanol ekstraktının hiçbir patojene karşı aktivite sergilemediği tespit edilmiştir. Hekzan ekstraktı ise yalnızca *L. monocytogenes* ve *E. coli*'ye karşı inhibisyon zon çapı oluşturmuştur. Su ve etil asetat ekstraktı ise tüm patojenlere karşı aktivite sergileyen trüf ekstraktları olmuştur (Tablo 6).

**Tablo 6.** Trüf mantarı ekstraktlarının patojenlere karşı oluşturdıkları inhibisyon zon çapları

| İnhibisyon Zon Çapları (mm)        |        |             |        |         |        |
|------------------------------------|--------|-------------|--------|---------|--------|
|                                    | Hekzan | Etil asetat | Etanol | Metanol | Su     |
| <i>L. monocytogenes</i> ATCC 13932 | 11±0.1 | 10±0.0      | -      | 12±0.3  | 11±0.3 |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923        | -      | 10±0.1      | -      | 10±0.4  | 10±0.8 |
| <i>E. coli</i> O157 ATCC 43888     | 10±0.2 | 11±0.6      | -      | 14±0.2  | 11±0.1 |
| <i>S. Enteritidis</i> NCTC 12694   | -      | 13±0.3      | -      | 14±0.0  | 10±0.0 |
| <i>B. subtilis</i> ATCC 6633       | -      | 9±0.0       | -      | -       | 9±0.1  |
| MRSA ATCC 43300                    | -      | 12±0.2      | -      | -       | 9±0.0  |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853    | -      | 10±0.3      | -      | -       | 10±0.7 |

Tüm trüf mantarı ekstraktları çalışmanın sonraki aşamasına dahil edilmiştir.

Tejedor-Calvo ve arkadaşları (2021), farklı çözücüler (deiyonize sterilize distile su, metanol, hekzan ve etil asetat) kullanarak elde ettikleri trüf mantar ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesini 16 farklı mikroorganizma üzerinde analiz etmişlerdir. *T. aestivum*'un etil asetat ekstraktı için *L. monocytogenes* üzerinde 8.5 mm inhibitör zon tespit edilmiştir. Bu çalışmada *L. monocytogenes* ve *E. coli*, etanol hariç diğer trüf ekstrelerine (hekzan, etil asetat, metanol ve su) en duyarlı olan suşlar olarak değerlendirilmiştir. Buna karşılık, *B. subtilis*, MRSA ve *P. aeruginosa*, trüf ekstrelerine en az duyarlı olan patojenler olarak rapor edilmiştir. *T. aestivum*'un hekzan, etil asetat, metanol ve su ekstreleri *L. monocytogenes*'e karşı sırasıyla 11, 10, 12 ve 11 mm'lik inhibisyon sergilemiştir. *L. monocytogenes* trüf ekstrelerine karşı hassas (+) olduğu tespit edilmiştir.

Çalışkan (2001) tez çalışmasında, doğal olarak yetişen *T. aestivum* mantar ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerini araştırmıştır. Etanol, aseton, etil asetat ve kloroform kullanılarak elde edilen ekstraktların *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *Micrococcus luteus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* bakterileri ve *Candida albicans* mayası üzerindeki etkileri Agar-Jel Difüzyon ve Disk Difüzyon yöntemleriyle değerlendirilmiştir. Ancak elde edilen veriler trüf mantar ekstraktlarının test edilen hiçbir bakteri veya maya suşunun üremesini engellemediğini göstermiştir. Buna karşın mevcut çalışmamızda sonuçlar, *T. aestivum* etil asetat ve su ekstreleri patojenlere karşı test

edildiğinde mikrobiyal gelişme inhibisyonu göstermiştir. Yani tüm test edilen bakteriler, etil asetat ve su ekstraktları tarafından inhibe edilmiştir. Bununla birlikte, *T. aestivum* hekzan ekstresi *L. monocytogenes* ve *E. coli*'yi 11 ile 10 mm (hassas) aralığında bir inhibisyon bölgesiyle etkilerken, metanol ekstresi *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* ve *S. Enteritidis*'i sırasıyla 12, 10, 14, 14 mm (hassas) aralığında bir inhibisyon bölgesiyle etkilemiştir. Öte yandan, etanol ekstresi ise tüm test bakterilerine karşı herhangi bir inhibisyon etkisi göstermemiştir.

Aerobik koşullarda kültüre edilen 6 farklı izolata ait HBE'lerin antimikrobiyal aktivitesine ait inhibisyon zon çapları Tablo 7'de sunulmuştur.

**Tablo 7.** Aerobik koşullarda kültüre edilen LAB izolatlarına ait HBE'lerin patojenlere karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapları

| İnhibisyon Zon Çapları (mm)        |        |        |        |        |        |        |
|------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                                    | +Tr1   | +Tr2   | +Tr3   | +Tr4   | +TR16  | +TR18  |
| <i>L. monocytogenes</i> ATCC 13932 | 13±0.1 | 13±0.1 | 12±0.2 | 10±0.1 | 18±0.0 | 20±0.1 |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923        | 20±0.0 | 18±0.1 | 20±0.0 | 16±0.4 | -      | -      |
| <i>E. coli</i> O157 ATCC 43888     | 16±0.0 | 16±0.4 | 16±0.3 | 13±0.3 | 12±0.2 | 12±0.4 |
| <i>S. Enteritidis</i> NCTC 12694   | 13±0.7 | 15±0.7 | 14±0.0 | 15±0.3 | 8±0.0  | 10±0.7 |
| <i>B.subtilis</i> ATCC 6633        | 15±0.0 | 17±0.2 | 14±0.7 | 12±0.2 | 11±0.7 | 12±0.0 |
| MRSA ATCC 43300                    | 12±0.3 | 13±0.0 | 11±0.4 | -      | -      | -      |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853    | 11±0.2 | 12±0.1 | 12±0.1 | -      | 12±0.4 | 12±0.7 |

+, aerobik ortamda gelişen, -, anaerobik ortamda gelişen, Tr; MRS besiyerinde gelişen, TR; M17 besiyerinde gelişen

HBE'lere ait en yüksek aktivite trüf mantarından izole edilen ve *E. faecium* olarak tanımlanan (+)Tr1; (+)Tr3 ile (+)TR18 izolatlarında sırasıyla *S. aureus* ATCC 25923 ve *L. monocytogenes* ATCC 13932 patojenlerine karşı elde edilmiştir. *E. faecium* olarak tanımlanan (+)Tr1, (+)Tr2 ve (+)Tr3 nolu izolatlara ait HBE'lerin ise tüm patojen suşlara karşı aktivite sergilediği tespit edilmiştir. Rizosferden izole edilen ve *E. faecium* olarak tanımlanan (+)TR16 izolatu *L. monocytogenes* ATCC 13932 suşuna karşı yüksek aktivite sergilemesine rağmen *S. aureus* ATCC 25923 ile MRSA'ya karşı etki göstermemiştir. Çalışmanın bu bölümünde elde edilen verilere göre, en az 5 patojene karşı 9 mm ve üzeri (hassas) inhibisyon zon çapı oluşturan aerobik koşullarda kültüre edilen LAB izolatları olan (+)Tr1, (+)Tr2, (+)Tr3, (+)Tr4, (+)TR18 çalışmanın diğer aşamalarında kullanılmak

üzere seçilmiştir. (+)TR16 ise 3 patojene karşı 8 mm ve altında (duyarlı değil) inhibisyon etki gösterdiğinden bir sonraki aşamaya dahil edilememiştir.

Anaerobik koşullarda kültüre edilen 8 farklı izolata ait HBE'lerin antimikrobiyal aktivitesine ait inhibisyon zon çapları Tablo 8'de sunulmuştur.

**Tablo 8.** Anaerobik koşullarda kültüre edilen LAB izolatlarına ait HBE'leri patojenlere karşı oluşturdıkları inhibisyon zon çapları

|                              | İnhibisyon Zon Çapları (mm) |        |        |        |         |        |        |        |
|------------------------------|-----------------------------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|
|                              | -Tr1                        | -Tr3   | -Tr7   | -TR16  | -TR18   | -TR19  | -TR20  | -TR26  |
| <b>L.</b>                    |                             |        |        |        |         |        |        |        |
| <b><i>monocytogenes</i></b>  | 13±0.3                      | 12±0.5 | 13±0.3 | 16±0.7 | 17± 0.4 | 17±0.0 | -      | 19±0.5 |
| <b>ATCC 13932</b>            |                             |        |        |        |         |        |        |        |
| <b><i>S. aureus</i></b>      | 13±0.0                      | -      | -      | 10±0.3 | 11±0.0  | -      | -      | -      |
| <b>ATCC 25923</b>            |                             |        |        |        |         |        |        |        |
| <b><i>E. coli</i> O157</b>   | 11±0.3                      | 8±0.0  | 8±0.2  | 11±0.1 | 12±0.4  | 10±0.3 | 12±0.4 | 12±0.7 |
| <b>ATCC 43888</b>            |                             |        |        |        |         |        |        |        |
| <b><i>S. Enteritidis</i></b> | 11±0.1                      | 12±0.2 | 10±0.3 | 12±0.0 | 12±0.8  | -      | 11±0.2 | 10±0.3 |
| <b>NCTC 12694</b>            |                             |        |        |        |         |        |        |        |
| <b><i>B. subtilis</i></b>    | 11±0.4                      | 14±0.7 | 12±0.0 | 12±0.3 | 8± 0.4  | 11±0.6 | 10±0.1 | 13±0.1 |
| <b>ATCC 6633</b>             |                             |        |        |        |         |        |        |        |
| <b>MRSA ATCC</b>             | 10±0.1                      | -      | -      | -      | -       | -      | -      | 11±0.7 |
| <b>43300</b>                 |                             |        |        |        |         |        |        |        |
| <b><i>P. aeruginosa</i></b>  | 12±0.4                      | 12±0.1 | 11±0.2 | 10±0.4 | -       | 9±0.3  | -      | 11±0.3 |
| <b>ATCC 27853</b>            |                             |        |        |        |         |        |        |        |

+, aerobik ortamda gelişen, -, anaerobik ortamda gelişen, Tr; MRS besiyerinde gelişen, TR; M17 besiyerinde gelişen

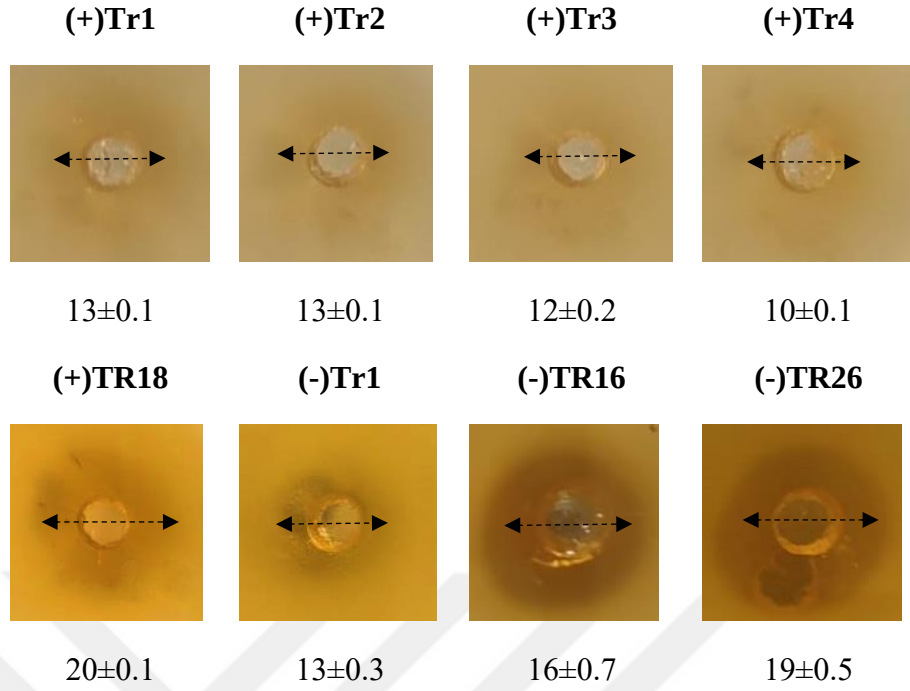
HBE'lere ait en yüksek aktivite trüf rizosferinden izole edilen ve *L. sakei* olarak tanımlanan (-)Tr26 izolatında *L. monocytogenes* ATCC 13932 patojenine karşı elde edilmiştir. *L. sakei* olarak tanımlanan (-)Tr1 nolu izolata ait HBE'nin ise tüm patojen suşlara karşı aktivite sergilediği tespit edilmiştir. Trüf mantarından izole edilen ve *E. faecium* olarak tanımlanan (-)TR19 izolatı, *L. monocytogenes* ATCC 13932 suşuna karşı yüksek aktivite sergilemesine rağmen *S. aureus* ATCC 25923, MRSA ve *S. Enteritidis* NCTC 12694 patojenlerine karşı etki göstermemiştir. Çalışmanın bu bölümünde elde edilen verilere göre, en az 5 patojene karşı 9 mm ve üzeri (hassas) inhibisyon aktivite sergileyen anaerobik koşullarda kültüre edilen LAB izolatları olan (-)Tr1, (-)TR16, (-)TR26 çalışmanın diğer aşamalarında kullanılmak üzere seçilmiştir. (-)Tr3, (-)Tr7, (-)

)TR18, (-)TR19 ve (-)TR20 en az 3 patojene karşı 8 mm ve altında (duyarlı değil) inhibisyon etki gösterdiğinden bir sonraki aşamaya dahil edilememiştir.

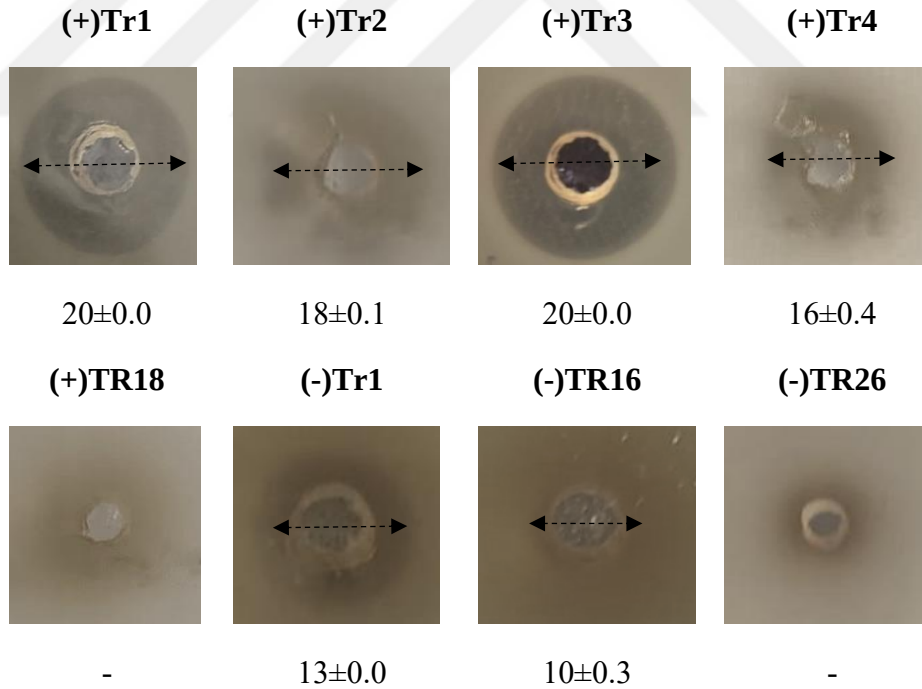
Antimikrobiyal aktivite çalışması kapsamında tüm analizler nötralize HBE'ler kullanılarak da tekrar edilmiştir. Elde edilen veriler neticesinde nötralize HBE'nin mevcut aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir. Negatif kontrol amacıyla kuyulara eklenen besiyeri ve steril distile su herhangi bir antimikrobiyal etki göstermemiştir.

*İn vitro* ve *in vivo* çalışma bulgularına göre, LAB suşlarının antimikrobiyal ilişkili ana mekanizmalarından biri de organik asit üretiminin neden olduğu pH düşürücü etki olarak açıklanmaktadır (Gill vd., 2001). Elde edilen veriler, izolatlara ait HBE'lerin sergilemiş oldukları etkinin asit üretiminden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Buna karşın, aktivite zon yapılarının belirginliği, inhibisyonun doğası hakkında bazı ipuçları vermektedir. Bakteriyosinlerin oluşturduğu inhibisyon zonları genellikle belirgin ve keskin sınırlarla ayrılır. Bu, bakteriyosinin hücre duvarı veya hücre zarı hedef alarak spesifik bir mekanizmayla etki ettiğini göstermektedir (Meade vd., 2020). Asidik ortamın sebep olduğu zonlar da belirgin olabilir, ancak genellikle zonun kenarlarında bir pH gradienti gözlemlenmektedir. Asidik ortamların neden olduğu inhibisyon zonları, pH gradienti nedeniyle inhibisyonun şiddeti azalabilir ve bu da daha geniş, fakat daha az belirgin zonlar oluşturabilir. Bu bağlamda sonuçlar incelendiğinde, bakteriyosinler protein yapıda oldukları için proteolitik enzimlerle (proteinaz K) muamele edildiklerinde etkilerini kaybetmeleri gerekmektedir. Fakat pH nötralizasyonunda mevcut aktivite devam etmediğinden dolayı inhibisyonun bakteriyosin kaynaklı olma olasılığı düşüktür. Ancak düşük konsantrasyonlarda veya kararsız bakteriyosinlerde daha difüz zonlar gözlemlenebilir. Bununla birlikte, bakteriyosinleri tespit etmek için daha ileri çalışmalarla bakteriyosin genlerinin moleküler tekniklerle karakterizasyonu yapılabilir.

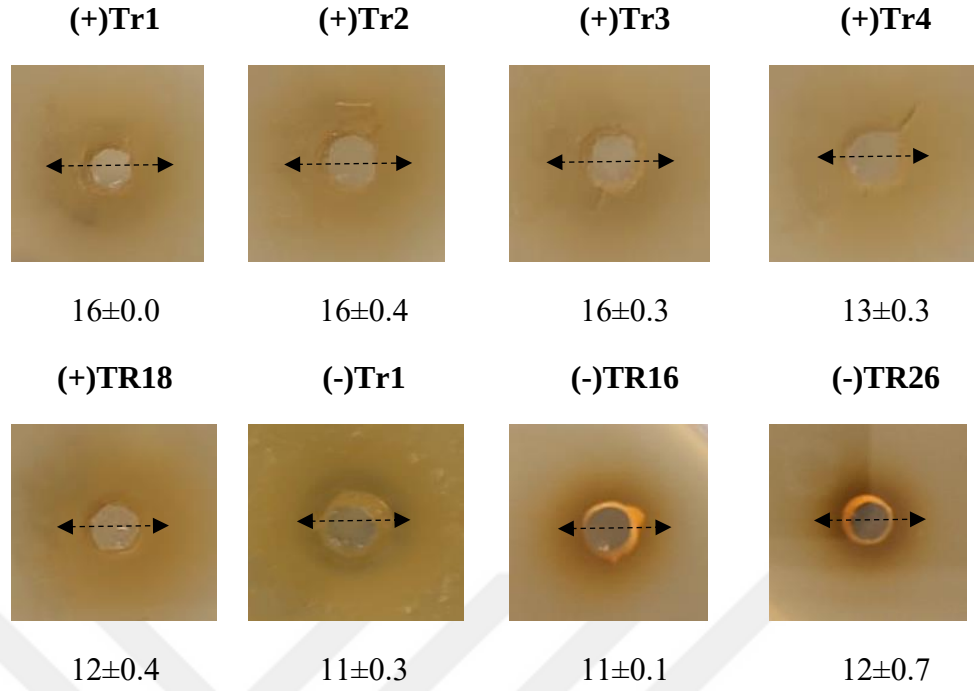
Antimikrobiyal aktivite sonucuna göre aerobik koşullarda kültüre edilen LAB izolatları (+)Tr1, (+)Tr2, (+)Tr3, (+)Tr4, (+)TR18; anaerobik koşullarda kültüre edilen LAB izolatları (-)Tr1, (-)TR16, (-)TR26 çalışmanın diğer aşamalarında kullanılmak üzere seçilmiştir. Seçilen izolatların HBE'lerinin inhibisyon zon çapları verilmiştir (Fotoğraf 17-23).



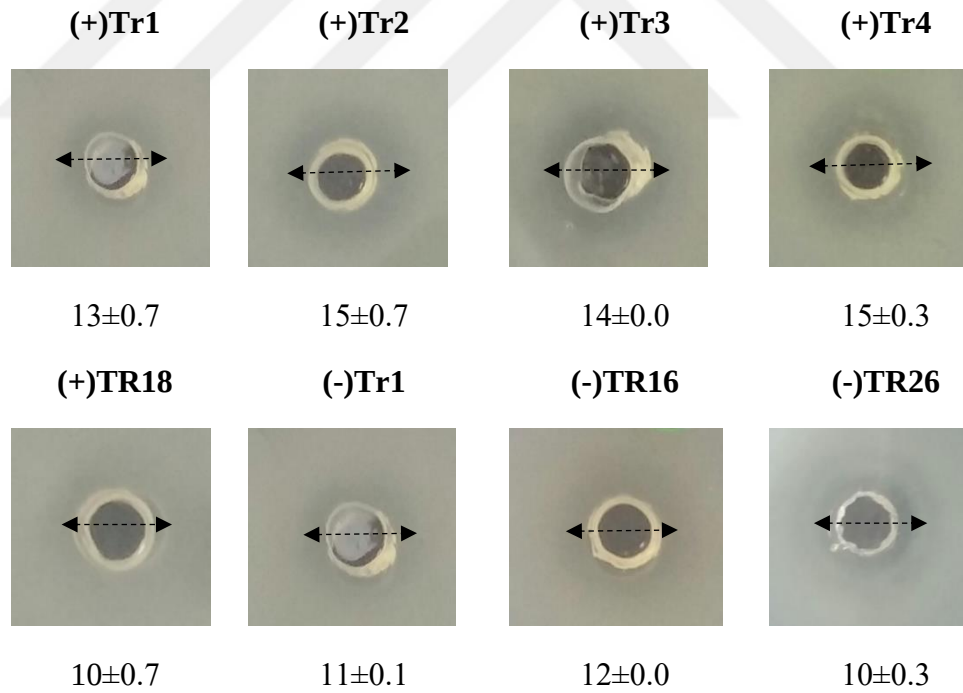
**Fotoğraf 17.** Seçilen izolatların HBE'lerinin *L. monocytogenes* ATCC 13932 patojenine karşı inhibisyon zon çapları (mm)



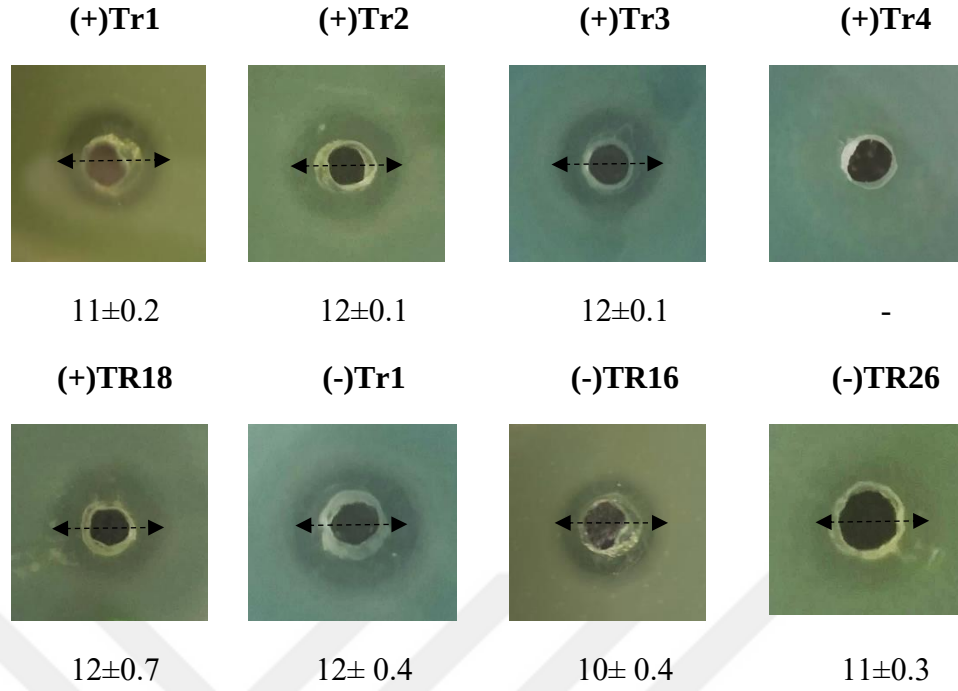
**Fotoğraf 18.** Seçilen izolatların HBE'lerinin *S. aureus* ATCC 25923 patojenine karşı inhibisyon zon çapları (mm)



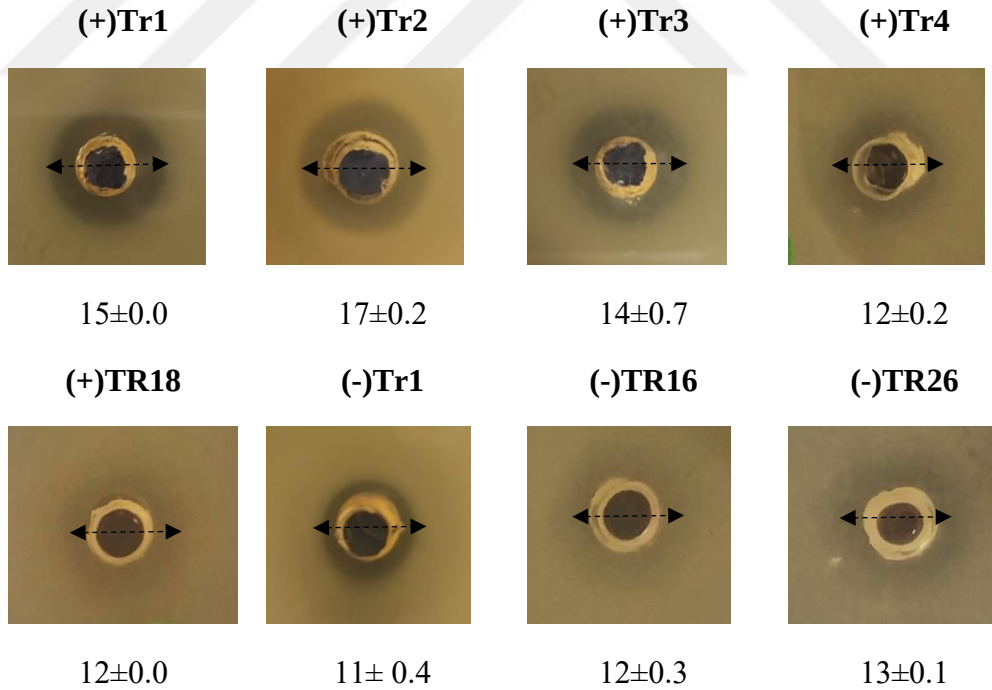
**Fotoğraf 19.** Seçilen izolatların HBE'lerinin *E. coli* O157 ATCC 43888 patojenine karşı inhibisyon zon çapları (mm)



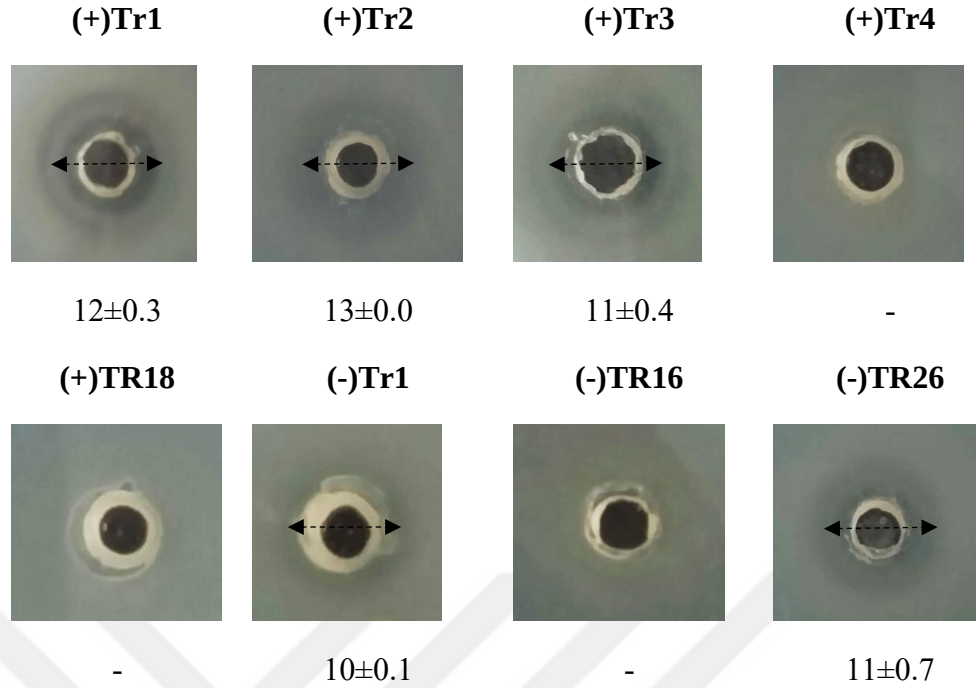
**Fotoğraf 20.** Seçilen izolatların HBE'lerinin *S. Enteritidis* NCTC 12694 patojenine karşı inhibisyon zon çapları (mm)



**Fotoğraf 21.** Seçilen izolatların HBE'lerinin *P. aeruginosa* ATCC 27853 patojenine karşı inhibisyon zon çapları (mm)



**Fotoğraf 22.** Seçilen izolatların HBE'lerinin *B. subtilis* ATCC 6633 patojenine karşı inhibisyon zon çapları (mm)



**Fotoğraf 23.** Seçilen izolatların HBE'lerinin MRSA ATCC 43300 patojenine karşı inhibisyon zon çapları (mm)

Martin ve arkadaşları (2023), yaptıkları çalışmada geleneksel kürlenmiş fermente sosislerden izole edilen *L. sakei* 205 suşunun HBE'lerinin bu ürünlerde yaygın olarak bulunan *L. monocytogenes* gibi önemli gıda kaynaklı patojenlerin gelişmesini engellediğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, bu suşun kuru kürlenmiş fermente sosislerin fermente aroması ve kalitesi üzerindeki etkisinin yanı sıra gıda kaynaklı patojenlere karşı inhibisyon özelliklerinin korunmasında değerlendirilmesini önermiştir (Martin, vd., 2023). Mevcut çalışma ile de *L. monocytogenes* ATCC 13932 suşuna karşı seçilen tüm *L. sakei* HBE'lerine ek olarak *E. faecium* HBE'leri de inhibisyon etki göstermiştir. Portella ve arkadaşları (2009), *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* ve *L. sakei* kültürlerinden elde edilen nötralize edilmemiş filtrelenmiş süpernatant besiyerinin üç patojenik bakteri suşuna (*E. coli*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus*) karşı antimikrobiyal etkisini araştırmışlardır. *L. acidophilus*'un nötralize edilmemiş süpernatantları kullanıldığında patojenlerin yalnızca %8'i hayatta kalırken, *L. rhamnosus* ve *L. sakei* için %19'luk bir sonuç elde edilmiştir. Mevcut çalışmada *L. sakei* (-Tr1) HBE'si tüm test edilen bakterileri etkilemiştir. Yine *L. sakei* (-TR26) *S. aureus* hariç tüm test bakterileri için inhibisyon etki

göstermiş ve  $19\pm0.5$  mm (çok hassas) ile en yüksek inhibisyon çapını *L. monocytogenes*'a karşı oluşturmuştur.

Yerel bitkilerden izole edilen LAB suşları tarafından üretilen HBE'lerin antibakteriyel özelliklerini değerlendirilen bir başka çalışmada, *B. cereus*, *B. subtilis*, *Cronobacter sakazakii*, *E. coli*, *S. typhimurium* ve *S. aureus* patojenlerine karşı inhibitör etki tespit edilmiştir. İnhibisyon zonlarının çapları  $6.8\pm0.60 - 15.8\pm0.35$  mm arasında ölçülmüştür (Qadi vd., 2023). Çalışmadan farklı olarak bu çalışmada seçilen LAB izolatlarının *B. subtilis*, *E. coli* ve *S. aureus* patojenlerine karşı oluşturulan inhibisyon zon çapları daha yüksek olup 10-20 mm (hassas-çok hassas) arasında değişmektedir.

*E. faecium* 2a-2M suşunun klinik *S. aureus* ATCC 25923 ve MRSA suşlarına karşı antibakteriyel etkisi incelenmiş, sırasıyla inhibisyon zon çapları 37.47 ve 0-8.51 mm olmuştur (Tetik vd., 2023). Aksine mevcut çalışmada, *S. aureus* ATCC 25923 karşı oluşan zon çapları 10-20mm ile değişmekle beraber diğer çalışmaya oranla düşüktür. Buna karşın çalışmaya kıyasla izole edilen üç *E. faecium* suşu (+Tr4, +TR18,-TR16) hariç diğer *E. faecium* suşları MRSA'ya karşı daha yüksek olan 10-12 mm (hassas) inhibisyon zon çapları belirlenmiştir. Bunun yanında *L. sakei* de MRSA'ya karşı 10-11 mm (hassas) çaplarında inhibisyon etki göstermiştir.

Yapılan bir çalışmada LAB suşlarına (*Lactobacillus paraplantarum* 11 (BT), *L. plantarum* 19, *Lactobacillus pentosus* 42, *Limosilactobacillus fermentum* 60, *L. pentosus* 93, and *Limosilactobacillus reuteri* 112) ait HBE'lerin *S. Enteritidis* suşuna karşı inhibisyon zon çapları  $16.6\pm0.50 - 20.6\pm0.5$  mm (çok hassas) arasında tespit edilmiştir (Kalhor vd., 2023). Elde edilen bu verilerin çalışmamız kapsamında elde edilen verilerden yüksek olduğu değerlendirilmiştir.

Asadzadegan ve arkadaşları (2023) bebek dışkılarından izole edilen ve probiyotik özelliği bulunan 7 farklı *Lactobacillus* suşlarına ait HBE'lerin antipsödomonal aktiviteye sahip olduğunu gözlemlemiştir. Probiyotik suşu L1, yanık yara enfeksiyonundan izole edilen *P. aeruginosa*'ya karşı en yüksek inhibitör etkiyi göstermiştir. Bu suş, kuyu difüzyon yönteminde patojen suşlara karşı ortalama 9.5 mm'lik bir inhibisyon çapı üretmiştir. En düşük inhibisyon alanı L7 suşunda 2.8 mm olarak kaydedilmiştir. Elde edilen bu verilerin çalışmamız kapsamında elde edilen verilerden düşük olduğu değerlendirilmiştir. Mevcut çalışmada ise (+)Tr2, (+)Tr3, (+)TR18 ve (-)Tr1 *P.*

*aeruginosa*'ya karşı en yüksek inhibitör etkiyi 12 mm'lik (hassas) inhibisyon çapıyla gösterirken en düşük inhibisyon zon çapını 10 mm (hassas) ile (-)TR16 oluşturmuştur.

Sonuç olarak, elde edilen veriler ve literatür bilgileri dikkate alındığında antimikrobiyal etkinin suşa özgü olarak değişkenlik sergilediği değerlendirilmiştir.

#### **4.5 Ekstraktların Antioksidan Aktiviteleri**

Farklı çözücüler kullanılarak hazırlanan trüf mantar ekstraktları ile trüf mantar ve rizosfer bölümlerinden izole edilen LAB suşlarına ait HBE'lerin antioksidan özelliğinin belirlenebilmesi amacıyla toplam fenolik ve flavonoid madde miktarı ile toplam antioksidan aktivite analizleri gerçekleştirilmiştir.

##### **4.5.1 Toplam Fenolik Madde Miktarı Sonuçları**

Farklı çözücüler kullanılarak hazırlanan trüf mantar ekstraktları ile trüf mantar ve rizosfer bölümlerinden izole edilen LAB suşlarına ait HBE'lerin fenolik madde miktarı GA standartı (Şekil 2) kullanılarak belirlenmiş ve mg/g GAE (gallik asit eşdeğeri) olarak sunulmuştur (Şekil 3-4).

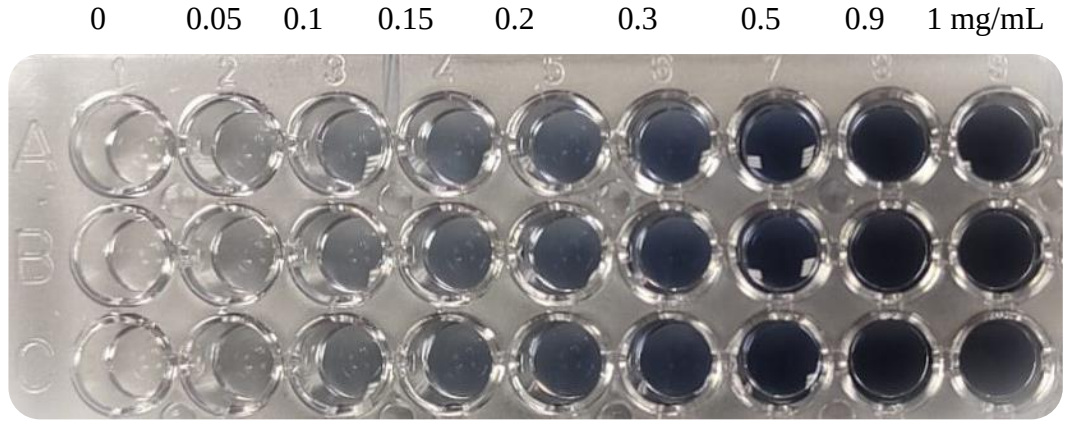
Elde edilen sonuçlar trüf mantar ekstraktları açısından değerlendirildiğinde antimikrobiyal aktivite sonuçlarına paralel bir şekilde en yüksek toplam fenolik madde miktarı etil asetat ve su ekstraktlarında tespit edildiği gözlemlenmiştir. Trüf mantarlarının antioksidan aktiviteleri, içermiş oldukları fenolikler, flavonoidler, tokoferoller, karotenoidler ve fitosteroller gibi ikincil antioksidan metabolitlerinden kaynaklanmaktadır (Lee vd., 2020). Serbest radikal yakalama olarak, fenolikler hidrojen veya elektron verici ajanlar olarak azaltıcı özellikleri nedeniyle etkili bir antioksidan olarak kullanılabilir. Villares ve arkadaşları (2012), *T. aestivum*, *T. indicum* ve *T. melanosporum*'un metanol ekstraktlarının fenolik içeriklerini sırasıyla 1.88 mg/g, 1.52 mg/g, ve 1.20 mg/g seviyelerinde tespit etmişlerdir. *T. aestivum*'un en yüksek fenolik ve ergosteril ester seviyeleri, bu 3 tür arasında en yüksek antioksidan güce sahip olmasıyla yakından ilişkilidir (Villares vd., 2012). Çalışmamız kapsamında metanol ekstraktlarından elde edilen veriler bu değerlerin üzerinde bulunmuştur. Beara ve arkadaşları (2014), gerçekleştirmiş oldukları bir çalışmada *T. aestivum* Vittad. ve *T. magnatum* Pico metanol ve su ekstraktlarını fenolik içerik açısından analiz etmişlerdir. *T. aestivum* ve *T. magnatum* ekstraktlarındaki toplam fenolik içerikleri 11.72 ile 18.68 mg GAE/g arasında tespit edilmiştir. Çöl trüf *T. nivea*'nın diğer fenolik açısından zengin meyvelerden daha yüksek oranda toplam fenolik içeriğe sahip olduğu rapor (100 g taze

ağırlık başına 1,39 g GAE) edilmiştir (Lee vd., 2020). Bu çalışmadan farklı olarak mevcut çalışma ile trüf mantarı etil asetat, su, etanol, metanol ve hekzan ekstraktlarının fenolik içerik sonucu sırasıyla 4.85, 4.75, 4.45, 4.16, 1.86 mg/g GAE olarak belirlenmiştir. *T. magnatum* Soxhlet ekstraksiyonuyla elde edilen su ekstraktında  $0.2 \pm 0.01$  ( $\mu\text{g/g}$  kuru ağırlık) gallik asit belirlenmiştir. Çalışmamız kapsamında su ekstraktlarından elde edilen veriler bu değerlerin üzerinde bulunmuştur. Tejedor-Calvo ve arkadaşları (2021) tarafından gerçekleştirilen farklı bir çalışmada ise taze trüflerin toplam fenolik asit seviyeleri, farklı türler arasında 22 ile 290 mg GAE/100 g arasında değişkenlik sergilemiştir. *T. magnatum*, en yüksek fenolik asit değerlerine sahip tür olarak tespit edilirken *T. melanosporum* ve *T. leptoderma* bu değerleri takip etmiştir (sırasıyla 138 ve 134 mg GAE/100 g). Buna karşılık, *T. indicum* türü en düşük seviyede fenolik içeriğine sahip tür olarak değerlendirilmiştir. *T. aestivum* toplam fenolik madde içeriği ise 67 mg GAE/100 g, gallik asit 2.92 mg GAE/100 g olarak rapor edilmiştir (Savini vd., 2017).

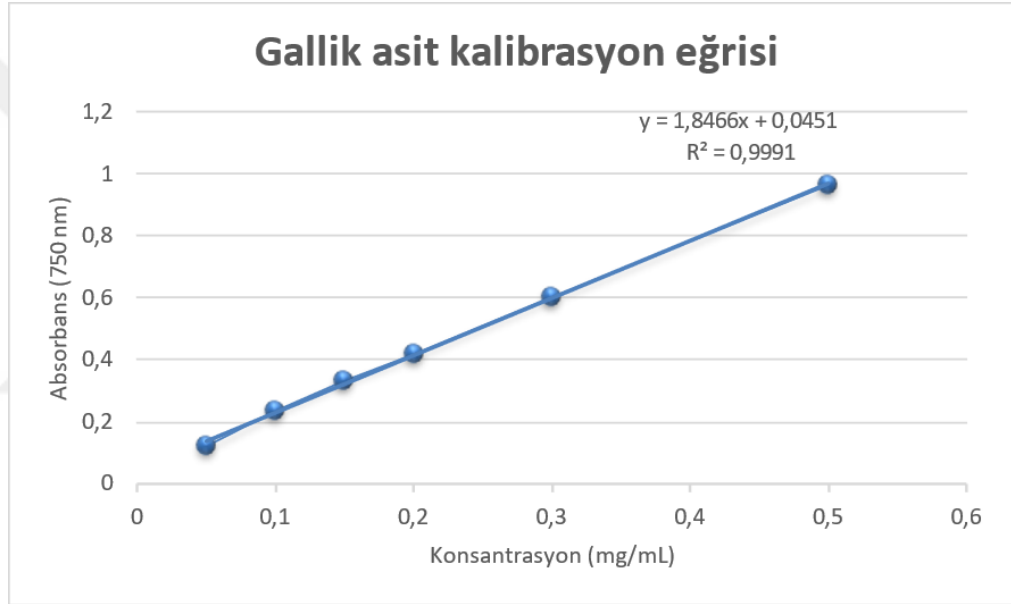
Elde edilen sonuçlara göre *L. sakei* olarak tanımlanan (-)Tr1 nolu izolata ait HBE'nin en yüksek miktarda toplam fenolik madde içerdiği, *E. faecium* olarak tanımlanan (+)Tr4 nolu izolata ait HBE'nin ise en düşük toplam fenolik madde miktarına sahip olduğu tespit edilmiştir. Noori ve arkadaşları (2023), *Lactiplantibacillus fermentum*, *L. plantarum*, *Lactiplantibacillus rhamnosus*, *L. casei* ve *Lactobacillus acidophilus* dahil olmak üzere 5 farklı LAB suşundan elde edilen postbiyotiklerin antioksidan özelliklerini karşılaştırmışlar ve *L. casei*'ye ait postbiyotiklerin güçlü antioksidan aktiviteyi sergilediğini rapor etmişlerdir.

Spektrofotometrik yöntemler neticesinde elde edilen bu çalışmanın sonuçlarına göre; aerobik koşullarda kültüre edilen bakterilerin hücre bağımsız ekstraktlarının fenolik içerik sonucu en yüksek 16.94 mg/g GAE olarak (+)Tr1 olurken; anaerobik koşullarda kültüre edilen bakterilerin hücre bağımsız ekstraktlarının fenolik içerik sonucu en yüksek 18.24 ile (-)Tr1 mg/g GAE olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda (+)Tr1 ve (-)Tr 1'in tüm patojenlere karşı yüksek antimikrobiyal özelliklere sahip olması, HBE'lerindeki fenolik bileşiklerin daha yüksek içeriğinden kaynaklanmış olabilir. Başka bir olasılık ise, önemli ölçüde daha yüksek toplam flavonoid içeriğinin bulunmasıdır (Hamad vd., 2020).

Arzu edilen etkileri ve doğal özellikleri nedeniyle LAB'ların postbiyotiklerinin gıda ve farmasötik endüstrilerinde antioksidan, antimikrobiyal ve koruyucu olarak kullanılması önerilmektedir.

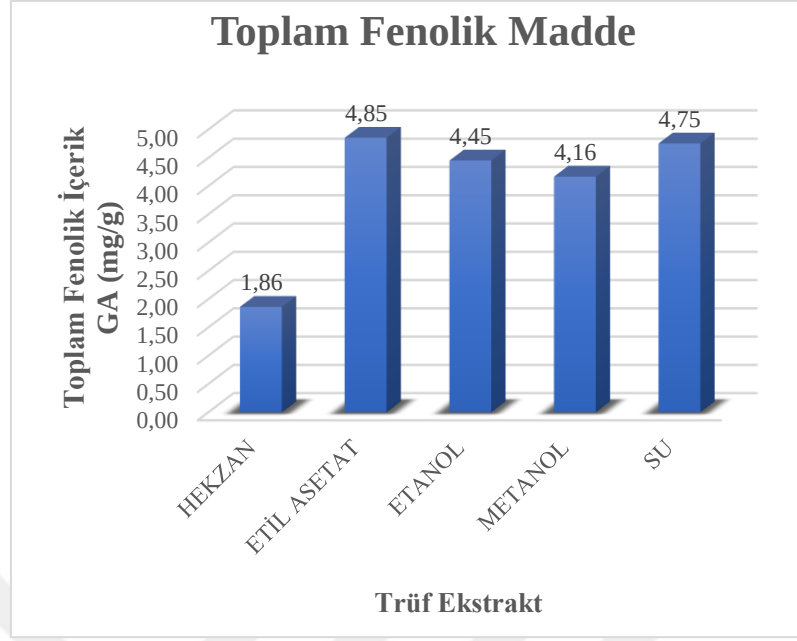


(a)

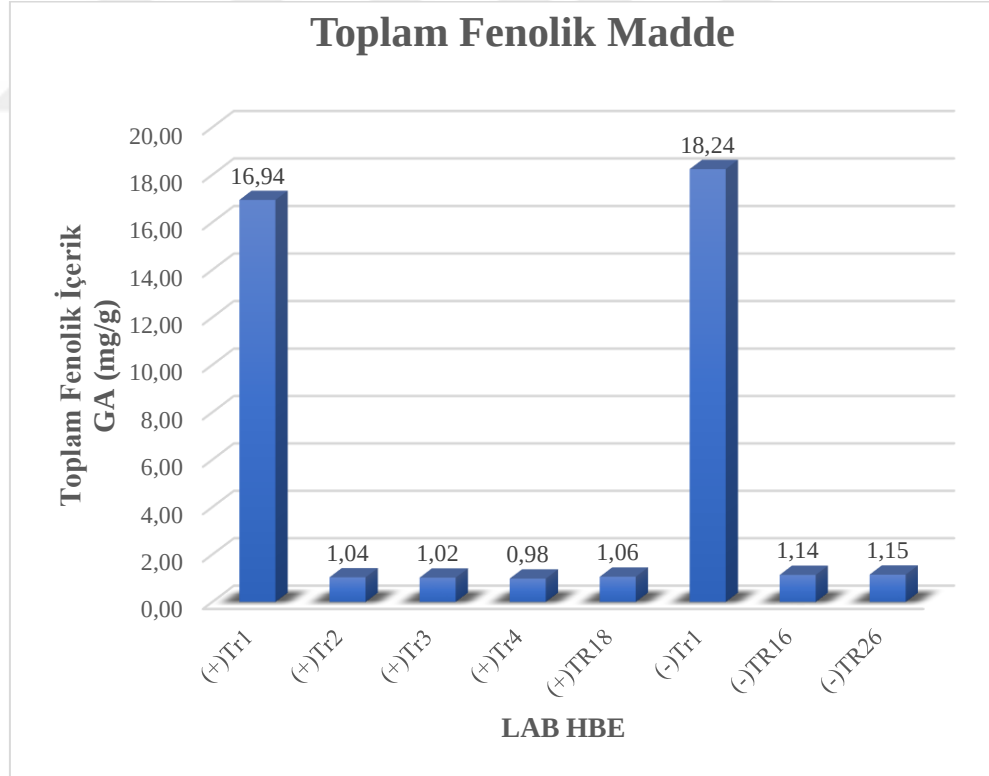


(b)

**Şekil 2.** (a) Toplam fenolik madde tayini için standartta reaksiyona bağlı meydana gelen renk değişimi, (b) Gallik asit kalibrasyon eğrisi



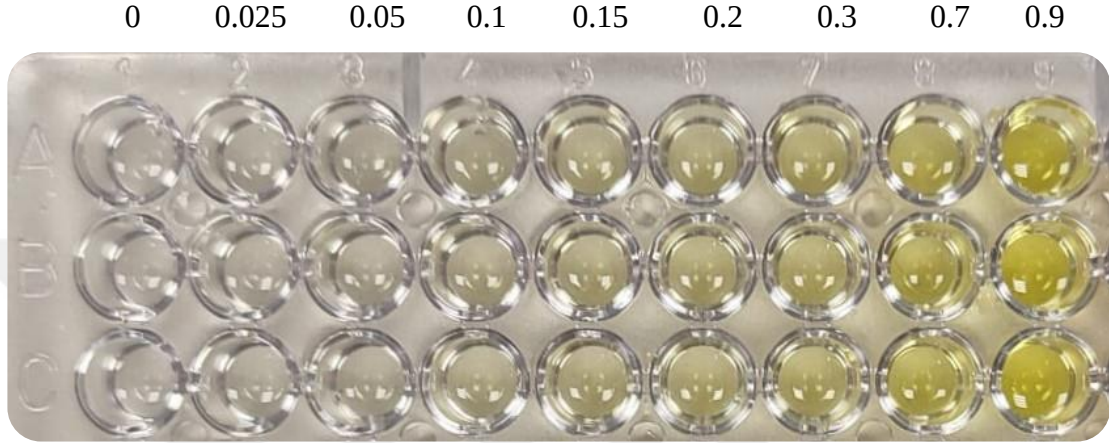
**Şekil 3.** Trüf mantarı ekstraktlarının mg/g gallik asit eşdeğeri cinsinden fenolik içerik sonuçları



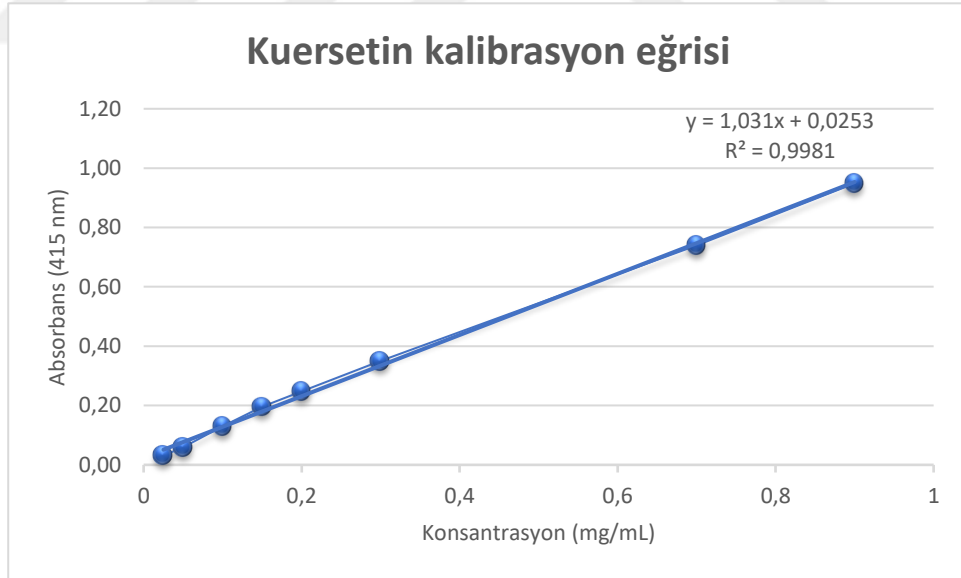
**Şekil 4.** Hücre bağımsız ekstraktlarının mg/g gallik asit eşdeğeri cinsinden fenolik içerik sonuçları

#### 4.5.2 Toplam Flavonoid Madde Miktarı Sonuçları

Farklı çözücüler kullanılarak hazırlanan trüf mantar ekstraktları ile trüf mantar ve rizosfer bölümlerinden izole edilen LAB suşlarına ait HBE'lerin flavonoid madde miktarı kuersetin standartı (Şekil 5) kullanılarak belirlenmiş ve mg/g QE (kuersetin eşdeğeri) olarak sunulmuştur (Şekil 6).

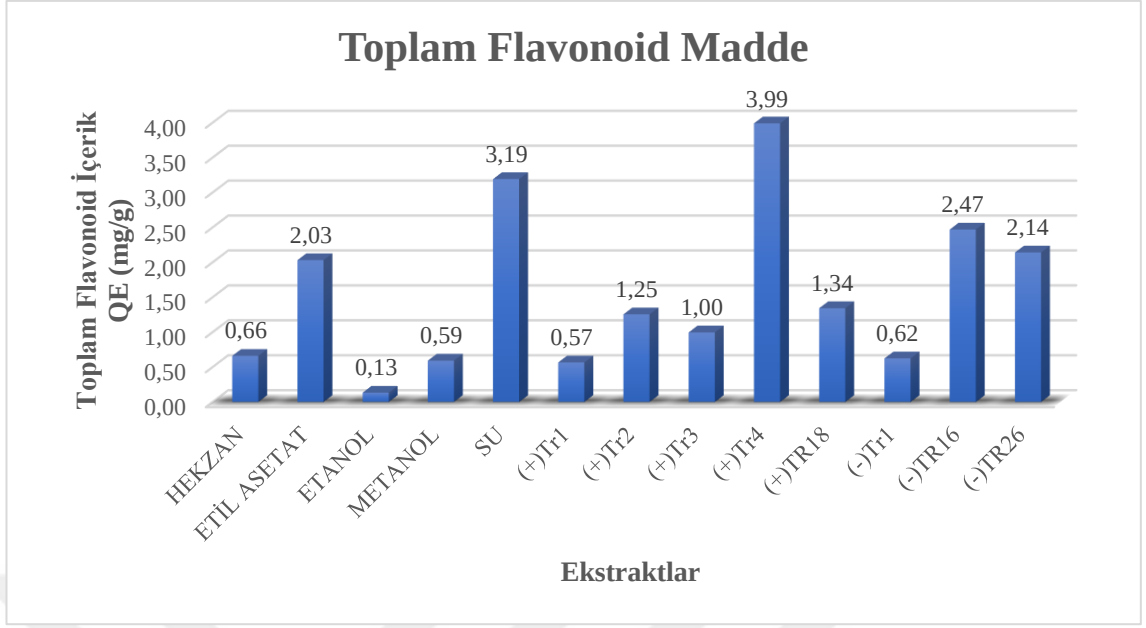


(a)



(b)

**Şekil 5.** (a) Toplam flavonoid madde miktar tayini için standartta reaksiyona bağlı meydana gelen renk değişimi, (b) Kuersetin kalibrasyon eğrisi



**Şekil 6.** Hücre bağımsız ekstraktlarının ve trüf mantarı ekstraktlarının mg/g kuersetin eşdeğeri cinsinden flavonoid içerik sonuçları

Elde edilen veriler mantar ekstraktları açısından değerlendirildiğinde en yüksek flavonoid madde içeriği su ile hazırlanan mantar ekstraktında tespit edilmişken en düşük aktiviteye etanol ekstraktında rastlanmıştır. Fenolik miktar sonuçlarına benzer olarak hekzan ekstraktında da düşük seviyelerde flavonoid madde içeriği tespit edilmiştir. Beara ve arkadaşları (2014) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada *T. aestivum* Vittad. ve *T. magnatum* Pico metanol ve su ekstraktlarının flavonoid madde miktarı incelenmiştir. Elde edilen veriler, *T. magnatum*'un metanol ekstrelerinde ve *T. aestivum*'un su ekstrelerinde yüksek miktarda flavonoid bulunduğunu göstermiştir. Ekstraktların flavonoid içerik sonucu 0.17-0.41 mg QE/g kuru ağırlık olarak değişkenlik sergilemiş olup mevcut verilerimizden düşük tespit edilmiştir. Ayrıca *T. aestivum* maserasyonla elde edilen su ekstraktı, Soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen su ekstraktı, maserasyonla elde edilen metanol ekstraktı, Soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen metanol ekstraktında herhangi bir kuersetin değeri belirlenememiştir. Buna karşın *T. aestivum* maserasyon ve Soxhlet ekstraksiyon yoluyla elde edilen metanol ekstraktında kateşin ve epikateşin tespit edilirken maserasyon ve Soxhlet ekstraksiyonu yoluyla elde edilen su ekstraktında kamfenol flavonoidi tespit edilmiştir (Beara vd., 2014). Öte yandan, *T. magnatum*'un

metanol ekstralarında ve *T. aestivum*'un su ekstralarında yüksek miktarda flavonoid bulunması, sırasıyla orta polar ile polar profil flavonoidlerinin varlığını göstermektedir.

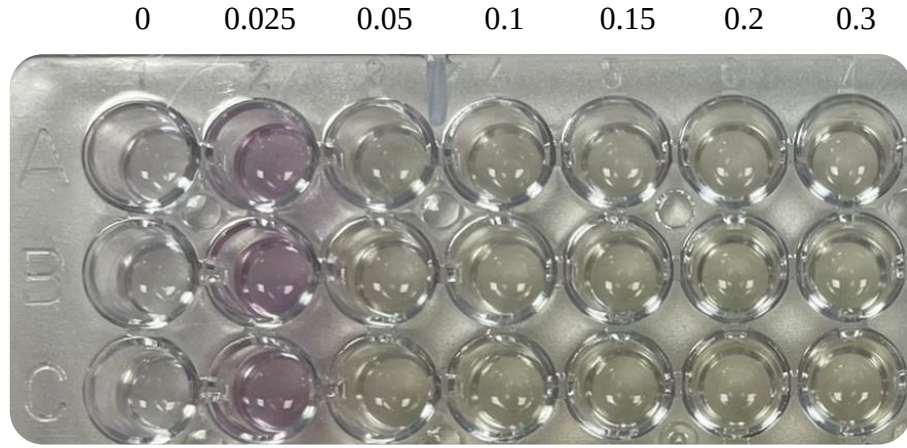
Mevcut çalışmada spektrofotometrik yöntemler neticesinde elde edilen sonuçlara göre; aerobik koşullarda kültüre edilen bakterilerin hücre bağımsız ekstraktlarının flavonoid içerik sonucu en yüksek 3.99 mg/g QE olarak (+)Tr4 olurken; anaerobik koşullarda kültüre edilen bakterilerin hücre bağımsız ekstraktlarının flavonoid içerik sonucu en yüksek 2.47 ile (-)TR16 olmuş, bunu (-)TR26, (-)Tr1 sırasıyla 2.14, 0.62 QE olarak takip etmiştir. En düşük flavonoid madde içeriği ise trüf mantarından izole edilen ve *E. faecium* olarak tanımlanan (+)Tr1 nolu izolata ait HBE'de gözlemlenmiştir. Sonuçlarımıza benzer olarak, Sornsenee ve arkadaşları (2021) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, *Lactobacillus* izolatlarının dondurularak kurutulmuş HBE'lerinin *in vitro*, antioksidan aktivite potansiyeli değerlendirilmiş ve *Lactobacillus*'un dondurularak kurutulmuş HBE'sinin toplam flavonoid içerik miktarları  $22.26 \pm 0.94$  µg/g QE ile  $56.60 \pm 1.34$  µg/g QE arasında tespit edilmiştir. *L. paracasei* T1304'ün HBE'si en yüksek toplam flavonoid değerini göstermiştir (56.60 µg/g QE), onu *L. paracasei* T0601'in HBE'si (56.03 µg /g QE) ve *L. paracasei* T0902'nin HBE'si (50.19 µg/g QE) takip etmiştir. Hazırlanan tüm *Lactobacillus* HBE'ler, fenol ve flavonoidler içerdiğinden ve DPPH radikal giderme testlerinde antioksidan aktivite göstermiştir. Bu araştırmalarla, fonksiyonel fermente gıdalar ve farmasötik ürünlerde postbiyotiklerin rolü aydınlatılmaktadır.

Başka bir çalışma ile postbiyotik ile ayrı olarak kullanılan kuersetinin etkisi araştırılmıştır. Toughik ve arkadaşları (2023), *Lactobacillus curvatus* B67 tarafından üretilen postbiyotik ile kuersetinin ayrı ve birlikte uygulamalarının *L. monocytogenes* ve *S. enterica* ser. Typhimurium'a karşı antimikrobiyal ve antibiyofilm etkinliğini araştırmıştır. Sonuç olarak, postbiyotik ve kuersetin, işlenmiş sosis ve et işleme yüzeylerinde (örneğin paslanmaz çelik ve kauçuk) patojen biyofilm hücrelerini etkili bir şekilde azaltmıştır. Ayrıca postbiyotik, farklı pH ve sıcaklık aralıklarında güçlü bir kalıcı antimikrobiyal etkinlik sergilemiştir. Bunun yanı sıra, postbiyotiğin kuersetin ile birleşimi patojen hücre içi metabolitlerin (örneğin, nükleik asitler ve proteinler) sızmasını artırmış ve hem canlı hem de cansız yüzeylerde patojen biyofilm oluşumunu engellemiştir. Bu nedenle, bu çalışma laktik asit bakterilerinden elde edilen postbiyotik

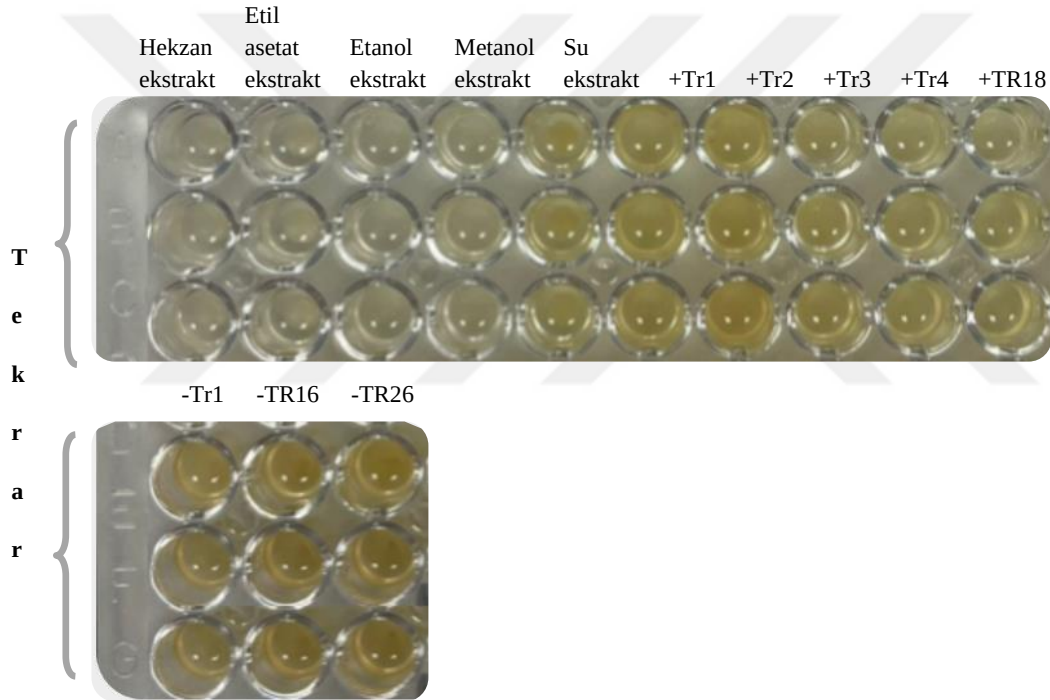
ve bitkisel kuersetinin et işleme endüstrisinde potansiyel alternatif biyokoruyucu ajanlar olarak kullanılabileceğini doğrulamıştır.

#### **4.5.3 DPPH Radikal Yakalama Aktivite Analiz Sonuçları**

DPPH radikal temizleme yöntemi, basitliği, hızı, hassasiyeti ve tekrarlanabilirliği nedeniyle diğer testlere kıyasla en yaygın kullanılan antioksidan yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir. Kullanılan yöntem hücrelerdeki bileşiklerin serbest radikalleri temizleme yeteneğini ölçen ve DPPH radikalının mor renginin azalmasıyla doğrudan ilişkili olan bir analizdir (Takatsuka vd., 2022). Antioksidan maddeler serbest, stabil ve mor renkli DPPH radikalını sarı renkli difenilpikrilhidrazine indirgeyebilmekte ve renk değişimi antioksidan aktivite ile ilişkilendirilmektedir (Elmastas vd., 2006). Bu bağlamda, toplam antioksidan aktivitenin belirlenebilmesi amacıyla 100 mg/mL konsantrasyonda trüf mantarı hekzan, etil asetat, etanol, metanol ve su ekstraktları ile 500 mg/mL konsantrasyonda HBE'lerinin DPPH radikalını giderici etkileri standartla kıyasla değerlendirmeye alınmıştır (Şekil 7). Renk değişimi dikkate alınarak gerçekleştirilen % antioksidan aktivite sonuçları dikkate alındığında ekstraktlara ait tüm örneklerin %100 oranında radikal yakalama etkisi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 8).

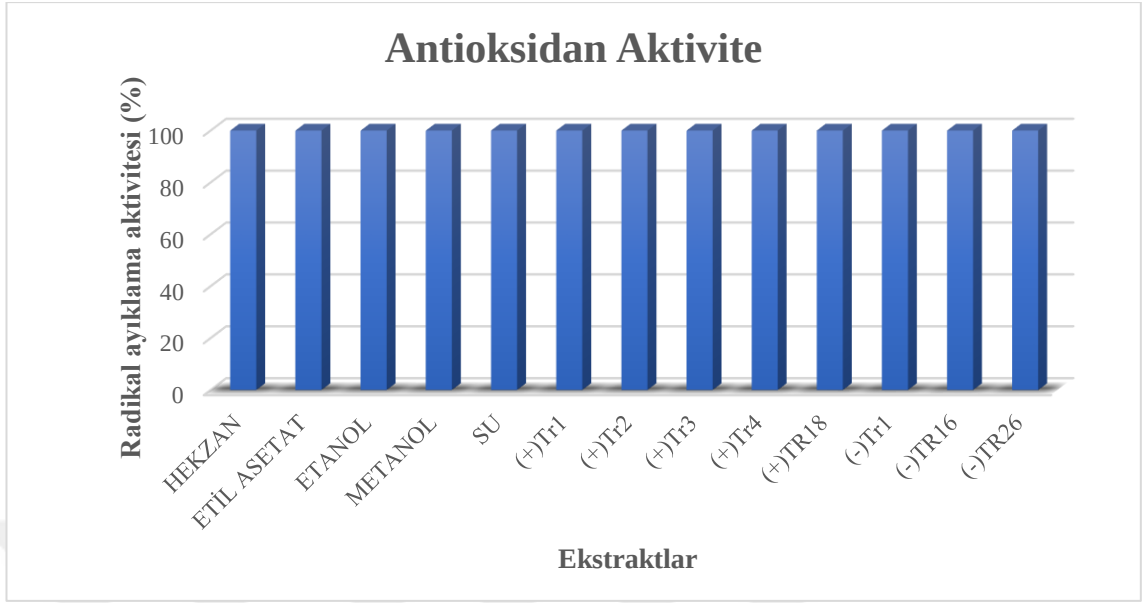


(a)



(b)

**Şekil 7.** (a) DPPH radikal yakalama aktivite tayini için standartta reaksiyona bağlı meydana gelen renk değişimi; (b) Antioksidan aktivite tayini, reaksiyona bağlı meydana gelen mor rengin şiddeti



**Şekil 8.** Ekstraktların % antioksidan aktivitesi

DPPH radikal temizleme yöntemi, basitliği, hızı, hassasiyeti ve tekrarlanabilirliği nedeniyle diğer testlere kıyasla en yaygın kullanılan antioksidan yöntemlerden biridir. DPPH radikali, hücrelerdeki bileşiklerin serbest radikalleri temizleme yeteneğini ölçer; bu yetenek DPPH radikalının mor renginin azalmasıyla doğrudan ilişkilidir ve bu da çözeltinin artan antioksidan aktivitesiyle ilişkilidir (Takatsuka vd., 2022). Antioksidanlar, serbest, stabil ve mor renkli DPPH radikalını, bir kolorimetre kullanılarak sarı renkli difenilpikrilhidrazine indirgeyebilir (Elmastas vd., 2006).

Kıvrak (2015) tarafından gerçekleştirilen ve Türkiye’den toplanan *T. claveryi* mantarının etil asetat ekstraktlarının analiz edildiği bir çalışmada yüksek DPPH aktivitesi tespit edilmiştir. Saddiq ve Danial (2012) benzer bulgular elde etmiş ve *T. claveryi* ekstraktının %72.6 DPPH aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir. Öte yandan, Akyüz (2013) ise *T. boudieri*’nin %22.24 oranında DPPH aktivitesi sergilediğini rapor etmiştir. Yan ve arkadaşları (2017), *T. latisporum*, *T. subglobosum* ve *T. pseudohimalayense*’nin antioksidan aktivitelerini analiz etmişler ve özellikle fenolik bileşikler açısından daha zengin olan *T. latisporum* ve *T. pseudohimalayens* mantar ekstraktlarının *T. subglobosum*’dan çok daha güçlü bir antioksidan potansiyele sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Doğan ve Aydın (2013), *T. boudieri*’nin radikal giderici etkisinin, bu trüf mantarında bulunan baskın fenolik bileşik olan kateşin ile ilişkili olduğunu ortaya

koymuştur. Mevcut alışma ile kullanılan dozlarda (500 mg/mL HBE, 100 mg/mL trüf mantarı hekzan, etil asetat, etanol, metanol ve su ekstraktları) DPPH radikalini giderici etkileri %100 olarak tespit edilmiştir. Bu durum çalışmayla paralel olarak doza bağımlı olarak radikal yakalama aktivitesinde değişiklik gösterecektir.

Dahham ve arkadaşları (2018), *T. claveryi*'nin tüm ekstraksiyonlarının önemli miktarda radikal yakalama aktivitesi gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bununla birlikte, en güçlü DPPH radikal yakalama aktivitesi etanol ekstraksiyonunda elde edilmiştir. Bunu sırasıyla, su ve metanol ekstraktları takip etmiştir. En düşük DPPH aktivitesi ise etil asetat ve hekzan ekstraktlarında belirlenmiştir. Bu veriler, DPPH aktivitesinin ekstraksiyon çözücüleri tarafından büyük ölçüde etkilendiğini göstermiştir. Sonuçların aksine, mevcut çalışmada farklı çözücülerle çözdüğümüz mantar ekstratlarında DPPH radikalini giderici etkilerinde farklılık görülmemiştir. Bunun nedeni deneyde kullanılan konsantrasyonun radikal giderici etkisinin fazla olmasından kaynaklanabilmektedir.

Al-Hazmi ve Naguib (2024), LAB suşlarının DPPH radikal yakalama aktivitesini, kontrol olarak kullanılan askorbik asit ile karşılaştırmalı olarak analiz etmişlerdir. DPPH radikal yakalama aktivitesi en düşük oranda *S. laevolacticus* suşunda yaklaşık olarak %47 ile, en yüksek olarak da *L. lactis*'te yaklaşık %58 olarak tespit edilmiştir. De Marco ve arkadaşları (2018) *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. lactis*, *L. reuteri* ve *Saccharomyces boulardii* HBE'lerinin doza bağımlı radikal yakalama aktivitesi sergilediğini tespit etmişlerdir. En yüksek antioksidan aktivite *L. casei* suşuna ait HBE'lerde gözlemlenmiştir (%20.8). Ayrıca, süpernatantların antioksidan aktivitesi sağlıklı insan donörlerinin polimorfonükleer nötrofillerinde test edilmiş *L. acidophilus*, *L. casei*, ve *L. lactis* süpernatantları, nötrofil hidrojen peroksit üretimini konsantrasyona bağlı bir şekilde azaltarak, DPPH radikal yakalama testinden elde edilen verileri doğrulamıştır. Ayrıca, süpernatantlar insan makrofajları tarafından IL-1β, IL-6, TNF-α ve IL-10 üretimini farklı şekilde modüle etmiş, özellikle belirgin bir anti-inflamatuar aktivite göstermiştir. Antioksidan bileşikler arasında fenolikler, terpenoidler ve polisakkaritler aynı zamanda anti-inflamatuar özelliklere sahiptir. Oksidatif stres genellikle inflamatuvar bozukluklarla ilişkilendirilir (Lee vd., 2020).

Çalışmanın bu bölümünde elde edilen verilere göre, tüm trüf mantar ekstraktları ve LAB HBE'leri; (+)Tr1, (+)Tr2, (+)Tr3, (+)Tr4, (+)TR18, (-)Tr1, (-)TR16, (-)TR26 bir sonraki aşamaya dahil edilmiştir.

#### 4.6 Ekstraktların Antikanser Etkileri

Dünyada en yaygın kanser türlerinden biri olan kolon kanseri, kanserle ilişkili ölümler sıralamasında 5. sırada yer almaktadır. İstatistiklere göre, her yıl dünya genelinde kolon kanserinde 1.2 milyon yeni vaka ve 600.000 ölüm rapor edilmektedir (Tao vd., 2024). Son 25 yılda 50 yaşın altındaki genç yetişkinlerde kolorektal kanser insidansı ve mortalitesi artış eğilimindedir (Ahmed, 2020). Modern beslenme alışkanlıkları ve yaşam tarzları, yüksek et tüketimi ve aşırı alkol kullanımı ile birlikte sınırlı fiziksel aktivite, dünya genelinde kolon kanserinin artan ölüm oranına neden olan temel risk faktörleri arasında yer almaktadır (Kuppusamy vd., 2014). Bağırsak mikrobiyota bileşimi, tümör mikroçevresini ve bağışıklık sistemiyle etkileşimini etkileyebilmekte ve bu da kolon kanseri tedavi yaklaşımları olarak kullanılabileceklerine yönelik umut vaad etmektedir (Roy ve Singh, 2024). Son zamanlarda, birçok çalışma geleneksel tıbbın muhtemelen tümör mikroçevresini yeniden şekillendirme yoluyla bağırsak mikrobiyotasını düzenleyerek antitümör ilaçların etkinliğini güvenli ve etkili bir şekilde artırabileceğini göstermiştir (Li vd., 2023). Bu gerçeği tanımlamak için, mantar ya da laktik asit bakterilerinin kanser tedavisindeki işlevini artırmak için farklı mekanizmalar ve yaklaşımlar denenmektedir (Roy ve Singh, 2024). Sonuç olarak, bağırsak kanseri için yeni ve çevre dostu ilaç tedavileri geliştirmeye yönelik çalışmalara halen ihtiyaç duyulmaktadır (Kuppusamy vd., 2014).

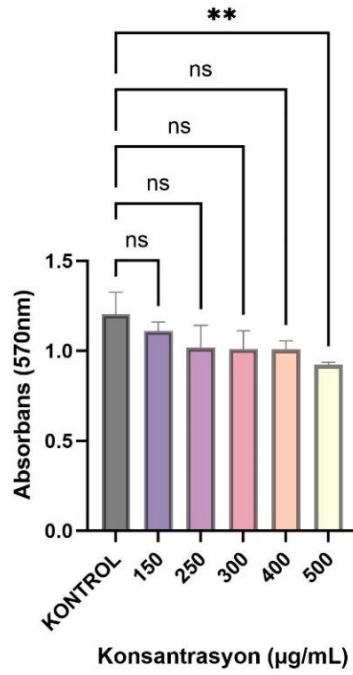
Karaciğer, yabancı maddelerin, ilaçların ve oksidatif stresin toksisitesi için temel bir yer olmasının yanı sıra, potansiyel olarak antioksidan veya diğer biyolojik olarak aktif maddelerin metabolik aktifleştirilmesi veya inaktivasyonu için de önemli bir organdır (Jaeschke vd., 2002). Hepatoselüler karsinom olarak da bilinen birincil karaciğer kanseri, dünyada en yaygın görülen 5. kanser türü ve kanser ölümlerinin 3. önde gelen nedeni olarak rapor edilmektedir (Bray vd., 2018). Karaciğer kanseri, oksidatif stres ve inflamasyon ortamında meydana gelmektedir. Patogenezi sitokinlerin, kemokinlerin üretimi, reaktif oksijen ve nitrojen gibi serbest radikallerin oluşumu, viral enfeksiyonlar, hepatit, karaciğer sirozu ve hepatokarsinojenler tarafından temsil edilmektedir. Ancak, klinikte onaylı ilaçların kullanımı, düşük sağ kalım oranı ve hematolojik toksisite de dahil olmak üzere birçok olumsuz etki ile sonuçlanmaktadır (Bhullar vd., 2018). Bu nedenle, klinik ve deneysel onkoloji için alternatif kanserle mücadele stratejilerine olan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır.

HT-29, Hep40 ve HaCat hücrelerinin canlılığı farklı çözücüler kullanılarak hazırlanan trüf mantar ekstraktları ile trüf mantar ve rizosfer bölümlerinden izole edilen LAB suşlarına ait HBE'lerin değişen konsantrasyonlarıyla 48 saat inkübasyonundan sonra 2D kültür sisteminde antikanser etkileri MTT analizi ile belirlenmiştir. Sonuçlar ortalama  $\pm$ SD olarak ifade edilmiştir. Gruplar arasındaki farklar (kontrol hücrelerine kıyasla) GraphPad Prism6 kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile karşılaştırılmış ve  $p < 0.05$ 'te anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Tüm ekstraktların HaCat hücre hattı üzerinde kontrole kıyasla istatistiksel olarak bir etki görülmemiştir.

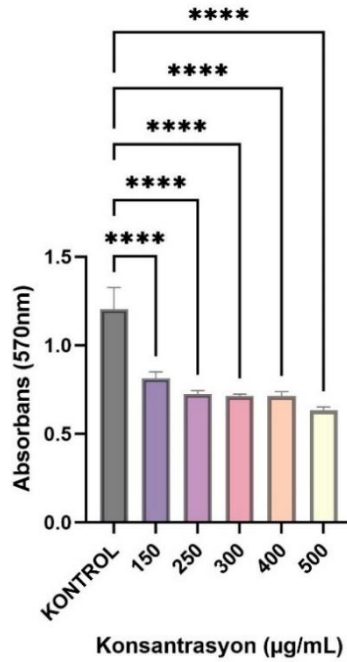
*T. aestivum* ekstraktlarının HT-29 üzerindeki etkisi 150 ile 500  $\mu$ g/mL arasında değişen 5 seri konsantrasyonda araştırılmıştır. Sonuçlar aşağıda gösterilmiştir (Şekil 9-13).

### HT-29 - Hekzan Ekstrakt



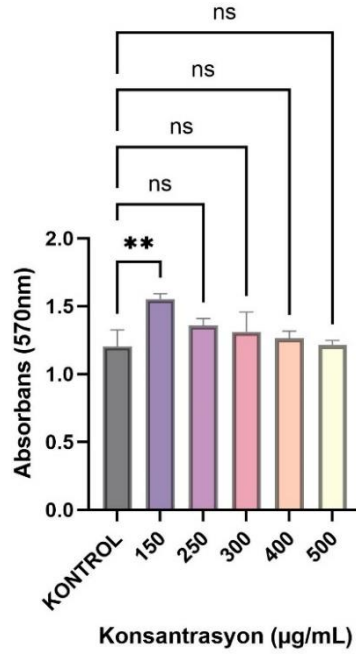
**Şekil 9.** *T. aestivum* hekzan ekstraktının HT-29 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns  $p \geq 0.05$  (anlamlı değil); \*\*  $p < 0.01$  (yüksek düzeyde anlamlı))

### HT-29 - Etil Asetat Ekstrakt



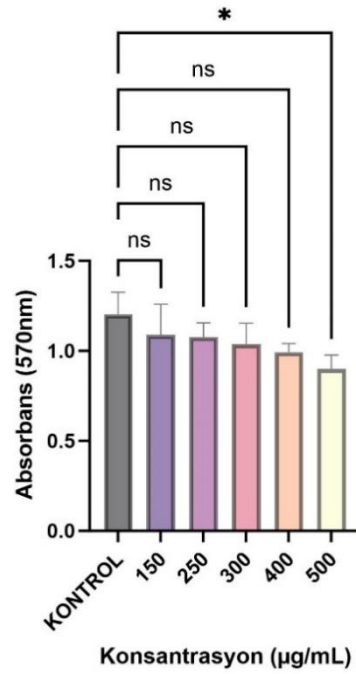
**Şekil 10.** *T. aestivum* etil asetat ekstraktının HT-29 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (\*\*\*\*  $p < 0.0001$  (son derece yüksek düzeyde anlamlı))

#### HT-29 - Etanol Ekstrakt

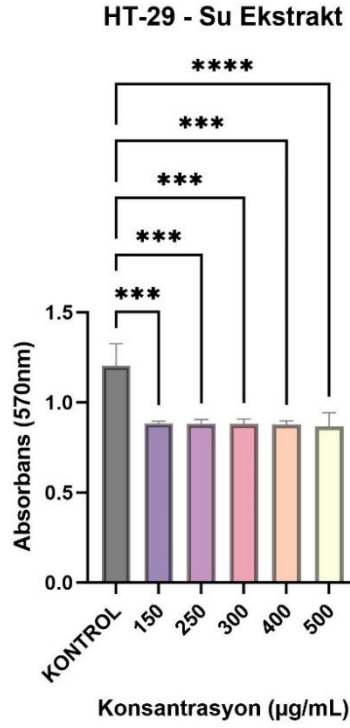


Şekil 11. *T. aestivum* etanol ekstraktının HT-29 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns  $p \geq 0.05$  (anlamalı değil); \*\*  $p < 0.01$  (yüksek düzeyde anlamalı))

#### HT-29 - Metanol Ekstrakt

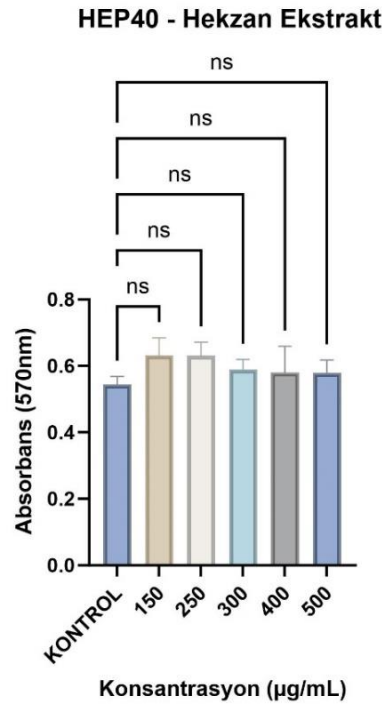


Şekil 12. *T. aestivum* metanol ekstraktının HT-29 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns  $p \geq 0.05$  (anlamalı değil); \*  $p < 0.05$  (anlamalı))

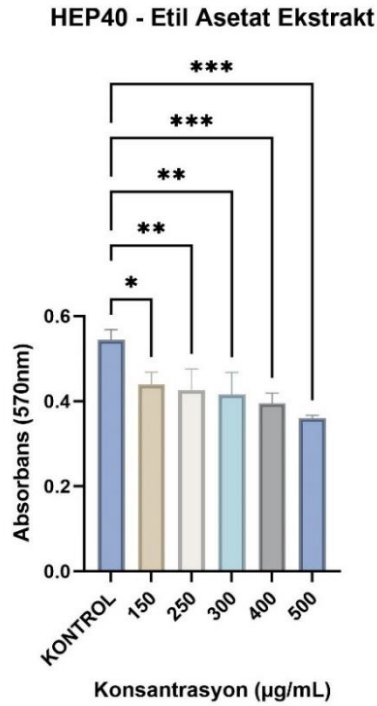


**Şekil 13.** *T. aestivum* su ekstraktının HT-29 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (\*\*\*)  $p < 0.001$  (çok yüksek düzeyde anlamlı); \*\*\*\*  $p < 0.0001$  (son derece yüksek düzeyde anlamlı))

*T. aestivum* ekstraktlarının Hep40 üzerindeki etkisi 150 ile 500 µg/mL arasında değişen 5 seri konsantrasyonda araştırılmıştır. Sonuçlar aşağıda gösterilmiştir (Şekil 14-18).

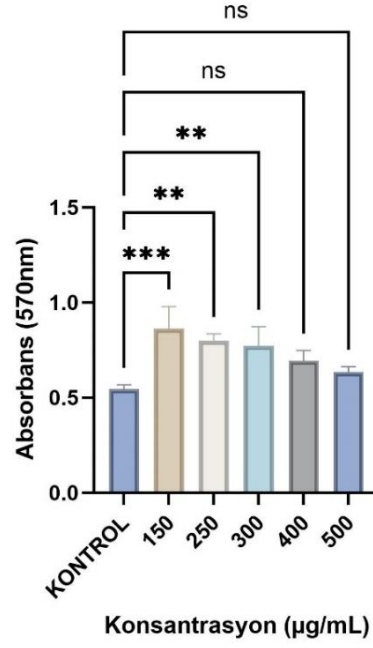


**Şekil 14.** *T. aestivum* hekzan ekstraktının Hep40 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns  $p \geq 0.05$  (anlamlı değil))



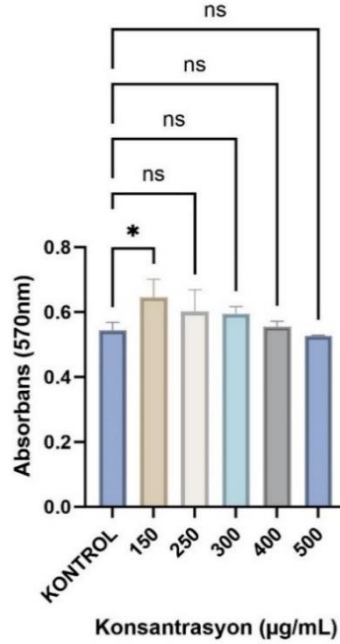
**Şekil 15.** *T. aestivum* etil asetat ekstraktının Hep40 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (\*  $p < 0.05$  (anlamlı); \*\*  $p < 0.01$  (yüksek düzeyde anlamlı); \*\*\*  $p < 0.001$  (çok yüksek düzeyde))

#### HEP40 - Etanol Ekstrakt

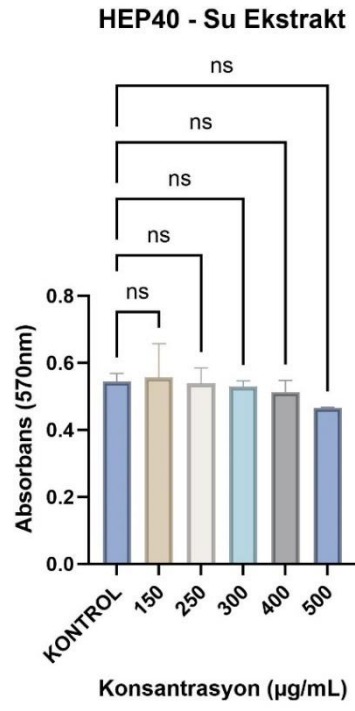


**Şekil 16.** *T. aestivum* etanol ekstraktının Hep40 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns  $p \geq 0.05$  (anlamlı değil); \*\*  $p < 0.01$  (yüksek düzeyde anlamlı); \*\*\*  $p < 0.001$  (çok yüksek düzeyde))

#### HEP40 - Metanol Ekstrakt



**Şekil 17.** *T. aestivum* metanol ekstraktının Hep40 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns  $p \geq 0.05$  (anlamlı değil); \*  $p < 0.05$  (anlamlı))



**Şekil 18.** *T. aestivum* su ekstraktının Hep40 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns  $p \geq 0.05$  (anlamlı değil))

*T. aestivum* ekstraksiyonlarının 2 tip kanser hücre (HT-29, Hep40) çoğalması inhibisyonunun değerleri Tablo 9’da verilmiştir.

**Tablo 9.** *T. aestivum* ekstraktlarının sitotoksik aktiviteleri

| <i>T. aestivum</i> ekstraktının hücre çoğalması inhibisyonunun değerleri |                 |                      |                 |                  |             |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------------|----------------------|-----------------|------------------|-------------|
| Hücre                                                                    | Hekzan ekstrakt | Etil asetat ekstrakt | Etanol ekstrakt | Metanol ekstrakt | Su ekstrakt |
| HT-29                                                                    | 500±5.3**       | 150±6.3****          | -               | 500±4.8*         | 150±6.5***  |
| Hep40                                                                    | -               | 150±5.2*             | -               | -                | -           |

Sonuçlar, üç bağımsız tekrarın ortalaması olarak ifade edilir.

\* İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi ( $p<0.05$ )

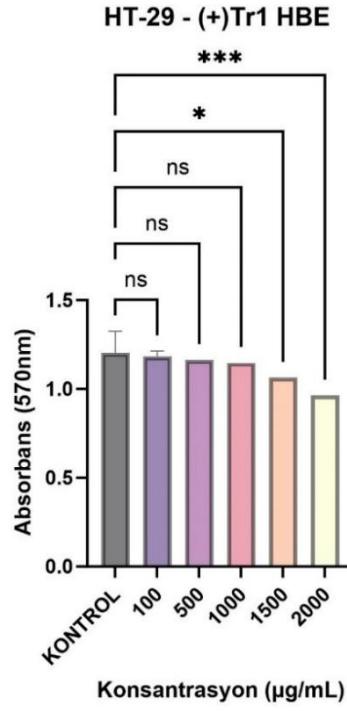
Sonuç, etil asetat ve su ekstraksiyonlarının 5 seri konsantrasyonda önemli ölçüde ( $p<0.05$ ) insan kolon kanseri hücre hattını (HT-29) inhibe ettiğini, etil asetat ekstraksiyonunun 500±5.2 µg/mL değerinin güçlü ekstraktlar olduğunu göstermiştir. Su ekstraksiyonunun en düşük konsantrasyonda (150 µg/mL) HT-29 hücre hattı üzerinde etkili olduğu gözlemlenmiştir. Hekzan ve metanol ekstraksiyonlarında sadece 500 µg/mL değeri sitotoksikite göstermiştir. Buna karşın etanol ekstraksiyonu HT-29 hücre hattı üzerinde inhibisyon etki göstermemiştir. Gıda ve ilaç uygulamalarında kullanılan ekstraktların güvenli ve toksik olmaması önemlidir. Bu nedenle su ekstresi, bu tür uygulamalarda kullanılmak üzere daha güvenli bir seçenektir.

Öte yandan etil asetat ekstraktı insan karaciğer kanseri (Hep40) hücre hattının hücre büyümesini sırasıyla 150, 250, 300, 400, 500 µg/mL değerleriyle inhibe etmiştir. Bununla birlikte hekzan, etanol, metanol ve su ekstraksiyonları Hep 40’a karşı sitotoksikite göstermemiştir. Trüf mantarı su ekstresinin Hep40 üzerinde herhangi bir sitotoksik etkisinin bulunmaması, etil asetat ekstresinin ise hem HT-29 hem de Hep40 üzerindeki inhibisyon etkilerinden dolayı su ekstraktına göre tercih edilme sebebi olmuştur.

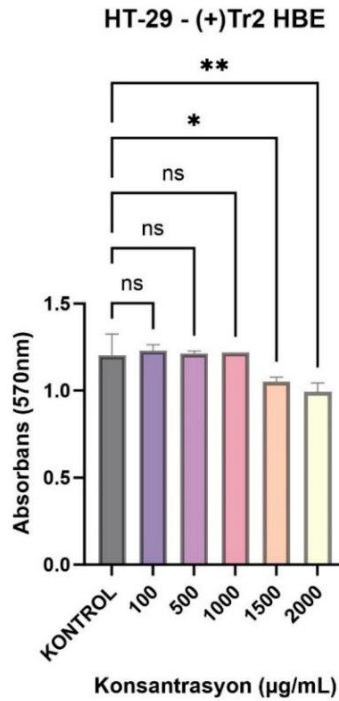
Kontrole kıyasla etil asetat ekstraktı (500 µg/mL) ile muamele edilen kuyulardaki HT-29 hücrelerinde, canlılıkta %47 oranında azalma olduğu tespit edilmiştir. Kontrole kıyasla etil asetat ekstraktı (500 µg/mL) ile muamele edilen kuyulardaki Hep40 hücrelerinde, canlılıkta %34 oranında azalma olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, test edilen hücrelerin çoğuna karşı en güçlü inhibisyonu gösteren *T. aestivum*’un etil asetat ekstraktı olmuştur.

*T. aestivum* rizosfer örneklerinden izole edilen bakterilerin hücre bağımsız ekstraktlarının HT-29 üzerindeki etkisi 100 ile 2000 µg/mL arasında değişen 5 seri konsantrasyonda araştırılmıştır. Sonuçlar aşağıda gösterilmiştir (Şekil 19-26).

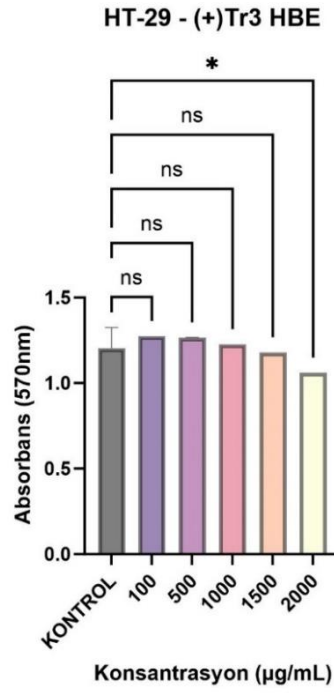




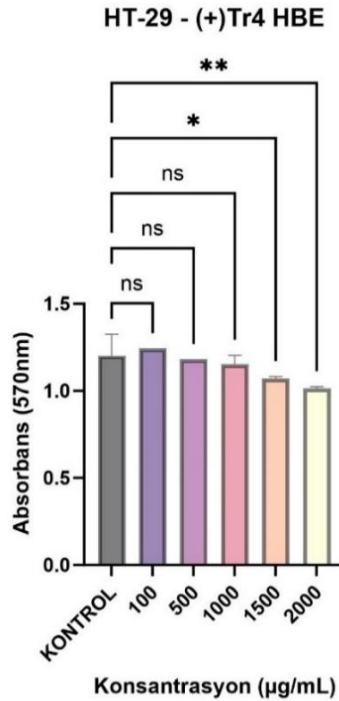
**Şekil 19.** (+)Tr 1 hücre bağımsız ekstraktının HT-29 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns  $p \geq 0.05$  (anlamlı değil); \*  $p < 0.05$  (anlamlı); \*\*\*  $p < 0.001$  (çok yüksek düzeyde))



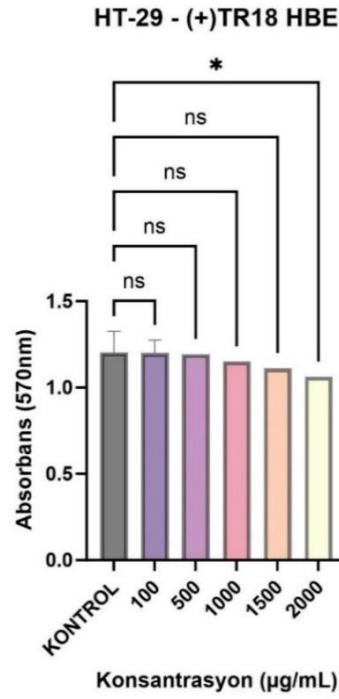
**Şekil 20.** (+)Tr 2 hücre bağımsız ekstraktının HT-29 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns  $p \geq 0.05$  (anlamlı değil); \*  $p < 0.05$  (anlamlı); \*\*  $p < 0.01$  (yüksek düzeyde anlamlı))



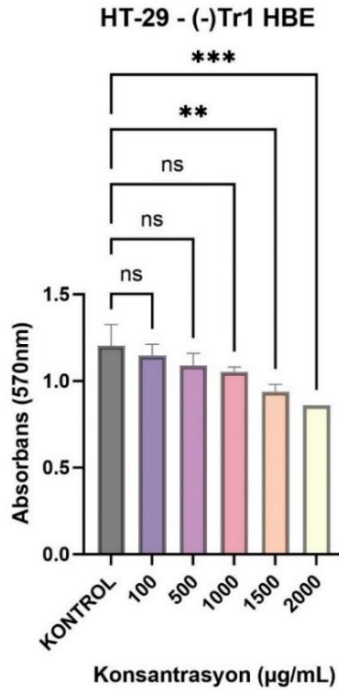
**Şekil 21.** (+)Tr 3 hücre bağımsız ekstraktının HT-29 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns  $p \geq 0.05$  (anlamlı değil); \*  $p < 0.05$  (anlamlı))



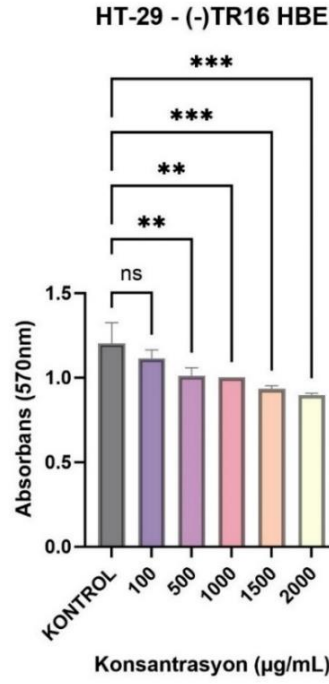
**Şekil 22.** (+)Tr 4 hücre bağımsız ekstraktının HT-29 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns  $p \geq 0.05$  (anlamlı değil); \*  $p < 0.05$  (anlamlı); \*\*  $p < 0.01$  (yüksek düzeyde anlamlı))



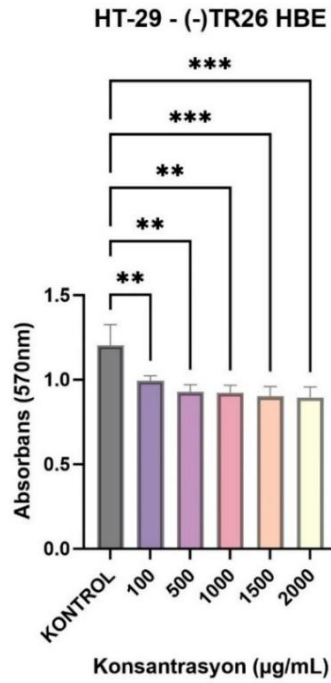
**Şekil 23.** (+)TR 18 hücre bağımsız ekstraktının HT-29 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns  $p \geq 0.05$  (anlamlı değil); \*  $p < 0.05$  (anlamlı))



**Şekil 24.** (-)Tr 1 hücre bağımsız ekstraktının HT-29 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns  $p \geq 0.05$  (anlamlı değil); \*\*  $p < 0.01$  (yüksek düzeyde anlamlı); \*\*\*  $p < 0.001$  (çok yüksek düzeyde))



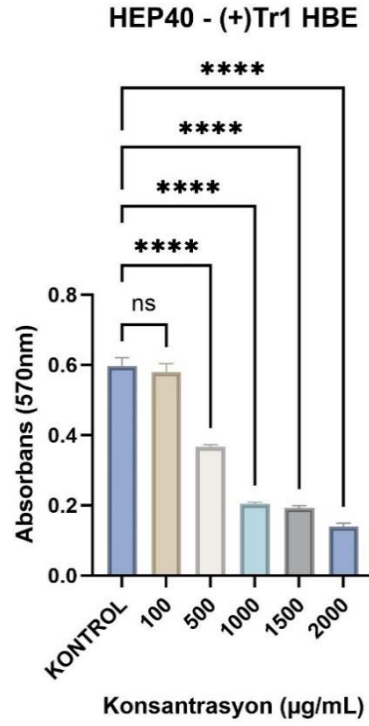
**Şekil 25.** (-)TR 16 hücre bağımsız ekstraktının HT-29 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns  $p \geq 0.05$  (anlamlı değil); \*\*  $p < 0.01$  (yüksek düzeyde anlamlı); \*\*\*  $p < 0.001$  (çok yüksek düzeyde))



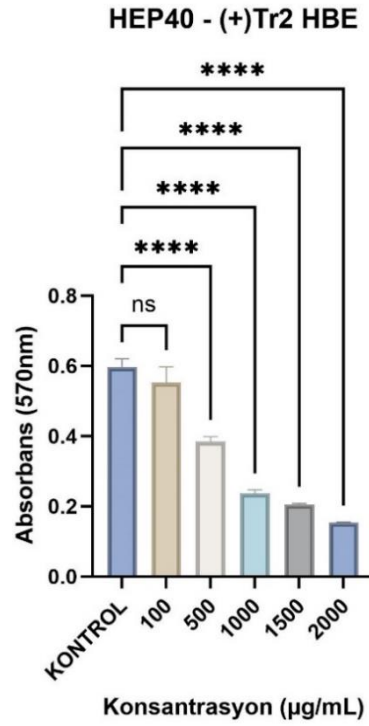
**Şekil 26.** (-)TR 26 hücre bağımsız ekstraktının HT-29 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (\*\*  $p < 0.01$  (yüksek düzeyde anlamlı); \*\*\*  $p < 0.001$  (çok yüksek düzeyde))

*T. aestivum* rizosfer örneklerinden izole edilen bakterilerin hücre bağımsız ekstraktlarının Hep40 üzerindeki etkisi 100 ile 2000 µg/mL arasında değişen 5 seri konsantrasyonda araştırılmıştır. Sonuçlar aşağıda gösterilmiştir (Şekil 27-34).

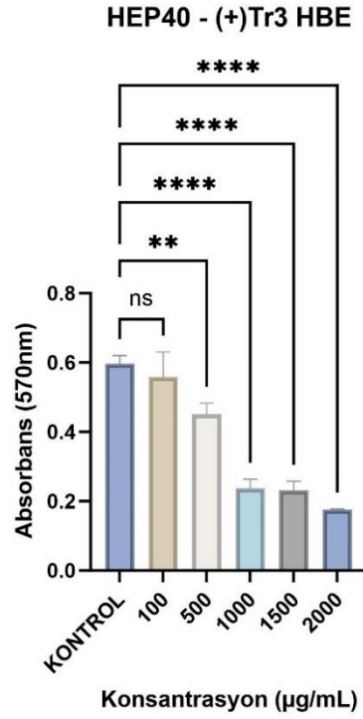




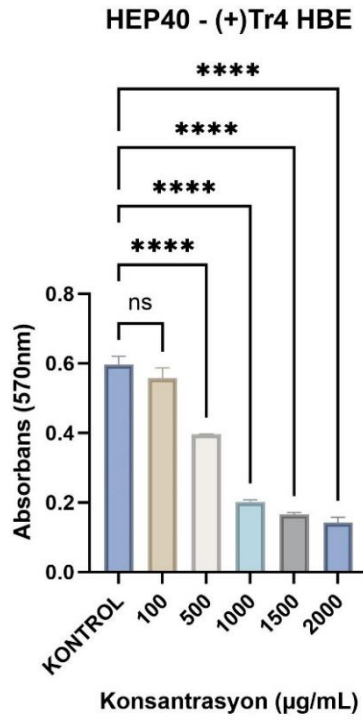
**Şekil 27.** (+)Tr 1 hücre bağımsız ekstraktının Hep40 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns  $p \geq 0.05$  (anlamalı değil); \*\*\*\*  $p < 0.0001$  (son derece yüksek düzeyde anlamalı))



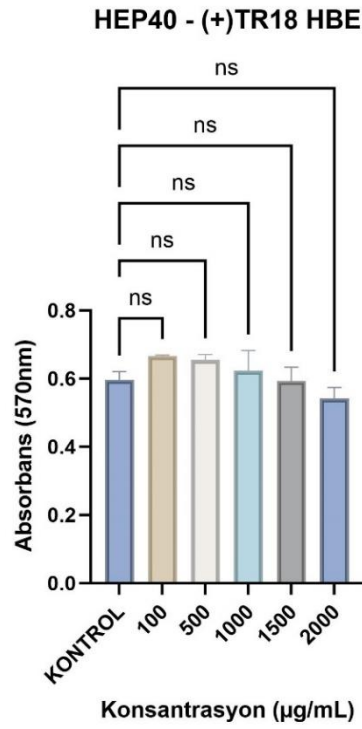
**Şekil 28.** (+)Tr 2 hücre bağımsız ekstraktının Hep40 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns  $p \geq 0.05$  (anlamalı değil); \*\*\*\*  $p < 0.0001$  (son derece yüksek düzeyde anlamalı))



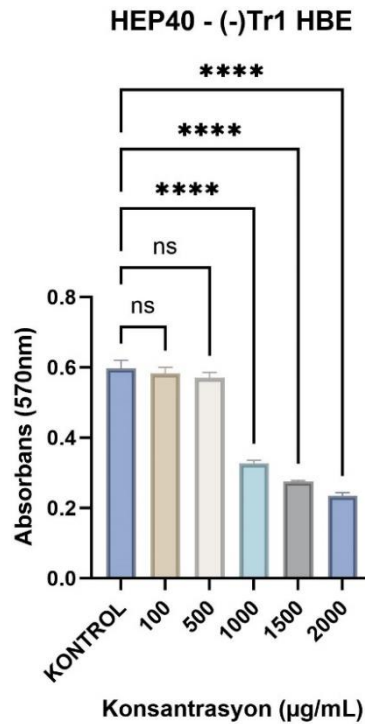
**Şekil 29.** (+)Tr 3 hücre bağımsız ekstraktının Hep40 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns  $p \geq 0.05$  (anlamlı değil); \*\*  $p < 0.01$  (yüksek düzeyde anlamlı); \*\*\*\*  $p < 0.0001$  (son derece yüksek düzeyde anlamlı))



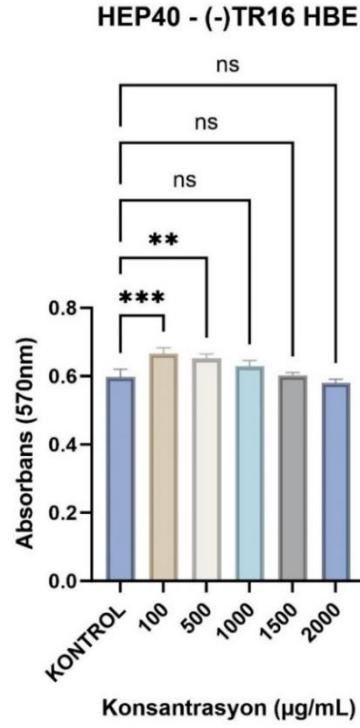
**Şekil 30.** (+)Tr 4 hücre bağımsız ekstraktının Hep40 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns  $p \geq 0.05$  (anlamlı değil); \*\*\*\*  $p < 0.0001$  (son derece yüksek düzeyde anlamlı))



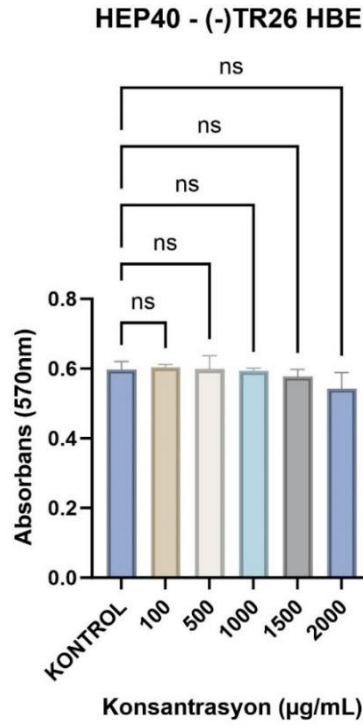
**Şekil 31.** (+)TR 18 hücre bağımsız ekstraktının Hep40 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns  $p \geq 0.05$  (anlamalı değil))



**Şekil 32.** (-)Tr 1 hücre bağımsız ekstraktının Hep40 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns  $p \geq 0.05$  (anlamalı değil); \*\*\*\*  $p < 0.0001$  (son derece yüksek düzeyde anlamalı))



**Şekil 33.** (-)TR 16 hücre bağımsız ekstraktının Hep40 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns  $p \geq 0.05$  (anlamlı değil); \*\*  $p < 0.01$  (yüksek düzeyde anlamlı); \*\*\*  $p < 0.001$  (çok yüksek düzeyde))



**Şekil 34.** (-)TR 26 hücre bağımsız ekstraktının Hep40 kanser hücre hattı üzerindeki etkisi (ns  $p \geq 0.05$  (anlamlı değil))

Sonuç (+)Tr1, (+)Tr2, (+)Tr3, (+)Tr4 ve (-)Tr1 hücre bağımsız ekstraktlarının önemli ölçüde ( $p<0.05$ ) her iki insan kolon ve karaciğer karsinoma hücre hattını inhibe ettiğini göstermiştir.

HT-29 için; (+)Tr3 ve (+)TR18 hücre bağımsız ekstraktları en yüksek konsantrasyonda (2000 µg/mL) inhibisyon etki gösterirken, (-)TR26 ekstraktının 100 µg/mL’lik konsantrasyonu sitotoksik aktivite sergilemiştir. Bu değeri 500 µg/mL değerindeki (-)TR16 takip etmiştir. Bununla birlikte (+)Tr1, (+)Tr2, (+)Tr4, (-)Tr1 için sitotoksik etkiyi 1500 µg/mL değerindeki hücre bağımsız ekstraktları göstermiştir.

Hep40 için; (+)Tr1, (+)Tr2, (+)Tr3, (+)Tr4 için 500, 1000, 1500, 2000 µg/mL değerleriyle benzer inhibisyon aktivite sergilerken en güçlü aktiviteyi 2000 µg/mL değerindeki ekstraktlar göstermiştir. (-)Tr1 hücre bağımsız ekstraktının 1000 µg/mL’lik konsantrasyonları hücre hattına yönelik orta düzeyde bir aktivite göstermiştir. Buna karşın (+)TR18, (-)TR16 ve (-)TR26 için istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

LAB hücre bağımsız ekstraktlarının iki hücre hattında sitotoksik etkili olanları (+)Tr1, (+)Tr2, (+)Tr3, (+)Tr4 ve (-)Tr1 aşağıdaki Tablo 10’da verilmiştir.

**Tablo 10.** LAB hücre bağımsız ekstraktlarının sitotoksik aktiviteleri

| <b>Bakteri hücre bağımsız ekstraktının hücre çoğalması inhibisyonunun değerleri</b> |             |             |             |             |              |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| <b>Hücre</b>                                                                        | <b>+Tr1</b> | <b>+Tr2</b> | <b>+Tr3</b> | <b>+Tr4</b> | <b>-Tr1</b>  |
| <b>HT-29</b>                                                                        | 1500±5.3*   | 1500±4.4*   | 2000±9.2*   | 1500±5.1*   | 1500±3.9**   |
| <b>Hep40</b>                                                                        | 500±6.3**** | 500±7.4**** | 500±10.1**  | 500±8.6**** | 1000±6.6**** |

Sonuçlar, üç bağımsız tekrarın ortalaması olarak ifade edilir.

\* İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi

Kontrole kıyasla (-)Tr1 (2000 µg/mL) ile muamele edilen kuyulardaki HT-29 hücrelerinde, canlılıkta %22 oranında azalma olduğu tespit edilmiştir. Kontrole kıyasla (+)Tr1 (2000 µg/mL) ile muamele edilen kuyulardaki Hep40 hücrelerinde, canlılıkta %77 oranında azalma olduğu tespit edilmiştir (Tablo 11).

**Tablo 11.** Kanser hücrelerinde canlılıkta % azalma

| Canlılıkta % azalma |      |      |      |      |      |
|---------------------|------|------|------|------|------|
| Hücre<br>2000µg/mL  | +Tr1 | +Tr2 | +Tr3 | +Tr4 | -Tr1 |
| HT-29               | 20   | 18   | 12   | 16   | 22   |
| Hep40               | 77   | 74   | 70   | 72   | 61   |

Dahham ve arkadaşları (2018), yaptıkları çalışmada, *T. claveryi* ekstraksiyonlarının HT-29 kanser hücre hattı üzerindeki etkisini 3.125 ile 100 µg/mL aralığında 6 farklı konsantrasyonda araştırmıştır. Sonuçta, metanol ekstraktı HT-29 kolon adenokarsinom hücre hattına karşı orta derecede bir aktivite göstermiştir (145.2±7.2 µg/mL IC50 değeri), bunu sırasıyla 163.5±6.3, 210.84±10.1, 239.2±14.3 ve 389.6±10.1 µg/mL IC50 değerleri ile etil asetat, etanol, hekzan ve su ekstraktları takip etmiştir. Mevcut çalışmada ise farklı olarak etanol ekstraktı HT-29'a karşı sitotoksik etki göstermemiştir. Öte yandan etil asetat ve su ekstraktları HT-29 hücrelerine karşı en güçlü inhibisyonu göstermiştir.

De Marco ve arkadaşları (2018), *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. lactis*, *L.s reuteri* ve *S. boulardii*'nin HBE'lerinin önemli ölçüde insan kolon epitelyal HT-29 hücrelerinde, mikropalara karşı savunmada önemli olan PGE-2 ve IL-8 ekspresyonunu azaltabildiğini bildirmiştir. Bu çalışma, probiyotiklerin anti-inflamatuvar etkilerini bağırsak epitelyal hücreleri ve makrofajları doğrudan etkileyerek gerçekleştirdiği mekanizmaları önermektedir. LAB metabolitlerinin bağırsak iltihabını önleme ve azaltmada anti-inflamatuvar tedavinin yardımcıları olarak olası kullanımını destekleyen ek bir kanıt sunmaktadır.

Beara ve arkadaşları (2014) ayrıca *T. magnatum* ve *T. aestivum*'un su ve metanol ekstrelerini tümör hücre hatlarına (HeLa, MCF7 ve HT-29) karşı test etmiştir. Sonuçlar, metanol ekstreleri bazı tümör hücre hatlarına (HeLa, MCF7, HT-29) karşı sitotoksikite göstermiş ayrıca sulu ekstrelerin meme adenokarsinomuna (MCF-7) karşı etkileyici bir aktivite sergilediğini göstermiş; IC50 değerleri 2.3 ile 34.5 µg/mL arasında değişmiştir.

Tejedor-Calvo ve arkadaşları (2021), mantar türlerinin özütlerinin tümör hücre büyümesini engelleme potansiyelini 4 farklı tümör hücre hattında değerlendirmiştir. *Terfezia* ve *T. gennadii* özütleri, HepG2'de 83±5 ile 321±4 µg/mL tüm konsantrasyonlarında tümör hücrelerinde anti-proliferatif aktivite sergilemiştir. *T. aestivum*, *T. magnatum* ve *T. melanosporum* özütleri ile test edilen tüm tümör

hücrelerinde hücre büyümesini %50 oranında engelleyen (GI50) değerleri 400 µg/mL'nin üzerinde olmuştur. Öte yandan, sadece *T. arenaria*, PLP2 adı verilen tümörsüz karaciğer hücreleri için toksisite göstermiştir. (220±2 µg/mL). Genel olarak, elde edilen sonuçlar, Terfezia özütlerinin (daha düşük GI50 değerleri ile) *Tuber* özütlerine kıyasla test edilen tümör hücrelerine karşı daha etkili olduğunu göstermiştir.

Zhao ve arkadaşları (2014), bir *Tuber* fermantasyon sisteminden 52 *Tuber* polisakkaritini incelemiş ve bunlardan 12'si, *Tuber*'in meyve veren gövdesindekilere kıyasla HepG2, A549, HCT-116, SK-BR-3 ve HL-60 hücrelerine karşı nispeten daha yüksek *in vitro* antitümör aktivitesi sergilemiştir. Bu çalışma polisakkarit fraksiyonlarının antitümör aktivitesini destekleyebileceği sonucuna varmıştır.

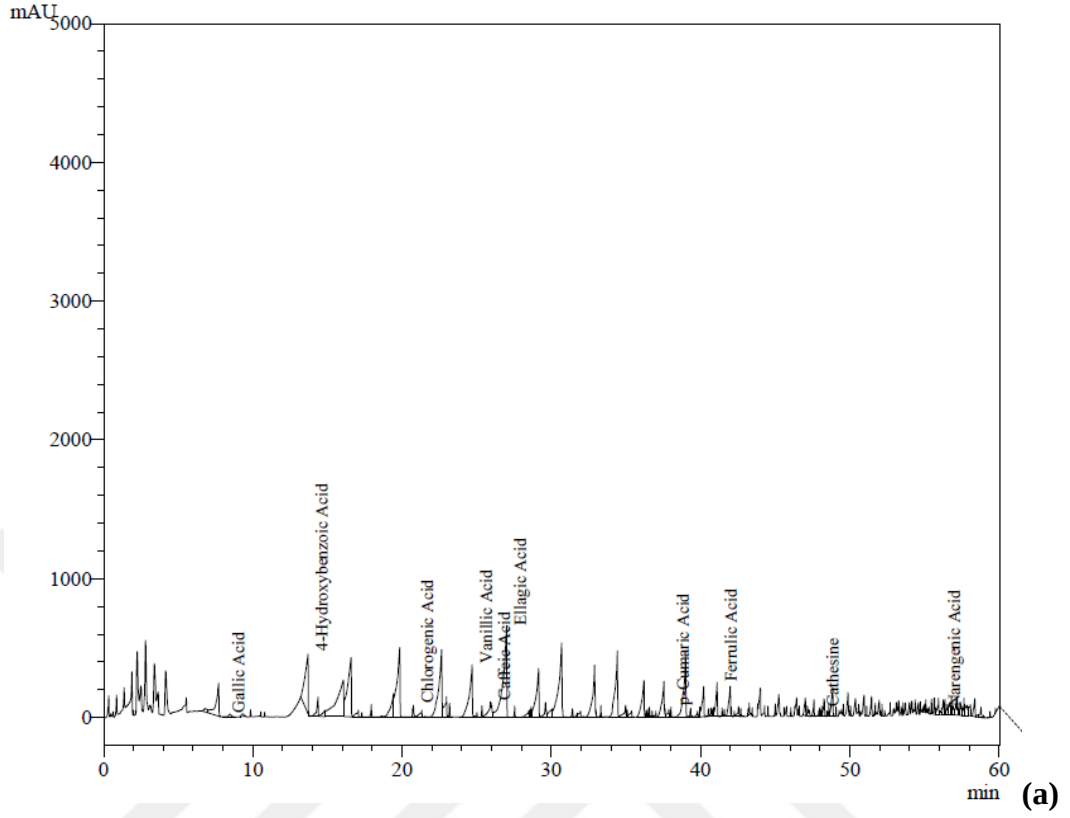
Rupasinghe ve arkadaşları (2019), yapmış oldukları çalışmada *L. rhamnosus*'un, yaban mersini proantosyanidinlerinin biyolojik dönüşümündeki rolünü ve ortaya çıkan metabolitlerin hepatoselüler karsinom HepG2 hücreleri üzerindeki sitotoksitesini ortaya çıkarmayı amaçlamışlardır. Laktobasillerin bu aktiviteleri özellikle protokateşik ve 4-hidroksibenzoik asitler olmak üzere fenolik asitlerin salınımına katkıda bulunabilir. Bununla birlikte, Laktobasiller tarafından flavonoid biyotransformasyonu ve bunların sonucunda ortaya çıkan antikanser özellikleri hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (Aura, 2008). Bunlara cevap olmak için HepG2 hücreleri, artan konsantrasyonlarda (1, 10, 50, 100, 250 ve 500 µg/mL) *L. rhamnosus* kullanılarak gerçekleştirilen 24 saatlik biyodönüşüm öncesi ve sonrasında muamele edilmiştir. Elde edilen veriler, hücre canlılığında konsantrasyona bağlı bir azalmayı göstermiştir. Genel olarak, biyodönüşüm sonrası 24 saatlik HepG2 hücre proliferasyonunu engellemede ana maddelerinden (0 saat) daha etkili olmuştur. Bu nedenle, *L. rhamnosus*'un biyodönüşümü ile elde edilen yaban mersini posası proantosyanidinlerinin (PR 24 saat), bütün formlarından biyolojik olarak daha etkin olan metabolitler ürettiği açıktır. Çalışmamızda da kontrole kıyasla (2000 µg/mL) LAB HBE ile muamele edilen kuyulardaki Hep40 hücrelerinde, canlılıkta %61-77 aralığında azalma olduğu tespit edilmiştir.

Trüf mantarları besin değeri, lezzet ve aroma içermekle birlikte, genellikle kullanılmayan terapötik bileşiklerin kaynaklarıdır. Trüflerin antimikrobiyal, antikanser, anti-inflamatuar, immünsüpresif ve antioksidan etkileri bilinmekte ve devam eden çalışmalarla da rapor edilmektedir (Mandeel ve Al-Laith, 2007; Dundar vd., 2012).

Araştırmalar, LAB suşlarının da bazı kanser hücre hatları üzerinde antiproliferatif etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Bu etkiler, kanser hücrelerinin büyümesini durdurma veya azaltma eğilimindedir. LAB'ların kanser hücrelerinde apoptozis adı verilen hücresel ölüm sürecini uyarabileceği de rapor edilmektedir. Ayrıca, bağışıklık sistemi üzerindeki olumlu etkileri aracılığıyla kanserle mücadelede yardımcı olabilecekleri düşünülmektedir. Bu bakterilerin kanserle olan etkileşimleri üzerindeki araştırmalar hala devam etmektedir ve hangi LAB türlerinin hangi kanser türlerine karşı etkili olduğunu anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu alandaki araştırmalar, LAB'ların kanser tedavisi veya  nlenmesindeki potansiyel rollerini daha iyi anlamamıza yardımcı olabilecektir.

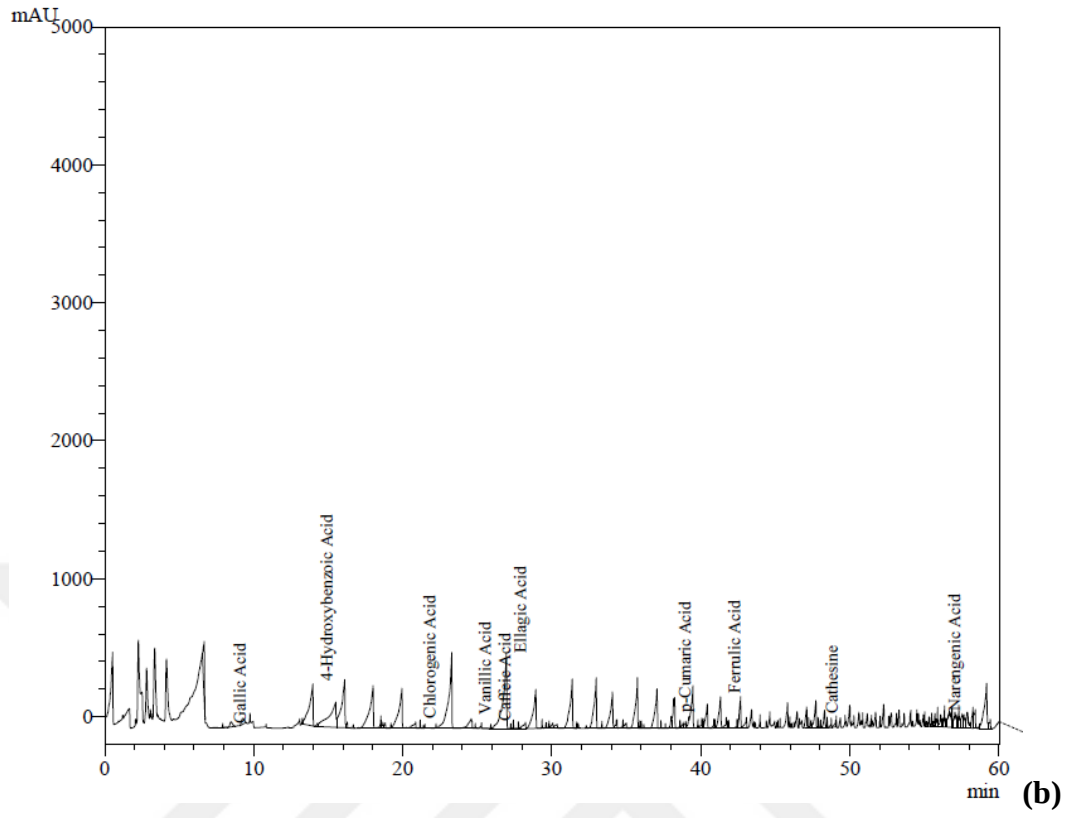
#### **4.7 Ekstraktların Fenolik ve Flavonoid Madde  cerikleri**

Tez çalışmasının son bölümünde farklı c z c ler kullanılarak hazırlanan trüf mantar ekstraktları ile trüf mantar ve rizosfer bölümlerinden izole edilen LAB suşlarına ait HBE'lerin fenolik ve flavonoid maddeler açısından kantitatif  cerikleri HPLC analizi ile gerçekleştirilmiştir. Gallik asit, 4-hidroksibenzoik asit, klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, ellajik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, kateşin ve naringenin aktif bileşiklerini içeren standartlara ait kromatogramlar (Ek-1) ile karşılaştırılmıştır. Mantar ekstraktlarının HPLC analizi neticesinde elde edilen kromatogramlar şekil 35'te gösterilmiştir.



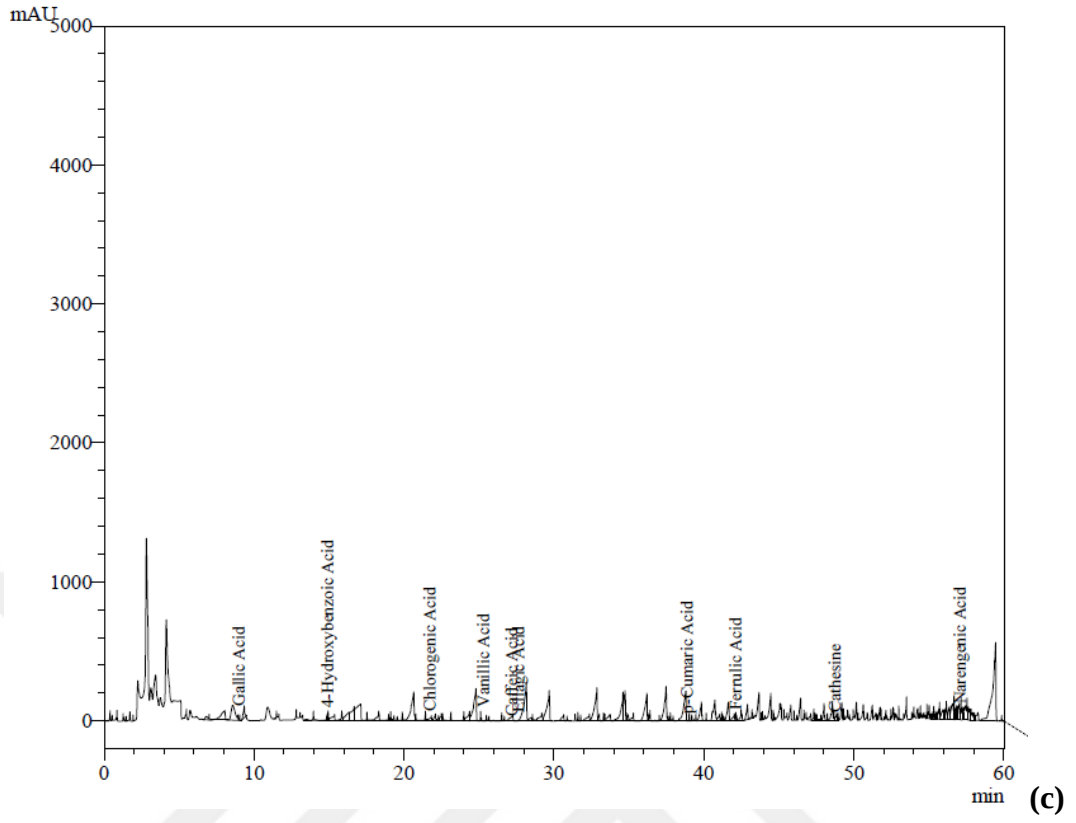
**Şekil 35.** *T. aestivum* ekstraktlarının Gallik Asit, 4-Hidroksibenzoik Asit, Klorojenik Asit, Vanilik Asit, Kafeik Asit, Ellajik Asit, p-Kumarik Asit, Ferulik Asit, Kateşin ve Naringenin aktif bileşiklerin piklerini gösteren 254 nm dalga boyunda ölçülen kromatogramları;

(a) Hekzan ekstraktlarının ana aktif bileşiklerinin piklerini gösteren kromatogramları



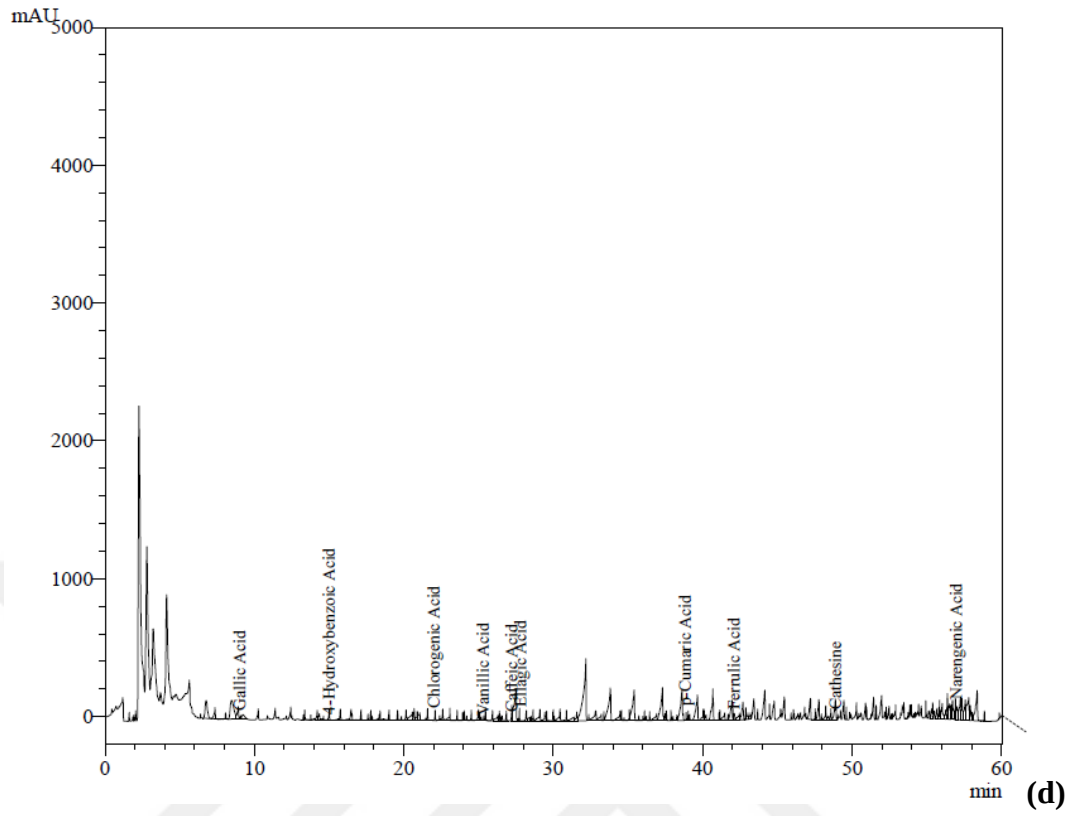
Şekil 35. Devamı.

(b) Etil asetat ekstraktlarının ana aktif bileşiklerinin piklerini gösteren kromatogramları



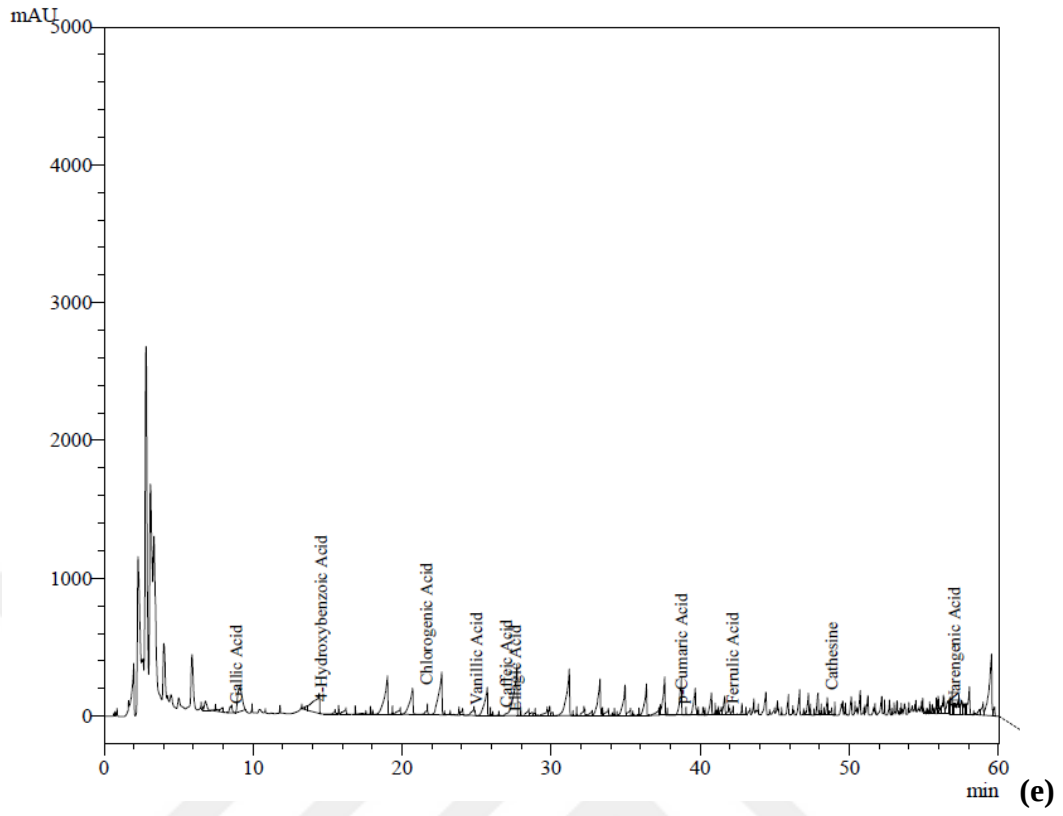
**Şekil 35. Devamı.**

(c) Etanol ekstraktlarının ana aktif bileşiklerinin piklerini gösteren kromatogramları



Şekil 35. Devamı.

(d) Metanol ekstraktlarının ana aktif bileşiklerinin piklerini gösteren kromatogramları



Şekil 35. Devamı.

(e) Su ekstraktlarının ana aktif bileşiklerinin piklerini gösteren kromatogramları

Mantar ekstraktlarındaki maddelerin miktarsal analizlerin detayları ve maddelerin alıkonma zamanları Tablo 12-16'da verilmiştir.

**Tablo 12.** Hekzan ekstraktındaki ana kimyasal bileşimlerinin gözlemlendiği alıkonma zamanları ve konsantrasyonları (ekran görüntüsü)

1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

| Quantitative Results |                       |           |          |         |       |
|----------------------|-----------------------|-----------|----------|---------|-------|
| PDA                  |                       |           |          |         |       |
| ID#                  | Name                  | Ret. Time | Area     | Conc.   | Units |
| 1                    | Gallic Acid           | 8.097     | 5099     | 0.108   | mg/L  |
| 2                    | 4-Hydroxybenzoic Acid | 13.686    | 6084337  | 72.306  | mg/L  |
| 3                    | Chlorogenic Acid      | 20.750    | 377522   | 3.964   | mg/L  |
| 4                    | Vanillic Acid         | 24.685    | 5150084  | 266.114 | mg/L  |
| 5                    | Caffeic Acid          | 25.904    | 1597473  | 35.286  | mg/L  |
| 6                    | Ellagic Acid          | 26.988    | 10441319 | 68.297  | mg/L  |
| 7                    | p-Cumaric Acid        | 37.865    | 390756   | 17.971  | mg/L  |
| 8                    | Ferrulic Acid         | 41.091    | 1686743  | 43.067  | mg/L  |
| 9                    | Cathesine             | 47.901    | 137672   | 9.922   | mg/L  |
| 10                   | Narengenic Acid       | 56.036    | 132709   | 29.031  | mg/L  |

**Tablo 13.** Etil asetat ekstraktındaki ana kimyasal bileşimlerinin gözlemlendiği alıkonma zamanları ve konsantrasyonları (ekran görüntüsü)

1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

| Quantitative Results |                       |           |         |         |       |
|----------------------|-----------------------|-----------|---------|---------|-------|
| PDA                  |                       |           |         |         |       |
| ID#                  | Name                  | Ret. Time | Area    | Conc.   | Units |
| 1                    | Gallic Acid           | 8.139     | 4215    | 0.089   | mg/L  |
| 2                    | 4-Hydroxybenzoic Acid | 13.964    | 5240715 | 62.281  | mg/L  |
| 3                    | Chlorogenic Acid      | 20.865    | 578590  | 6.076   | mg/L  |
| 4                    | Vanillic Acid         | 24.591    | 1131492 | 58.466  | mg/L  |
| 5                    | Caffeic Acid          | 25.902    | 63333   | 1.399   | mg/L  |
| 6                    | Ellagic Acid          | 26.947    | 8122406 | 53.129  | mg/L  |
| 7                    | p-Cumaric Acid        | 38.001    | 391026  | 17.983  | mg/L  |
| 8                    | Ferrulic Acid         | 41.312    | 2050891 | 52.365  | mg/L  |
| 9                    | Cathesine             | 47.870    | 184837  | 13.321  | mg/L  |
| 10                   | Narengenic Acid       | 56.083    | 502493  | 109.923 | mg/L  |

**Tablo 14.** Etanol ekstraktındaki ana kimyasal bileşimlerinin gözlemlendiği alıkonma zamanları ve konsantrasyonları (ekran görüntüsü)

1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

| Quantitative Results |                       |           |         |         |       |
|----------------------|-----------------------|-----------|---------|---------|-------|
| PDA                  |                       |           |         |         |       |
| ID#                  | Name                  | Ret. Time | Area    | Conc.   | Units |
| 1                    | Gallic Acid           | 8.054     | 1321607 | 28.019  | mg/L  |
| 2                    | 4-Hydroxybenzoic Acid | 13.965    | 227791  | 2.707   | mg/L  |
| 3                    | Chlorogenic Acid      | 20.783    | 175337  | 1.841   | mg/L  |
| 4                    | Vanillic Acid         | 24.364    | 641371  | 33.141  | mg/L  |
| 5                    | Caffeic Acid          | 26.242    | 4683    | 0.103   | mg/L  |
| 6                    | Ellagic Acid          | 26.691    | 68490   | 0.448   | mg/L  |
| 7                    | p-Cumaric Acid        | 37.945    | 108768  | 5.002   | mg/L  |
| 8                    | Ferrulic Acid         | 41.187    | 104329  | 2.664   | mg/L  |
| 9                    | Cathesine             | 47.803    | 104817  | 7.554   | mg/L  |
| 10                   | Narengenic Acid       | 56.128    | 596324  | 130.449 | mg/L  |

**Tablo 15.** Metanol ekstraktındaki ana kimyasal bileşimlerinin gözlemlendiği alıkonma zamanları ve konsantrasyonları (ekran görüntüsü)

1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

| Quantitative Results |                       |           |        |         |       |
|----------------------|-----------------------|-----------|--------|---------|-------|
| PDA                  |                       |           |        |         |       |
| ID#                  | Name                  | Ret. Time | Area   | Conc.   | Units |
| 1                    | Gallic Acid           | 8.069     | 127146 | 2.696   | mg/L  |
| 2                    | 4-Hydroxybenzoic Acid | 14.059    | 94441  | 1.122   | mg/L  |
| 3                    | Chlorogenic Acid      | 21.066    | 357445 | 3.753   | mg/L  |
| 4                    | Vanillic Acid         | 24.363    | 11249  | 0.581   | mg/L  |
| 5                    | Caffeic Acid          | 26.275    | 302885 | 6.690   | mg/L  |
| 6                    | Ellagic Acid          | 26.854    | 190518 | 1.246   | mg/L  |
| 7                    | p-Cumaric Acid        | 37.872    | 120570 | 5.545   | mg/L  |
| 8                    | Ferrulic Acid         | 41.147    | 242085 | 6.181   | mg/L  |
| 9                    | Cathesine             | 47.936    | 89978  | 6.484   | mg/L  |
| 10                   | Narengenic Acid       | 56.022    | 830047 | 181.577 | mg/L  |

**Tablo 16.** Su ekstraktındaki ana kimyasal bileşimlerinin gözlemlendiği alıkonma zamanları ve konsantrasyonları (ekran görüntüsü)

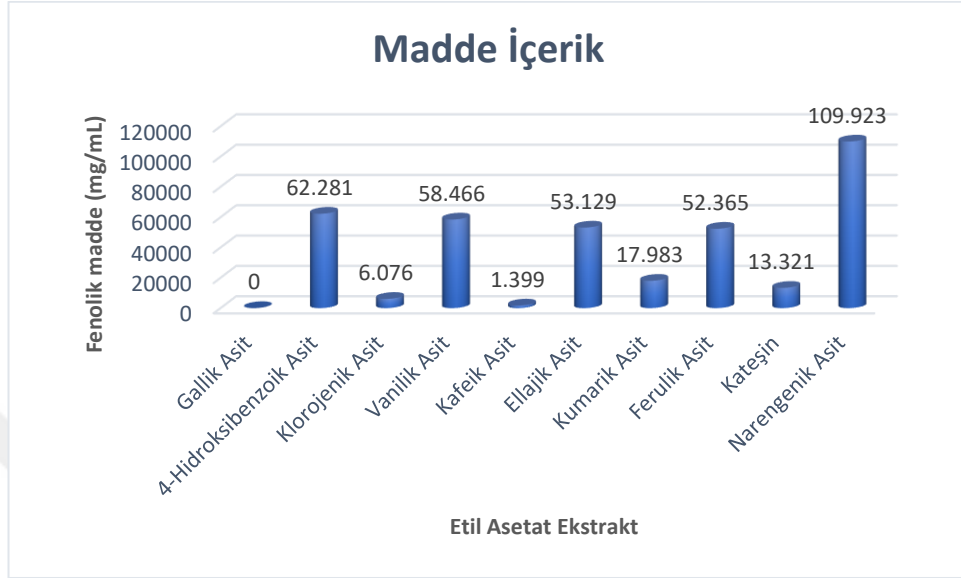
1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

Quantitative Results

PDA

| ID# | Name                  | Ret. Time | Area    | Conc.  | Units |
|-----|-----------------------|-----------|---------|--------|-------|
| 1   | Gallic Acid           | 7.943     | 362023  | 7.675  | mg/L  |
| 2   | 4-Hydroxybenzoic Acid | 13.610    | 253831  | 3.017  | mg/L  |
| 3   | Chlorogenic Acid      | 20.698    | 2882162 | 30.265 | mg/L  |
| 4   | Vanillic Acid         | 24.047    | 345518  | 17.854 | mg/L  |
| 5   | Caffeic Acid          | 26.066    | 72300   | 1.597  | mg/L  |
| 6   | Ellagic Acid          | 26.635    | 22469   | 0.147  | mg/L  |
| 7   | p-Cumaric Acid        | 37.782    | 109878  | 5.053  | mg/L  |
| 8   | Ferrulic Acid         | 41.219    | 124812  | 3.187  | mg/L  |
| 9   | Cathesine             | 47.885    | 997593  | 71.894 | mg/L  |
| 10  | Narengenic Acid       | 56.111    | 286179  | 62.603 | mg/L  |

Toplam fenolik ve flavonoid içeriklerinin belirlenmesinden sonra, antikanser özelliği yüksek olan etil asetat ekstraktının madde içeriklerinin standart kromatogramına karşı belirlenen sonuçları Şekil 36’da gösterilmiştir.



**Şekil 36.** Trüf mantarı etil asetat ekstraktının ana kimyasal bileşimlerinin sonuçları

Test edilen hücrelerin çoğuna karşı en güçlü inhibisyonu gösteren etil asetat değerlendirilme sonuçlarına göre en yüksek seviyede tespit edilen bileşik naringenin (109.92 mg/mL) olarak elde edilmiştir. Bu bileşiği, 62.28 mg/mL ile 4-hidroksibenzoik asit, 58.46 mg/mL ile vanilik asit, 53.12 mg/mL ile ellajik asit ve 52.36 mg/mL ile de ferulik asit takip etmiştir. Ayrıca, p-kumarik, kateşin, klorojenik asit miktarları sırasıyla 17.98, 13.32 ve 6.07 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Ancak, gallik asit, kafeik asit örnekleri için algılanabilir düzeyler kaydedilmemiştir.

Etil asetat ekstraktının içerik bakımından karşılaştırıldığında diğerlerinden farklı kılan özelliği p-kumarik ve ferulik asit miktar üretiminin fazla olmasıdır. Ferulik asidin antioksidan, antimikrobiyal, anti-inflamatuar, antitromboz ve antikanser gibi birçok fizyolojik fonksiyonu olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, koroner hastalığa karşı koruyucu, kolesterolü düşürücü ve sperm canlılığını artırıcı etkileri bulunmaktadır (Ou ve Kwok, 2004). Bu özelliklerinden ve düşük toksisitesinden dolayı, ferulik asitten kaynaklı bir biyoterapötik etki düşünülebilir. Bunun yanında etil asetat ekstraktının antikanser özelliği 4-hidroksibenzoik asit, klorojenik, vanilik asit, ellajik asit, kateşin ve naringenin miktarı fazla olup bunların bir aradaki kombinasyonundan kaynaklı olabilir.

Trüf mantarı aromatik özelliklerinin yanı sıra biyokimyasal bileşimleri birden fazla besinsel ve tıbbi fayda içermektedir. Mantarlar, karbonhidratlar, proteinler, yağlar, mineraller, lipitler ve amino asitler dahil olmak üzere çeşitli temel besinsel ürünler bakımından zengindir (Wang ve Marcone, 2011). Ayrıca, fenolikler, terpenoidler, polisakkaritler ve fitosteroller gibi bileşikler de içermeleri mantarların antitümör, antioksidan, antibakteriyel, hepatoprotektif (karaciğer koruyucu), anti-inflamatuar ve bağışıklık düzenleyici özellikleri ile ilişkilendirilmektedir (Patel, 2012). Son yıllarda, araştırmacılar çeşitli mantar türlerinden elde edilen biyoaktif bileşiklere ve bunların besinsel ve tıbbi uygulamalardaki potansiyellerine büyük önem vermiştir (Wang ve Marcone 2011; Patel vd., 2017). Özellikle, mantarlar çeşitli biyolojik özellikler içeren ve antioksidan olarak kabul edilen bol miktarda flavonoid içermektedir. Yenilebilir mantarların bu değerli metabolitleri sentezleyememesi dolayısıyla araştırmalar trüf mantarlarının biyolojik aktivitelerine odaklanmaktadır (Lee vd., 2020).

Gerçekleştirilen çalışmalar çöl trüf *T. nivea*'nın metanol ekstraktlarının yüksek miktarda flavonoid (74.52 mg/g GAE) ve tanin (19.78 mg /g kateşin eşdeğeri (CE) ekstrakt) içerdiğini belirtmiştir. (Lee vd., 2020). Benzer şekilde Çin trüf türünün kimyasal analizi de metanol ekstraktlarının yüksek miktarda antioksidan kaynakları içerdiğini ortaya koymuştur. Bunlar arasında, 100 g başına 4.59 ile 4.63 g arasında değişen miktarda askorbik asit, 144 ile 271 mg arasında karotenoid olarak  $\beta$ -karoten, 450 ile 735 mg arasında gallik asit eşdeğerleri olarak fenolikler ve 611 ile 1355 mg arasında rapor edilmiştir (Yan vd., 2017).

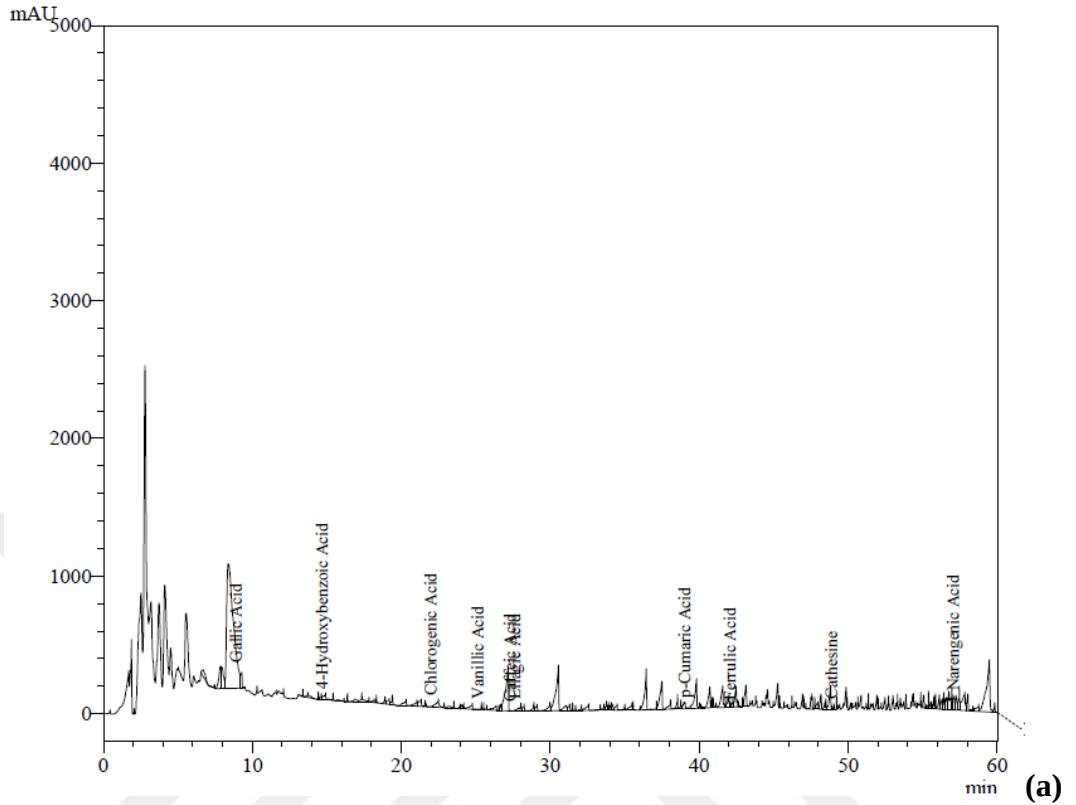
Beara ve arkadaşları (2014) tarafından, *T. aestivum* mantarının maserasyon yoluyla ve Soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen metanol ekstraktında kateşin ve epikateşin tespit edilirken maserasyon yoluyla ve Soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen su ekstraktında kamfenol flavonoidi tespit edilmiştir. Ayrıca 14 ayrı bileşenin varlığı da doğrulanmıştır; *T. aestivum*'da en baskın olanlar 4-hidroksibenzoik asit, baikalein ve kaempferol olurken *T. magnatum*'da ise epikateşin ve kateşin tespit edilmiştir.

*T. aestivum*'un metanol ekstraktlarındaki toplam fenolik içeriği ve belirli fenolik bileşikler hakkındaki önemli bulgular Villares ve arkadaşlarının (2012) çalışması ile uyumlu bulunmuştur. Villares ve arkadaşlarına (2012) göre, *T. aestivum*, *T. indicum* ve *T. melanosporum* metanol ekstraktlarının elde edilen fenolik ve ergosteril ester konsantrasyonları sırasıyla 1.9-0.36 mg/g, 1.5-0.09 mg/g olarak bulunmuştur. Bazı

çalışmalarda trüfün güçlü antioksidan etkisi kateşinlerle ilişkilendirilmiştir (Khan vd., 2022).

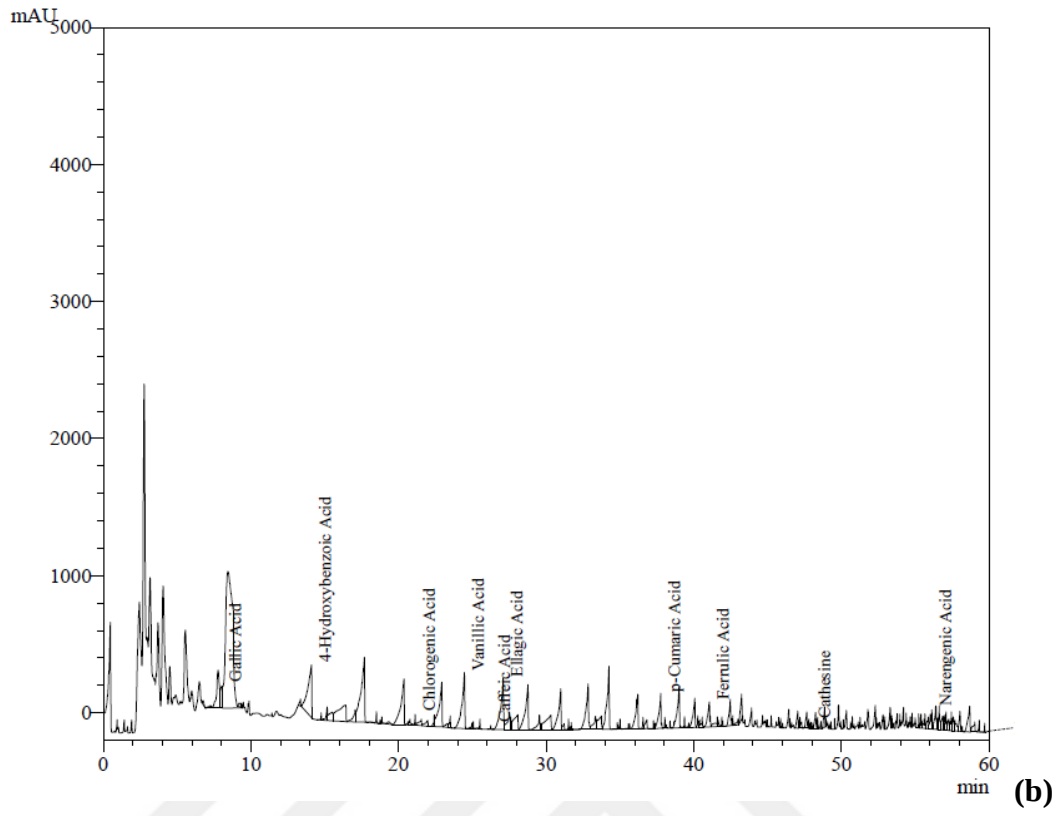
*T. melanosporum* için yüksek seviyelerde gallik, 4-hidroksibenzoik ve p-kumarik asit içeriği rapor edilmiştir. Sinnamik asit ise yalnızca *T. arenaria* türünde tespit edilmiştir. *T. aestivum* ekstraktlarında yalnızca 4-hidroksibenzoik asit, baicalein, kaempferol ve sekoizolarisiresinol rapor edilmişken, gallik asit, kuersetin, kuersetin-3-O-glukozit ve hiperosid'e *T. magnatum* ekstraktlarında rastlanmıştır (Beara vd., 2014). Ayrıca, gallik, p-hidroksibenzoik, o-hidroksibenzoik ve bir dihidroksibenzoik asit izomeri, *T. melanosporum* etanolik özütlerinde de tespit edilmiştir (Savini vd., 2017).

LAB ekstraktlarının HPLC kullanılarak belirlenen ana kimyasal bileşimlerinin sonuçları şekil 37'de gösterilmiştir.



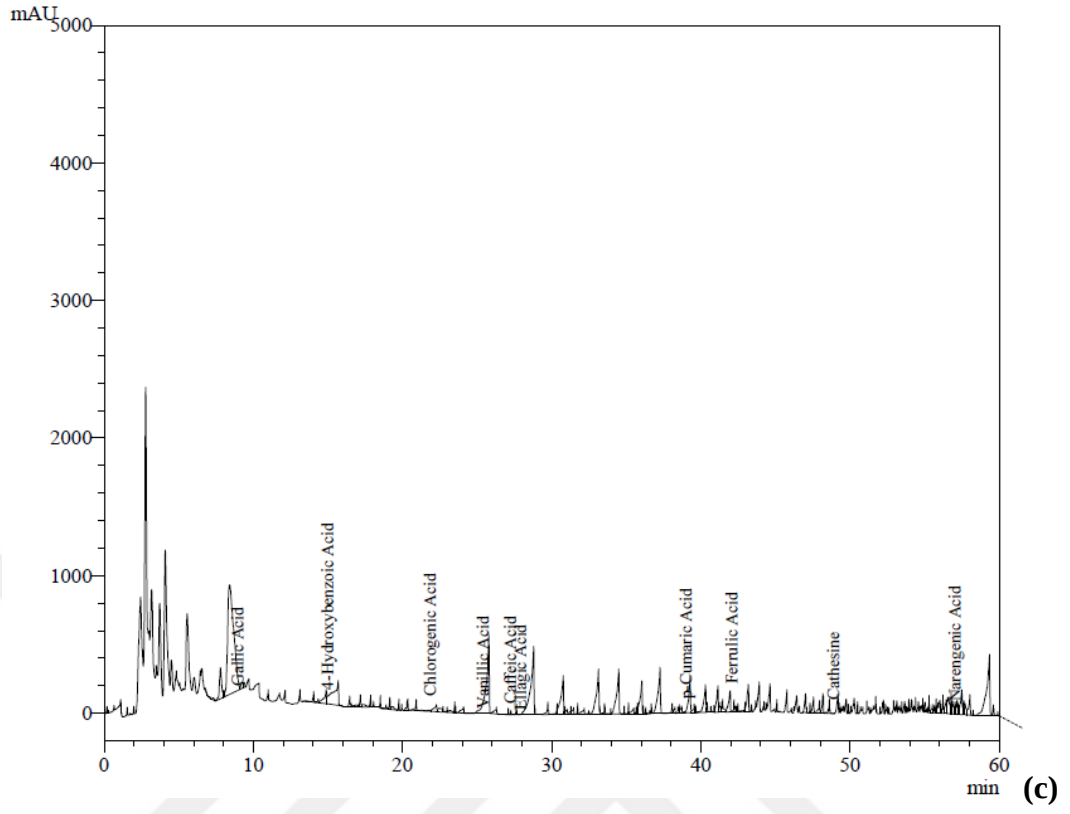
**Şekil 37.** LAB ekstraktlarının Gallik Asit, 4-Hidroksibenzoik Asit, Klorojenik Asit, Vanilik Asit, Kafeik Asit, Ellajik Asit, p-Kumarik Asit, Ferulik Asit, Kateşin ve Naringenin aktif bileşiklerin piklerini gösteren 254 nm dalga boyunda ölçülen kromatogramları;

(a) (+)Tr1 hücre bağımsız ekstraktının ana aktif bileşiklerinin piklerini gösteren kromatogramları



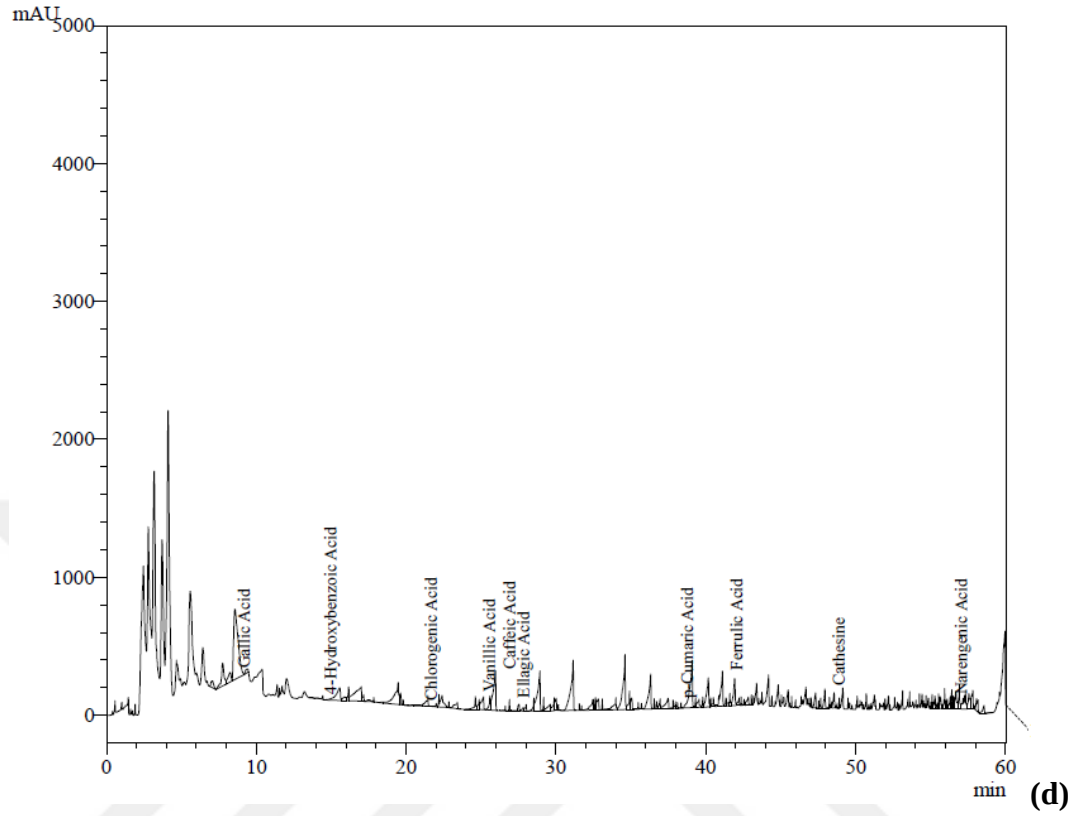
Şekil 37. Devamı.

(b) (+)Tr2 hücre bağımsız ekstraktının ana aktif bileşiklerinin piklerini gösteren kromatogramları



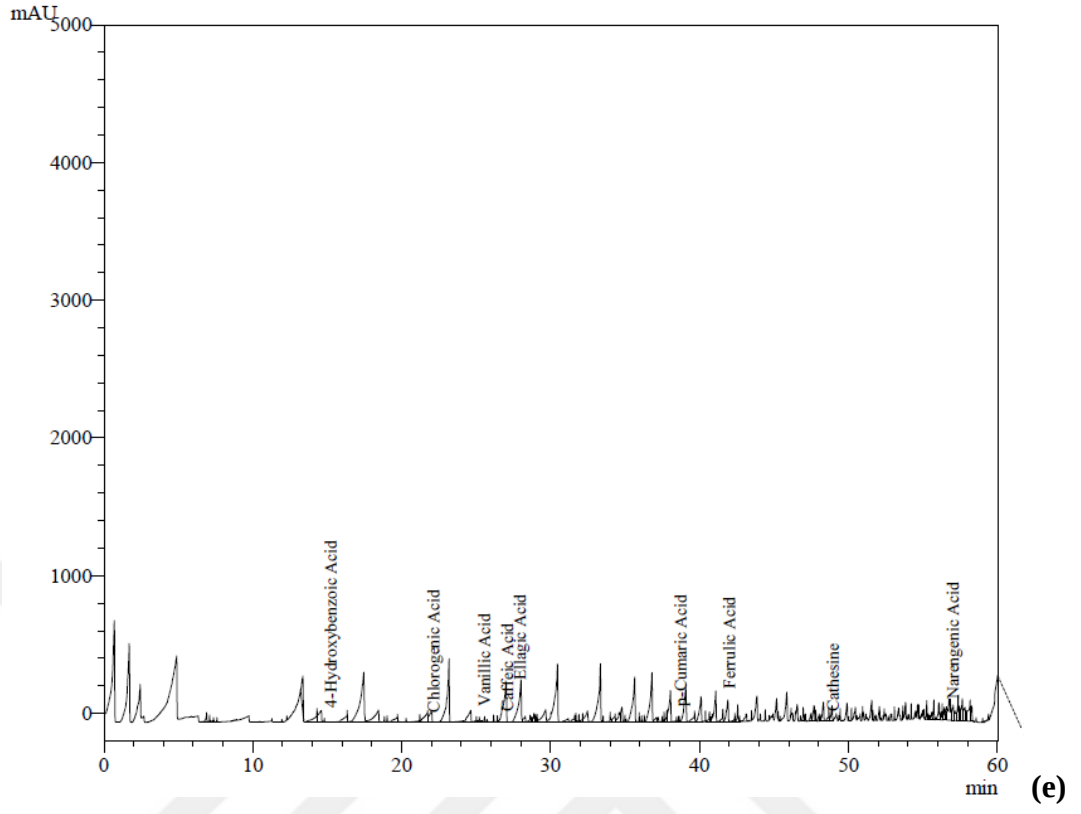
Şekil 37. Devamı.

(c) (+)Tr3 hücre bağımsız ekstraktının ana aktif bileşiklerinin piklerini gösteren kromatogramları



Şekil 37. Devamı.

(d) (+)Tr4 hücre bağımsız ekstraktının ana aktif bileşiklerinin piklerini gösteren kromatogramları



Şekil 37. Devamı.

(e) (-)-Tr1 hücre bağımsız ekstraktının ana aktif bileşiklerinin piklerini gösteren kromatogramları

LAB ekstraktlarındaki maddelerin miktarsal analizlerinin detayları ve maddelerin alıkonma zamanları Tablo 17-21’de verilmiştir.

**Tablo 17.** (+) Tr1 HBE ana kimyasal bileşimlerinin gözlemlendiği alıkonma zamanları ve konsantrasyonları (ekran görüntüsü)

1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

| Quantitative Results |                       |           |         |         |       |
|----------------------|-----------------------|-----------|---------|---------|-------|
| PDA                  |                       |           |         |         |       |
| ID#                  | Name                  | Ret. Time | Area    | Conc.   | Units |
| 1                    | Gallic Acid           | 7.951     | 1594804 | 33.811  | mg/L  |
| 2                    | 4-Hydroxybenzoic Acid | 13.732    | 375870  | 4.467   | mg/L  |
| 3                    | Chlorogenic Acid      | 21.045    | 490177  | 5.147   | mg/L  |
| 4                    | Vanillic Acid         | 24.188    | 197067  | 10.183  | mg/L  |
| 5                    | Caffeic Acid          | 26.365    | 354338  | 7.827   | mg/L  |
| 6                    | Ellagic Acid          | 26.674    | 179160  | 1.172   | mg/L  |
| 7                    | p-Cumaric Acid        | 38.073    | 503077  | 23.137  | mg/L  |
| 8                    | Ferrulic Acid         | 41.114    | 85707   | 2.188   | mg/L  |
| 9                    | Cathesine             | 47.921    | 368275  | 26.541  | mg/L  |
| 10                   | Narengenic Acid       | 56.105    | 584576  | 127.879 | mg/L  |

**Tablo 18.** (+) Tr2 HBE ana kimyasal bileşimlerinin gözlemlendiği alıkonma zamanları ve konsantrasyonları (ekran görüntüsü)

1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

| Quantitative Results |                       |           |         |         |       |
|----------------------|-----------------------|-----------|---------|---------|-------|
| PDA                  |                       |           |         |         |       |
| ID#                  | Name                  | Ret. Time | Area    | Conc.   | Units |
| 1                    | Gallic Acid           | 8.023     | 1430042 | 30.318  | mg/L  |
| 2                    | 4-Hydroxybenzoic Acid | 14.102    | 6627779 | 78.765  | mg/L  |
| 3                    | Chlorogenic Acid      | 21.137    | 211997  | 2.226   | mg/L  |
| 4                    | Vanillic Acid         | 24.472    | 5224407 | 269.955 | mg/L  |
| 5                    | Caffeic Acid          | 26.255    | 68805   | 1.520   | mg/L  |
| 6                    | Ellagic Acid          | 27.098    | 4980266 | 32.576  | mg/L  |
| 7                    | p-Cumaric Acid        | 37.763    | 2433569 | 111.920 | mg/L  |
| 8                    | Ferrulic Acid         | 41.050    | 1701221 | 43.437  | mg/L  |
| 9                    | Cathesine             | 47.937    | 90646   | 6.533   | mg/L  |
| 10                   | Narengenic Acid       | 56.193    | 608872  | 133.194 | mg/L  |

**Tablo 19.** (+) Tr3 HBE ana kimyasal bileşimlerinin gözlemlendiği alıkonma zamanları ve konsantrasyonları (ekran görüntüsü)

1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

| Quantitative Results |                       |           |         |         |       |
|----------------------|-----------------------|-----------|---------|---------|-------|
| PDA                  |                       |           |         |         |       |
| ID#                  | Name                  | Ret. Time | Area    | Conc.   | Units |
| 1                    | Gallic Acid           | 8.021     | 381949  | 8.098   | mg/L  |
| 2                    | 4-Hydroxybenzoic Acid | 14.051    | 265339  | 3.153   | mg/L  |
| 3                    | Chlorogenic Acid      | 20.929    | 392202  | 4.118   | mg/L  |
| 4                    | Vanillic Acid         | 24.461    | 5128    | 0.265   | mg/L  |
| 5                    | Caffeic Acid          | 26.307    | 434858  | 9.605   | mg/L  |
| 6                    | Ellagic Acid          | 26.980    | 105387  | 0.689   | mg/L  |
| 7                    | p-Cumaric Acid        | 38.077    | 273246  | 12.567  | mg/L  |
| 8                    | Ferrulic Acid         | 41.146    | 1533393 | 39.151  | mg/L  |
| 9                    | Cathesine             | 47.945    | 517653  | 37.306  | mg/L  |
| 10                   | Narengenic Acid       | 56.137    | 946571  | 207.067 | mg/L  |

**Tablo 20.** (+) Tr4 HBE ana kimyasal bileşimlerinin gözlemlendiği alıkonma zamanları ve konsantrasyonları (ekran görüntüsü)

1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

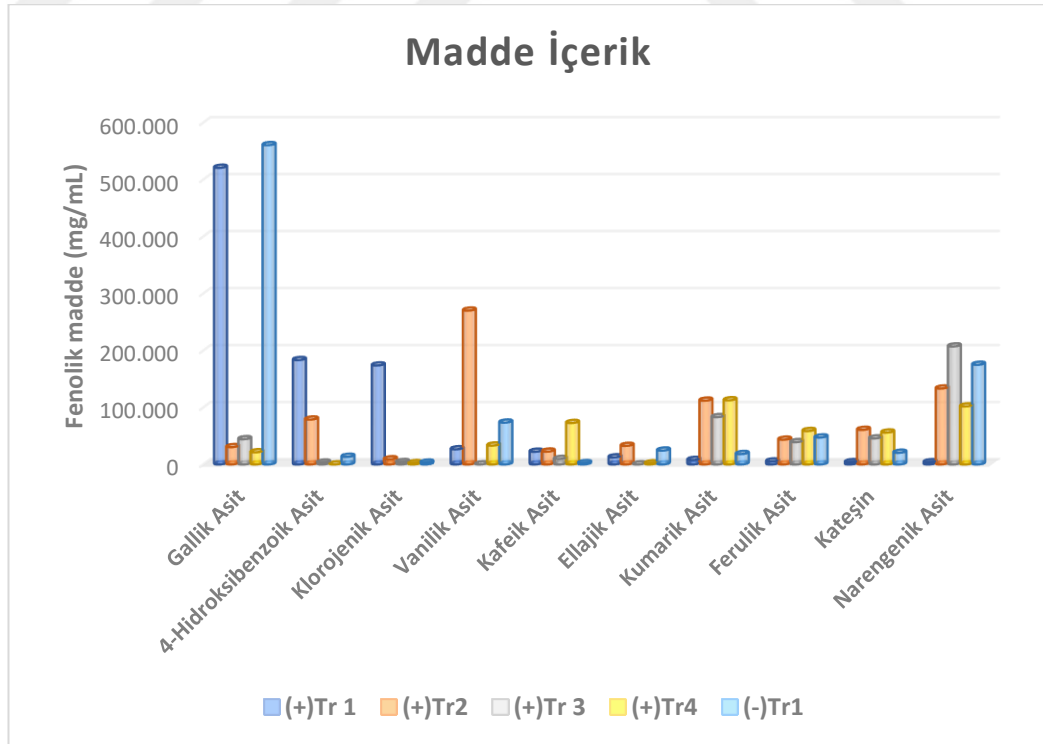
| Quantitative Results |                       |           |         |         |       |
|----------------------|-----------------------|-----------|---------|---------|-------|
| PDA                  |                       |           |         |         |       |
| ID#                  | Name                  | Ret. Time | Area    | Conc.   | Units |
| 1                    | Gallic Acid           | 8.244     | 1006458 | 21.338  | mg/L  |
| 2                    | 4-Hydroxybenzoic Acid | 14.023    | 29768   | 0.354   | mg/L  |
| 3                    | Chlorogenic Acid      | 20.716    | 211012  | 2.216   | mg/L  |
| 4                    | Vanillic Acid         | 24.615    | 556064  | 28.733  | mg/L  |
| 5                    | Caffeic Acid          | 25.955    | 3292636 | 72.730  | mg/L  |
| 6                    | Ellagic Acid          | 26.894    | 217208  | 1.421   | mg/L  |
| 7                    | p-Cumaric Acid        | 37.807    | 123949  | 5.700   | mg/L  |
| 8                    | Ferrulic Acid         | 41.101    | 2295990 | 58.623  | mg/L  |
| 9                    | Cathesine             | 47.938    | 775813  | 55.911  | mg/L  |
| 10                   | Narengenic Acid       | 56.147    | 465429  | 101.815 | mg/L  |

**Tablo 21.** (-) Tr1 HBE ana kimyasal bileşimlerinin gözlemlendiği alıkonma zamanları ve konsantrasyonları (ekran görüntüsü)

1 PDA Multi 1 / 254nm 4nm

| Quantitative Results |                       |           |          |         |       |
|----------------------|-----------------------|-----------|----------|---------|-------|
| PDA                  |                       |           |          |         |       |
| ID#                  | Name                  | Ret. Time | Area     | Conc.   | Units |
| 1                    | Gallic Acid           | 8.352     | 24290660 | 560.337 | mg/L  |
| 2                    | 4-Hydroxybenzoic Acid | 14.308    | 1121568  | 13.329  | mg/L  |
| 3                    | Chlorogenic Acid      | 21.209    | 295300   | 3.101   | mg/L  |
| 4                    | Vanillic Acid         | 24.620    | 1420423  | 73.396  | mg/L  |
| 5                    | Caffeic Acid          | 26.165    | 98887    | 2.184   | mg/L  |
| 6                    | Ellagic Acid          | 27.010    | 3718851  | 24.325  | mg/L  |
| 7                    | p-Cumaric Acid        | 37.798    | 396255   | 18.224  | mg/L  |
| 8                    | Ferrulic Acid         | 41.079    | 1850855  | 47.257  | mg/L  |
| 9                    | Cathesine             | 48.026    | 283534   | 20.434  | mg/L  |
| 10                   | Narengenic Acid       | 56.060    | 799346   | 174.861 | mg/L  |

Elde edilen veriler, trüf mantar ve rizosfer bölümlerinden izole edilen LAB suşlarına ait HBE'lerin fenolik ve flavonoid madde içeriği açısından değerlendirildiğinde en yüksek oranda gallik asit içerdiğini göstermiştir. (Şekil 38).



**Şekil 38.** Hücre bağımsız ekstraktlarının ana kimyasal bileşimlerinin sonuçları

(-)Tr1 nolu izolata ait HBE'nin 560.33 mg/mL ile en yüksek gallik asit değerini içermesine rağmen klorojenik asit, kafeik asit, 4-hidroksibenzoik asit, p-kumarik asit, kateşin, ellajik asit miktarlarının düşük olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte 73.39 ve 174.86 mg/mL değerlerinde ise en yüksek ikinci seviyede (-)Tr1 nolu izolata ait HBE'nin vanilik ve naringenin içerdiği tespit edilmiştir. Gallik asit değeri en yüksek olan diğer bir HBE ise (+)Tr1 nolu izolata ait numunelerde elde edilmiştir. Ayrıca (+)Tr1 4-hidroksibenzoik asit ve klorojenik asit için en yüksek miktarı içeren HBE üreticisi olarak değerlendirilmiştir. Önemli bir aroma bileşiği olan vanilin en yüksek oranda (+)Tr2 nolu izolata ait HBE'de 269.95 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Bunu 73.3 mg/mL ile (-)Tr1, 28.73 mg/mL ile (+)Tr4, 10.18 mg/mL ile (+)Tr1, 0.27 mg/mL ile de (+)Tr3 nolu izolata ait HBE içerikleri takip etmiştir. Kafeik asit miktarı ekstraktlarda az tespit edilmekle birlikte maksimum 72.73mg/mL ile (+)Tr4 nolu izolata ait HBE 1. sırada yer almıştır. Ferulik asit ve kateşin açısından tüm ekstraktlar aynı profili sergilemiştir. (+)Tr1'de bu asitler oldukça az bulunurken, diğerlerinde ortalama 40 mg/mL civarında seyretmiştir. Naringenin ise yine (+)Tr3 nolu izolata ait HBE'de 207.06 mg/mL değerinde tespit edilmişken, bunu 174.86, 133.19 ve 101.81 mg/mL ile sırasıyla (-)Tr1, (+)Tr2 ve (+)Tr4 nolu izolatlarla ait HBE'ler takip etmiştir.

LAB suşlarının kuersetin, ferulik asit, vanilin ve gallik asit gibi birçok fenolik bileşiği farklı miktarda içerdiğini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Rupasinghe vd., 2019). Bu bakterilerin fenolik bileşik metabolizması hakkındaki bilgi, gıda bilimi ve teknolojisinde büyük bir ilgi konusu olmaya devam etmektedir. Bunun en temel nedeni ise güçlü antioksidanlar olarak yüksek katma değerli bileşenler olarak önem arz etmeleridir (Rodriguez vd., 2009). Doğal biyolojik olarak aktif polifenoller, flavanol ve kateşin gibi ürünler, diyet takviyeleri, kozmetik ve farmasötik endüstride oldukça önemli kabul edilmektedir (Quideau vd., 2011; Nadim vd., 2014; Sauer ve Plauth 2017). Kateşinler antioksidan, anti-inflamatuar, antitrombotik ve antimikrobiyal özellikler sergilemekte olup (Jochmann vd., 2008; Brown vd., 2011) uzun süredir geleneksel tıpta kullanılmaktadır (Taylor vd., 2005). Hidroksisinnamik asit (p-kumarik ve ferulik asitler) türevleri, gıda aromasında önemlidir. Bu fenolik asitlerin dekarboksilasyonu, 4-vinil fenol ve 4-vinil guayakol oluşumuna neden olur ki bunlar gıda katkı maddeleri olarak kabul edilir ve lezzetlendirici ajanlar olarak onaylanmışlardır (Rodriguez vd., 2009). Gallik asit ve türevlerinin bilimin çeşitli alanlarında çok sayıda uygulaması

bulunmaktadır. Doğada bitki ve meyvelerde yaygın olarak bulunan bu bileşikler, doğrudan veya dolaylı olarak gıda maddesi, koruyucu vb. olarak kullanılmaktadır. Depresyon, kanser, mikrobiyal enfeksiyonlar, lipitle ilişkili hastalıklar vb. kritik hastalıkların tedavisinde kullanımlarının yanı sıra antikarsinojenik, antimikrobiyal, antimutajenik, antianjiyogenik ve anti-inflamatuar ajanlar olarak da dikkat çekmektedir (Choubey vd., 2015). Ellajik asit, farklı bitki türlerinde, özellikle meyve ve sebzelerde (ve yapraklar, kök, ağaç kabuğu, çekirdek gibi diğer bitki kısımlarında) ve aynı zamanda işlenmiş gıdalarda (reçeller, alkollü ve alkolsüz içecekler) bulunan fenolik bir bileşik olup yüksek antioksidan kapasitesi nedeniyle vücudu birçok duruma karşı korumaktadır. Ellajik asit miktarı türe, numune tipine, sıcaklığa, ekstraksiyon yöntemine ve analiz yöntemine bağlı olarak farklılık göstermektedir (Stoenescu ve Trandafir, 2023).

Gıdalardan izole edilen *Lactobacillus brevis* suşlarının 15 farklı gıda fenolünü metabolize etme yeteneği üzerine bir araştırma gerçekleştirilmiştir. Sinnamik asitlere odaklanan bu çalışma, *L. brevis*'in sadece p-kumarik, ferulik ve kafeik asitleri metabolize edebildiği belirtilmiştir. (Curiel vd., 2010). Laktik asit bakterileri, organik asitler, yağ asitleri, bakteriyosinler, döngüsel dipeptitler ve fenolik bileşikler de dahil olmak üzere çeşitli antibakteriyel bileşikler metabolize edebilir.

LAB tarafından üretilen fenolik bileşiklerin gıda koruması, sağlıklı beslenme ve gıdalardaki tat ve koku profilini etkileme gibi çeşitli uygulamalarda kullanılabilir. Ancak, bu bileşiklerin miktarları ve türleri, kullanılan LAB suşlarına ve gıda matrisine bağlı olarak değişebilir (Costa vd., 2018).

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

### Kısa dönemde,

- Trüf mantarı bileşiminin ve trüf mantarı ve rizosfer örneklerinden izole edilen LAB'lara ait HBE'lerin antimikrobiyal, antioksidan ve antikanserojen etkinliği belirlenmiş ve etkin ekstraktların kantitatif kimyasal analizi yapılmıştır.
- Trüf mantarı ekstraktlarının antimikrobiyal, antioksidan ve antikanserojen etki bakımından en etkili olanı **etil asetat ekstraktı** olarak tespit edilmiştir.
- Trüf mantarı ve rizosfer örneklerinden izole edilen LAB HBE'lerinin seçilen patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitesi olan, iki hücre hattında sitotoksik etkili olanları;

(+)Tr1 *Enterococcus faecium* 11037 CHB

(+)Tr2 *Enterococcus faecium* DSM 17050 DSM

(+)Tr3 *Enterococcus faecium* 20218\_1 CHB

(+)Tr4 *Enterococcus faecium* 13589 DSM

(-)Tr1 *Lactobacillus sakei* DSM 20494 DSM olarak tespit edilmiştir.

### Uzun dönemde,

- Trüf mantarına değer kazandıran biyolojik özellikler belirlenerek sahip olduğumuz trüf türünün özgünlüğü ortaya konması,
- Yerel kültürel kimlikte var olan trüf türünün ve trüf mantarı rizosfer örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin gıda ve sağlık alanında değerlendirilerek literatüre katkı ve referans sağlaması,
- Etken maddelerin terapötik özelliklerinin bilinmesiyle, etkili bir şekilde kullanılması,
- Dış pazara ekonomik değerini daha da artıracak veri sağlaması,
- Yerel gıda ve ilaç kaynağı olarak kullanılabilmesi hedeflenmektedir.

Bu çalışma, *T. aestivum* ekstrelerinin ve ondan izole edilen LAB HBE'lerinin antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser ajanlar olarak faydalarını araştırmak amacıyla yürütülmüştür. Elde edilen veriler, trüf mantarı etil asetat ekstresinin ve trüf mantarı ile rizosfer örneklerinden izole edilen (+)Tr1 *E. faecium*, (+)Tr2 *E. faecium*, (+)Tr3 *E. faecium*, (+)Tr4 *E. faecium*, (-)Tr1 *L. sakei* laktik asit bakterileri suşlarının fenolik bileşikler açısından zengin olduğunu ve HT-29, Hep40 kanser hücre hatları üzerinde doza

bağlı olarak sitotoksik etki sergilediğini ortaya koymuştur. Trüf mantarı etil asetat ekstresi, antimikrobiyal etkisinin yanı sıra iki kanser hücre hattında da sitotoksik etki göstererek antikanserojen özellikler açısından en yüksek etkiyi sergilemiştir. Antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser etkileri dikkate alındığında trüf mantar ekstraktları ile izole edilen suşlara ait HBE'lerin doğal etken madde olarak kullanım potansiyeline sahip oldukları tespit edilmiştir. Antioksidan aktivite ile toplam fenolik madde ve flavonoid içeriği arasında bir ilişki bulunmaktadır. Trüf etil asetat ekstresi, izole edilen LAB'ların HBE'leri birçok hastalığı önleyebilecek doğal bir antioksidan kaynağıdır ve gıda ve ilaç endüstrisinde potansiyel olarak kullanılabilir. LAB suşlarının geniş etkinliği göz önüne alındığında, ilaçlara dirençli patojen suşlarının biyokontrolünde kullanılabileceği anlaşılmaktadır. Hala keşfedilmemiş pek çok doğal kaynaklı potansiyel ilaç vardır, bu da yeni veya daha az bilinen terapötik bileşiklerin keşfi için geniş bir alan olduğunu göstermektedir (Aly vd., 2011).

## 6. KAYNAKLAR

(Bu tez çalışmasında APA atıf sistemi kullanılmıştır.)

- Adebayo, E. A., Oloke, J. K., Ayandele, A. A., & Adegunlola, C. O. (2012). Phytochemical, antioxidant and antimicrobial assay of mushroom metabolite from *Pleurotus pulmonarius*-LAU 09 (JF736658). *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2(2), 366-374.
- Ahmed, M. (2020). Colon cancer: a clinician's perspective in 2019. *Gastroenterology Research*, 13(1), 1.
- Akyüz, M. (2013). Nutritive value, flavonoid content and radical scavenging activity of the truffle (*Terfezia boudieri* Chatin). *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13(1), 143-151.
- Al Obaydi, M. F., Hamed, W. M., Al Kury, L. T., & Talib, W. H. (2020). *Terfezia boudieri*: a desert truffle with anticancer and immunomodulatory activities. *Frontiers in Nutrition*, 7, 38.
- Al-Hazmi, N. E., & Naguib, D. M. (2024). Antioxidant and antibacterial activities of nano-probiotics versus free probiotics against gastrointestinal pathogenic bacteria. *Indian Journal of Microbiology*, 64(1), 141-152.
- Alirezalu, K., Azadmard-Damirchi, S., Achachlouei, B. F., Hesari, J., Emaratpardaz, J., & Tavakolian, R. (2016). Physicochemical properties and nutritional composition of black truffles grown in Iran. *Chemistry of Natural Compounds*, 52(2), 290-293.
- Aljohani, A. B., Al-Hejin, A. M., & Shori, A. B. (2023). Bacteriocins as promising antimicrobial peptides, definition, classification, and their potential applications in cheeses. *Food Science and Technology*, 43, e118021.
- Al-Laith, A. A. A. (2010). Antioxidant components and antioxidant/antiradical activities of desert truffle (*Tirmania nivea*) from various Middle Eastern origins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(1), 15-22.
- Altuner, E. M., Canli, K., & Akata, I. (2014). Antimicrobial screening of *Calliergonella cuspidata*, *Dicranum polysetum* and *Hypnum cupressiforme*. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 8(1), 539-545.
- Aly, A. H., Debbab, A., & Proksch, P. (2011). Fifty years of drug discovery from fungi. *Fungal Diversity*, 50, 3-19.
- Amin, M., Jorfi, M., Khosravi, A. D., Samarbafzadeh, A. R., & Sheikh, A. F. (2009). Isolation and identification of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* from plants by PCR and detection of their antibacterial activity. *Journal of Biological Sciences*, 9(8), 810-814.
- Andino, A., & Hanning, I. (2015). *Salmonella enterica*: survival, colonization, and virulence differences among serovars. *The Scientific World Journal*, 2015.
- Angelini, P., Tirillini, B., Properzi, A., Rol, C., & Venanzoni, R. (2015). Identification and bioactivity of the growth inhibitors in *Tuber* spp. methanolic extracts. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 149(6), 1000-1009.
- Arts, I. C. W. ve Hollman, P. C. H. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *American Journal of Chemical Nutrition*, 81, 317-25.
- Asadzadegan, R., Haratian, N., Sadeghi, M., Maroufizadeh, S., Mobayen, M., Sedigh Ebrahim Saraei, H., & Hasannejad-Bibalan, M. (2023). Antibiofilm and antimicrobial activity of *Lactobacillus* cell

- free supernatant against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wounds. *International Wound Journal*, 20(10), 4112-4121.
- Aspray, T. J., Frey-Klett, P., Jones, J. E., Whipps, J. M., Garbaye, J., & Bending, G. D. (2006). Mycorrhization helper bacteria: a case of specificity for altering ectomycorrhiza architecture but not ectomycorrhiza formation. *Mycorrhiza*, 16(8), 533-541.
- Attia, W. Y., El-Naggar, R. E., Bawadekji, A., & Al Ali, M. (2018). Evaluation of some in vitro anti-carcinogenic activities of polysaccharides extracted from Ascomata of the desert truffle *Terfezia clavervii* Chatin. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, 8(2), 152-159.
- Aubuchon, E. D. (2006). *Survival of freeze-dried probiotics in soy protein powder*. (Doctoral dissertation, University of Missouri Columbia).
- Aura, A. M. (2008). Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochemistry Reviews*, 7, 407-429.
- Bakrim, S., El Omari, N., El Hachlafi, N., Bakri, Y., Lee, L. H., & Bouyahya, A. (2022). Dietary phenolic compounds as anticancer natural drugs: recent update on molecular mechanisms and clinical trials. *Foods*, 11(21), 3323.
- Barba-Vidal, E., Martín-Orúe, S. M., & Castillejos, L. (2019). Practical aspects of the use of probiotics in pig production: A review. *Livestock Science*, 223, 84-96.
- Barbieri, E., Bertini, L., Rossi, I., Ceccaroli, P., Saltarelli, R., Guidi, C., ... & Stocchi, V. (2005). New evidence for bacterial diversity in the ascoma of the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii* Vittad. *FEMS Microbiology Letters*, 247(1), 23-35.
- Barbieri, E., Guidi, C., Bertaux, J., Frey-Klett, P., Garbaye, J., Ceccaroli, P., ... & Stocchi, V. (2007). Occurrence and diversity of bacterial communities in *Tuber magnatum* during truffle maturation. *Environmental Microbiology*, 9(9), 2234-2246.
- Beara, I. N., Lesjak, M. M., Cetojevic-Simin, D. D., Marjanovic, Z. S., Ristic, J. D., Mrkonjic, Z. O., & Mimica-Dukic, N. M. (2014). Phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities of black (*Tuber aestivum* Vittad.) and white (*Tuber magnatum* Pico) truffles. *Food Chemistry*, 165, 460-466.
- Beasley, S. S., & Saris, P. E. (2004). Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains isolated from human milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 5051-5053.
- Benucci, G. M. N., & Bonito, G. M. (2016). The truffle microbiome: species and geography effects on bacteria associated with fruiting bodies of hypogeous Pezizales. *Microbial Ecology*, 72(1), 4-8.
- Bhullar, K. S., Lagaron, N. O., McGowan, E. M., Parmar, I., Jha, A., Hubbard, B. P., & Rupasinghe, H. V. (2018). Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. *Molecular Cancer*, 17, 1-20.
- Bintsis, T., & Papademas, P. (2024). The application of protective cultures in cheese: A review. *Fermentation*, 10(3), 117.
- Bizzarro, R., Tarelli, G. T., Giraffa, G., & Neviani, E. (2000). Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from Pecorino Toscano cheese. *Italian Journal of Food Science*, 12(3), 303-316.
- Block, K. I., Gyllenhaal, C., Lowe, L., Amedei, A., Amin, A. R., Amin, A., ... & Sidransky, D. (2015). Designing a broad-spectrum integrative approach for cancer prevention and treatment. In *Seminars in Cancer Biology*, 35, 276-304.

- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- Bouatia, M., Toure, H. A., Cheikh, A., Eljaoudi, R., Rahali, Y., Idrissi, O. M. B., ... & Draoui, M. (2018). Analysis of nutrient and antinutrient content of the truffle (*Tirmania pinoyi*) from Morocco. *International Food Research Journal*, 25(1), 174-178.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424.
- Brown, A. L., Lane, J., Holyoak, C., Nicol, B., Mayes, A. E., & Dadd, T. (2011). Health effects of green tea catechins in overweight and obese men: a randomised controlled cross-over trial. *British Journal of Nutrition*, 106(12), 1880-1889.
- Buzzini, P., Gasparetti, C., Turchetti, B., Cramarossa, M. R., Vaughan-Martini, A., Martini, A., ... & Forti, L. (2005). Production of volatile organic compounds (VOCs) by yeasts isolated from the ascocarps of black (*Tuber melanosporum* Vitt.) and white (*Tuber magnatum* Pico) truffles. *Archives of Microbiology*, 184(3), 187-193.
- Campos, F. M., Couto, J. A., & Hogg, T. (2016). Utilisation of natural and by-products to improve wine safety. *Wine Safety, Consumer Preference, and Human Health*, 27-49.
- Capita, R., Felices-Mercado, A., Garcia-Fernandez, C., & Alonso-Calleja, C. (2019). Characterization of *Listeria monocytogenes* originating from the Spanish meat-processing chain. *Foods*, 8(11), 542.
- Casarica, A., Moscovici, M., Daas, M., Nicu, I., Panteli, M., & Rasit, I. (2016). A purified extract from brown truffles of the species *Terfezia clavaryi* chatin and its antimicrobial activity. *Farmacia*, 64(2), 298-301.
- Chang, F. Y., MacDonald, B. B., Peacock Jr, J. E., Musher, D. M., Triplett, P., Mylotte, J. M., ... & Victor, L. Y. (2003). A prospective multicenter study of *Staphylococcus aureus* bacteremia: incidence of endocarditis, risk factors for mortality, and clinical impact of methicillin resistance. *Medicine*, 82(5), 322-332.
- Chen, J., Li, J. M., Tang, Y. J., Xing, Y. M., Qiao, P., Li, Y., ... & Guo, S. X. (2019). Chinese black truffle-associated bacterial communities of *Tuber indicum* from different geographical regions with nitrogen fixing bioactivity. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2515.
- Chen, Y. S., Yanagida, F., & Shinohara, T. (2005). Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. *Letters in Applied Microbiology*, 40(3), 195-200.
- Chialva, M., Lanfranco, L., & Bonfante, P. (2022). The plant microbiota: composition, functions, and engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 73, 135-142.
- Choubey, S., Varughese, L. R., Kumar, V., & Beniwal, V. (2015). Medicinal importance of gallic acid and its ester derivatives: a patent review. *Pharmaceutical Patent Analyst*, 4(4), 305-315.
- Cirlincione, F., Francesca, N., Settanni, L., Donnini, D., Venturella, G., & Gargano, M. L. (2021). Microbial safety of black summer truffle collected from Sicily and Umbria Regions, Italy. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 8(1), 13-20.
- Commane, D. M., Shortt, C. T., Silvi, S., Cresci, A., Hughes, R. M., & Rowland, I. R. (2005). Effects of fermentation products of pro-and prebiotics on trans-epithelial electrical resistance in an *in vitro* model of the colon. *Nutrition & Cancer*, 51(1), 102-109.

- Cosgrove, S. E., Sakoulas, G., Perencevich, E. N., Schwaber, M. J., Karchmer, A. W., & Carmeli, Y. (2003). Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*, 36(1), 53-59.
- Costa, W. K. A., de Souza, G. T., Brandão, L. R., de Lima, R. C., Garcia, E. F., dos Santos Lima, M., ... & Magnani, M. (2018). Exploiting antagonistic activity of fruit-derived *Lactobacillus* to control pathogenic bacteria in fresh cheese and chicken meat. *Food Research International*, 108, 172-182.
- Cox, C. D., & Adams, P. A. T. R. I. C. I. A. (1985). Siderophore activity of pyoverdine for *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 48(1), 130-138.
- Crago, B., Ferrato, C., Drews, S. J., Svenson, L. W., Tyrrell, G., & Louie, M. (2012). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in food samples associated with foodborne illness in Alberta, Canada from 2007 to 2010. *Food Microbiology*, 32(1), 202-205.
- Cullere, L., Ferreira, V., Venturini, M. E., Marco, P., & Blanco, D. (2013). Potential aromatic compounds as markers to differentiate between *Tuber melanosporum* and *Tuber indicum* truffles. *Food Chemistry*, 141(1), 105-110.
- Curiel, J.A., Rodriguez, H., Landete, J.M., De las Rivas, B. and Munoz, R. (2010). Ability of *Lactobacillus brevis* strains to degrade food phenolic acids. *Food Chemistry*, 120, 225-229.
- Çalışkan, S. (2001). Bazı makrofungus türlerinin antimikrobiyal etkisi üzerine araştırmalar. (Master's thesis, Pamukkale Üniversitesi, Denizli).
- Çayan, F., Tel-Çayan, G., Deveci, E., Duru, M. E., & Türk, M. (2022). A detailed study on multifaceted bioactivities of the extracts and isolated compounds from truffle *Reddellomyces parvulosporus*. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(3), 1411-1419.
- Çevre ve Orman Bakanlığı, Türkiye Ulusal Ormancılık Programı, Ekim 2004, Ankara.
- Da Silva, A. C., Rodrigues, M. X., & Silva, N. C. C. (2020). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food and the prevalence in Brazil: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51, 347-356.
- Daba, G. M., Elkhateeb, W. A., Wen, T. C., & Thomas, P. W. (2019). The continuous story of truffle-plant interaction. *Microbiome in Plant Health and Disease: Challenges and Opportunities*. Springer, 375-383.
- Dahham, S. S., Al-Rawi, S. S., Ibrahim, A. H., Majid, A. S. A., & Majid, A. M. S. A. (2018). Antioxidant, anticancer, apoptosis properties and chemical composition of black truffle *Terfezia clavaryi*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(8), 1524-1534.
- Darsanaki, R. K., Rokhi, M. L., Aliabadi, M. A., & Issazadeh, K. (2012). Antimicrobial activities of *Lactobacillus* strains isolated from fresh vegetables. *Middle-east Journal of Scientific Research*, 11(9), 1216-1219.
- Daşkiran, M., Önel, A. G., Cengiz, Ö., Ünsal, H., Türkyılmaz, S., Tatlı, O., & Sevim, Ö. (2012). Influence of dietary probiotic inclusion on growth performance, blood parameters, and intestinal microflora of male broiler chickens exposed to posthatch holding time. *Journal of Applied Poultry Research*, 21(3), 612-622.
- De Marco, S., Sichert, M., Muradyan, D., Piccioni, M., Traina, G., Pagiotti, R., & Pietrella, D. (2018). Probiotic cell-free supernatants exhibited anti-inflammatory and antioxidant activity on human gut epithelial cells and macrophages stimulated with LPS. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018.

- De Montijo-Prieto, S., Razola-Díaz, M. D. C., Barbieri, F., Tabanelli, G., Gardini, F., Jiménez-Valera, M., ... & Gómez-Caravaca, A. M. (2023). Impact of lactic acid bacteria fermentation on phenolic compounds and antioxidant activity of avocado leaf extracts. *Antioxidants*, 12(2), 298.
- De Silva, D. D., Rapior, S., Sudarman, E., Stadler, M., Xu, J., Aisyah Alias, S., & Hyde, K. D. (2013). Bioactive metabolites from macrofungi: ethnopharmacology, biological activities and chemistry. *Fungal Diversity*, 62(1), 1-40.
- Del Mar Cendra, M., & Torrents, E. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and their partners in crime. *Biotechnology Advances*, 49, 107734.
- Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, 89(2), 271-277.
- Di Domenico, F., Foppoli, C., Coccia, R., & Perluigi, M. (2012). Antioxidants in cervical cancer: chemopreventive and chemotherapeutic effects of polyphenols. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(5), 737-747.
- Dib-Bellahouel, S., & Fortas, Z. (2011). Antibacterial activity of various fractions of ethyl acetate extract from the desert truffle, *Tirmania pinoyi*, preliminarily analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *African Journal of Biotechnology*, 10(47), 9694-9699.
- Dietrich, H., & Pour Nikfardjam, M. S. (2017). Influence of phenolic compounds and tannins on wine-related microorganisms. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, 421-454.
- Diggle, S. P., & Whiteley, M. (2020). Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology*, 166(1), 30.
- Doğan, H. H., & Aydın, S. (2013). Determination of antimicrobial effect, antioxidant activity and phenolic contents of desert truffle in Turkey. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 10(4), 52-58.
- Duanis-Assaf, D., Kenan, E., Sionov, R., Steinberg, D., & Shemesh, M. (2020). Proteolytic activity of *Bacillus subtilis* upon  $\kappa$ -Casein undermines its “caries-safe” effect. *Microorganisms*, 8(2), 221.
- Dubost, N. J., Ou, B., & Beelman, R. B. (2007). Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 105(2), 727-735.
- Duckworth, G. (2003). Controlling methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Bmj*, 327(7425), 1177-1178.
- Dundar, A., Yesil, O. F., Acay, H., Okumus, V., Ozdemir, S., & Yildiz, A. (2012). Antioxidant properties, chemical composition and nutritional value of *Terfezia boudieri* (Chatin) from Turkey. *Food Science and Technology International*, 18(4), 317-328.
- Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization), 2017. "Publishes List of Bacteria for Which New Antibiotics Are Urgently Needed" <<https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>> Erişim tarihi 26.11.2022
- Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization), 2022. "Cancer" <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>> Erişim tarihi 03.02.2023
- Egan, K., Field, D., Rea, M. C., Ross, R. P., Hill, C., & Cotter, P. D. (2016). Bacteriocins: novel solutions to age old spore-related problems?. *Frontiers in Microbiology*, 7, 461.

- El Enshasy, H., Elsayed, E. A., Aziz, R., & Wadaan, M. A. (2013). Mushrooms and truffles: historical biofactories for complementary medicine in Africa and in the middle East. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1-10.
- Elaissi, A., Salah, K. H., Mabrouk, S., Larbi, K. M., Chemli, R., & Harzallah-Skhiri, F. (2011). Antibacterial activity and chemical composition of 20 Eucalyptus species' essential oils. *Food Chemistry*, 129(4), 1427-1434.
- Elmastas, M., Turkekul, I., Ozturk, L., Gulcin, I., Isildak, O., & Aboul-Enein, H. Y. (2006). Antioxidant activity of two wild edible mushrooms (*Morchella vulgaris* and *Morchella esculanta*) from North Turkey. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 9(6), 443-448.
- FAO/WHO 2002. "Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food", London, Ontario, Canada, April 30 and May 1. <[http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/probiotics2/en/](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics2/en/)> Erişim tarihi 26.11.2023
- Fayol-Messaoudi, D., Berger, C. N., Coconnier-Polter, M. H., Lievin-Le Moal, V., & Servin, A. L. (2005). pH-, Lactic acid-, and non-lactic acid-dependent activities of probiotic Lactobacilli against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 6008-6013.
- Fernandez, M. F., Boris, S., & Barbes, C. (2003). Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 94(3), 449-455.
- Fhoula, I., Najjari, A., Turki, Y., Jaballah, S., Boudabous, A., & Ouzari, H. (2013). Diversity and antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from rhizosphere of olive trees and desert truffles of Tunisia. *BioMed Research International*, 2013, 2013.
- Frey-Klett, P., Chavatte, M., Clausse, M. L., Courrier, S., Roux, C. L., Raaijmakers, J., ... & Garbaye, J. (2005). Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytologist*, 165(1), 317-328.
- Frey-Klett, P., Pierrat, J. C., & Garbaye, J. (1997). Location and survival of mycorrhiza helper *Pseudomonas fluorescens* during establishment of ectomycorrhizal symbiosis between *Laccaria bicolor* and Douglas fir. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(1), 139-144.
- Friedman, M. (2015). Chemistry, nutrition, and health-promoting properties of *Hericium erinaceus* (Lion's Mane) mushroom fruiting bodies and mycelia and their bioactive compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(32), 7108-7123.
- Gajos, M., Ryszka, F., & Geistlinger, J. (2014). The therapeutic potential of truffle fungi: a patent survey. *Acta Mycologica*, 49(2), 305-318.
- Geloğlu, İ., Pekşen, A., & Ünal, S. (2014). Trüf mantarları. *Türkiye II. Orman Entomolojisi ve Patolojisi Sempozyumu Bildiriler Kitabı (Ed. Kaygın, AT)*, 7(9).
- Gill, H. S., Shu, Q., Lin, H., Rutherford, K. J., & Cross, M. L. (2001). Protection against translocating *Salmonella typhimurium* infection in mice by feeding the immuno-enhancing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* strain HN001. *Medical Microbiology and Immunology*, 190, 97-104.
- Gil-Ramirez, A., Aldars-Garcia, L., Palanisamy, M., Jiverdeanu, R. M., Ruiz-Rodriguez, A., Marin, F. R., ... & Soler-Rivas, C. (2013). Sterol enriched fractions obtained from *Agaricus bisporus* fruiting bodies and by-products by compressed fluid technologies (PLE and SFE). *Innovative food science & emerging technologies*, 18, 101-107.

- Giraffa, G. (1994). Microbial polysaccharides produced by lactic acid bacteria in the dairy industry. *Industrie Alimentari (Italy)*, 33(324), 295-298.
- Guan, T., Wei, X., Xu, P., Chen, K., Zou, Y., Chen, M., & Zhu, Z. (2022). Comparison of structural and antioxidant activity of polysaccharide extracted from truffles. *Journal of Food Science*, 87(7), 2999-3012.
- Guthrie, R. K. (2018). *Salmonella*. CRC press.
- Hald, T., Aspinall, W., Devleeschauwer, B., Cooke, R., Corrigan, T., Havelaar, A. H., ... & Hoffmann, S. (2016). World Health Organization estimates of the relative contributions of food to the burden of disease due to selected foodborne hazards: a structured expert elicitation. *PLoS one*, 11(1), e0145839.
- Hamad, G. M., Abdelmotilib, N. M., Darwish, A. M., & Zeitoun, A. M. (2020). Commercial probiotic cell-free supernatants for inhibition of *Clostridium perfringens* poultry meat infection in Egypt. *Anaerobe*, 62, 102181.
- Hamza, A., Jdir, H., & Zouari, N. (2016a). Nutritional, antioxidant and antibacterial properties of *Tirmania nivea*, a wild edible desert truffle from Tunisia arid zone. *Medical & Aromatic Plants*, 5(258), 2167-0412.
- Hamza, A., Zouari, N., Zouari, S., Jdir, H., Zaidi, S., Gtari, M., & Neffati, M. (2016b). Nutraceutical potential, antioxidant and antibacterial activities of *Terfezia boudieri* Chatin, a wild edible desert truffle from Tunisia arid zone. *Arabian Journal of Chemistry*, 9(3), 383-389.
- Hartman, B. J., & Tomasz, A. (1984). Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 158(2), 513-516.
- He, T., Zhu, Y. H., Yu, J., Xia, B., Liu, X., Yang, G. Y., ... & Wang, J. F. (2019). *Lactobacillus johnsonii* L531 reduces pathogen load and helps maintain short-chain fatty acid levels in the intestines of pigs challenged with *Salmonella enterica* Infantis. *Veterinary Microbiology*, 230, 187-194.
- Herrero de Aza, C., Armenteros, S., McDermott, J., Mauceri, S., Olaizola, J., Hernandez-Rodriguez, M., & Mediavilla, O. (2022). Fungal and bacterial communities in *Tuber melanosporum* plantations from northern Spain. *Forests*, 13(3), 385.
- Hiltner, L. (1904). Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft*, 98, 59-78.
- Hung, A. T., Lin, S. Y., Yang, T. Y., Chou, C. K., Liu, H. C., Lu, J. J., ... & Lien, T. F. (2012). Effects of *Bacillus coagulans* ATCC 7050 on growth performance, intestinal morphology, and microflora composition in broiler chickens. *Animal Production Science*, 52(9), 874-879.
- Ibrahim, S. A., Ayivi, R. D., Zimmerman, T., Siddiqui, S. A., Altemimi, A. B., Fidan, H., ... & Bakhshayesh, R. V. (2021). Lactic acid bacteria as antimicrobial agents: Food safety and microbial food spoilage prevention. *Foods*, 10(12), 3131.
- Jaeschke, H., Gores, G. J., Cederbaum, A. I., Hinson, J. A., Pessayre, D., & Lemasters, J. J. (2002). Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicological Sciences*, 65(2), 166-176.
- Jamuna, M., & Jeevaratnam, K. (2004). Isolation and partial characterization of bacteriocins from *Pediococcus* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 433-439.
- Janakat, S., Al-Fakhiri, S., & Sallal, A. K. (2004). A promising peptide antibiotic from *Terfezia clavervii* aqueous extract against *Staphylococcus aureus* in vitro. *Phytotherapy Research: An International*

- Jinming, G., Lin, H., & Jikai, L. (2001). A novel sterol from Chinese truffles *Tuber indicum*. *Steroids*, 66(10), 771-775.
- Jochmann, N., Baumann, G., & Stangl, V. (2008). Green tea and cardiovascular disease: from molecular targets towards human health. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 11(6), 758-765.
- Jones, D. L., Hodge, A., & Kuzyakov, Y. (2004). Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytologist*, 163(3), 459-480.
- Joshi, V. K. (Ed.). (2016). *Indigenous fermented foods of South Asia* (Vol. 7). CRC press.
- Kachouri, F., Ksontini, H., Kraiem, M., Setti, K., Mechmeche, M., & Hamdi, M. (2015). Involvement of antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* on functional properties of olive phenolic compounds. *Journal of Food Science and Technology*, 52(1), 7924-7933.
- Kalhor, M. S., Anal, A. K., Kalhor, D. H., Hussain, T., Murtaza, G., & Mangi, M. H. (2023). Antimicrobial Activities and Biopreservation Potential of Lactic Acid Bacteria (LAB) from Raw Buffalo (*Bubalus bubalis*) Milk. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2023.
- Kang, T. S., Korber, D. R., & Tanaka, T. (2013). Regulation of dual glycolytic pathways for fructose metabolism in heterofermentative *Lactobacillus panis* PM1. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(24), 7818-7826.
- Kasper, J. C., Winter, G., & Friess, W. (2013). Recent advances and further challenges in lyophilization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85(2), 162-169.
- Kaya, A. (2009). Macromycetes of Kahramanmaraş Province (Turkey). *Mycotaxon*, 108(1), 31-34.
- Khan, F. S., Hussain, I., Akram, M., & Owaid, M. N. (2022). Truffles: The cultivation and health benefits. In *Biology, Cultivation and Applications of Mushrooms* (pp. 285-300). Singapore: Springer Singapore.
- Kıvrak, İ. (2015). Analytical methods applied to assess chemical composition, nutritional value and in vitro bioactivities of *Terfezia olbiensis* and *Terfezia clavaryi* from Turkey. *Food Analytical Methods*, 8, 1279-1293.
- Kibar, B., & Pekşen, A. (2007). Ektomikorizanın tarım ve ormancılık bakımından önemi. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 22(2), 232-238.
- Kim, S., Lee, J. Y., Jeong, Y., & Kang, C. H. (2022). Antioxidant activity and probiotic properties of lactic acid bacteria. *Fermentation*, 8(1), 29.
- Konings, W. N., Kok, J., Kuipers, O. P., & Poolman, B. (2000). Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Current Opinion in Microbiology*, 3(3), 276-282.
- Kotik, M., Kulik, N., & Valentová, K. (2023). Flavonoids as aglycones in retaining glycosidase-catalyzed reactions: prospects for green chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(41), 14890-14910.
- Krieg, N. R., & Holt, J. G. (1984). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Yi Hsien Publishing Co.

- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., ... & Etherton, T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, 113(9), 71-88.
- Kroning, I. S., Iglesias, M. A., Sehn, C. P., Gandra, T. K. V., Mata, M. M., & da Silva, W. P. (2016). *Staphylococcus aureus* isolated from handmade sweets: Biofilm formation, enterotoxigenicity and antimicrobial resistance. *Food Microbiology*, 58, 105-111.
- Kumar, H., Choudhary, N., Varsha, K. N., & Suman, S. R. (2014). Phenolic compounds and their health benefits: A review. *Journal of Food Research and Technology*, 2(2), 46-59.
- Kuppusamy, P., Yusoff, M. M., Maniam, G. P., Ichwan, S. J. A., Soundharrajan, I., & Govindan, N. (2014). Nutraceuticals as potential therapeutic agents for colon cancer: a review. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 4(3), 173-181.
- Kurt, R., Karayılmazlar, S., İmren, E., & Cabuk, Y. (2016). Non-wood forest products in Turkey forestry sector: export analysis. *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 18(2), 158-167.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., & Gobbetti, M. (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 4084-4090.
- Le Tacon, F. (2016). Influence of climate on natural distribution of Tuber species and truffle production. *True Truffle (Tuber spp.) in the World: Soil Ecology, Systematics and Biochemistry*, 153-167.
- Lee, A. S., De Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., & Harbarth, S. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 1-23.
- Lee, H., Nam, K., Zahra, Z., & Farooqi, M. Q. U. (2020). Potentials of truffles in nutritional and medicinal applications: A review. *Fungal Biology and Biotechnology*, 7(1), 1-17.
- Lee, M. R., Tsai, C. J., Teng, S. H., & Hsueh, P. R. (2015). Identification of *Weissella* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1246.
- Lee, S., Cetinkaya, F., & Soyutemiz, G. E. (2007). Occurrence of *Listeria* species in the processing stages of frozen pepper. *Journal of Food Safety*, 27(2), 134-147.
- Lew, S. Y., Teoh, S. L., Lim, S. H., Lim, L. W., & Wong, K. H. (2020). Discovering the potentials of medicinal mushrooms in combating depression-A review. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 20(15), 1518-1531.
- Li, J. M., Liang, H. Q., Qiao, P., Su, K. M., Liu, P. G., Guo, S. X., & Chen, J. (2019). Chemical composition and antioxidant activity of *Tuber indicum* from different geographical regions of China. *Chemistry & Biodiversity*, 16(3), e1800609.
- Li, T., Han, L., Ma, S., Lin, W., Ba, X., Yan, J., ... & Qin, K. (2023). Interaction of gut microbiota with the tumor microenvironment: A new strategy for antitumor treatment and traditional Chinese medicine in colorectal cancer. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 10, 1140325.
- Lim, J. Y., Yoon, J. W., & Hovde, C. J. (2010). A brief overview of *Escherichia coli* O157: H7 and its plasmid O157. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(1), 5.
- Linares, D. M., Gómez, C., Renes, E., Fresno, J. M., Tornadijo, M. E., Ross, R. P., & Stanton, C. (2017). Lactic acid bacteria and bifidobacteria with potential to design natural biofunctional health-promoting dairy foods. *Frontiers in Microbiology*, 8, 846.

- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727-747.
- Mandeel, Q. A., & Al-Laith, A. A. A. (2007). Ethnomycological aspects of the desert truffle among native Bahraini and non-Bahraini peoples of the Kingdom of Bahrain. *Journal of Ethnopharmacology*, 110(1), 118-129.
- Marchwinska, K., & Gwiazdowska, D. (2022). Isolation and probiotic potential of lactic acid bacteria from swine feces for feed additive composition. *Archives of Microbiology*, 204(1), 61.
- Marcone, S., Belton, O., & Fitzgerald, D. J. (2017). Milk-derived bioactive peptides and their health promoting effects: a potential role in atherosclerosis. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 83(1), 152-162.
- Markman, J. L., & Shiao, S. L. (2015). Impact of the immune system and immunotherapy in colorectal cancer. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 6(2), 208-223.
- Martillanes, S., Rocha-Pimienta, J., Cabrera-Bañegil, M., Martín-Vertedor, D., & Delgado-Adámez, J. (2017). Application of phenolic compounds for food preservation: Food additive and active packaging. *Phenolic Compounds-Biological Activity*, 3(8), 39-58.
- Martin, I., Barbosa, J., Pereira, S. I., Rodríguez, A., Córdoba, J. J., & Teixeira, P. (2023). Study of lactic acid bacteria isolated from traditional ripened foods and partial characterization of their bacteriocins. *LWT*, 173, 114300.
- Mataragas, M., Drosinos, E. H., & Metaxopoulos, J. (2003). Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4±2 °C. *Food Microbiology*, 20(2), 259-265.
- Mead, P. S., & Griffin, P. M. (1998). *Escherichia coli* O157: H7. *The Lancet*, 352(9135), 1207-1212.
- Meade, E., Slattery, M. A., & Garvey, M. (2020). Bacteriocins, potent antimicrobial peptides and the fight against multi drug resistant species: resistance is futile?. *Antibiotics*, 9(1), 32.
- Medellin-Pena, M. J., Wang, H., Johnson, R., Anand, S., & Griffiths, M. W. (2007). Probiotics affect virulence-related gene expression in *Escherichia coli* O157: H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(13), 4259-4267.
- Meloni, D. (2014). Focusing on the main morphological and physiological characteristics of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Journal of Veterinary Science and Research*, in-press.
- Minatel, I. O., Borges, C. V., Ferreira, M. I., Gomez, H. A. G., Chen, C. Y. O., & Lima, G. P. P. (2017). Phenolic compounds: Functional properties, impact of processing and bioavailability. *Phenolic Compounds: Biological Activity*, 8, 1-24.
- Molujin, A. M., Abbasiliasi, S., Nurdin, A., Lee, P. C., Gansau, J. A., & Jawan, R. (2022). Bacteriocins as potential therapeutic approaches in the treatment of various cancers: A review of in vitro studies. *Cancers*, 14(19), 4758.
- Mookiah, S., Sieo, C. C., Ramasamy, K., Abdullah, N., & Ho, Y. W. (2014). Effects of dietary prebiotics, probiotic and synbiotics on performance, caecal bacterial populations and caecal fermentation concentrations of broiler chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(2), 341-348.
- Müller, H. E. (1988). Listeriosis in animals. *İnfeksiyon*, 2(4), 505-519.

- Naber, C. K. (2009). Staphylococcus aureus bacteremia: epidemiology, pathophysiology, and management strategies. *Clinical infectious diseases*, 48(Supplement\_4), S231-S237.
- Nadim, M., Auriol, D., Lamerant-FayeL, N., Lefèvre, F., Dubanet, L., Redziniak, G., ... & Grillon, C. (2014). Improvement of polyphenol properties upon glucosylation in a UV-induced skin cell ageing model. *International Journal of Cosmetic Science*, 36(6), 579-587.
- Narvhus, J. A., & Axelsson, L. (2003). Lactic acid bacteria. 3465-3472.
- Nelson, R. E., Jones, M., Liu, C. F., Samore, M. H., Evans, M. E., Graves, N., ... & Rubin, M. A. (2015). The impact of healthcare-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections on post-discharge healthcare costs and utilization. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 36(5), 534-542.
- Niba, A. T., Beal, J. D., Kudi, A. C., & Brooks, P. H. (2009). Bacterial fermentation in the gastrointestinal tract of non-ruminants: influence of fermented feeds and fermentable carbohydrates. *Tropical Animal Health and Production*, 41(7), 1393-1407.
- Noori, S. M. A., Behfar, A., Saadat, A., Ameri, A., Yazdi, S. S. A., & Siahpoosh, A. (2023). Antimicrobial and antioxidant properties of natural postbiotics derived from five lactic acid bacteria. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 18(1).
- Noroozi, E., Tebianian, M., Taghizadeh, M., Dadar, M., & Mojgani, N. (2021). Anticarcinogenic potential of probiotic, postbiotic metabolites and paraprobiotics on human cancer cells. *Probiotic Bacteria and Postbiotic Metabolites: Role in Animal and Human Health*, 153-177.
- Onbas, T., Osmanagaoglu, Ö., & Kiran, F. (2019). Potential properties of Lactobacillus plantarum F-10 as a bio-control strategy for wound infections. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(4), 1110-1123.
- Ondusko, D. S., & Nolt, D. (2018). Staphylococcus aureus. *Pediatrics In Review*, 39(6), 287-298.
- Oppegard, C., Rogne, P., Emanuelsen, L., Kristiansen, P. E., Fimland, G., & Nissen-Meyer, J. (2007). The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *Microbial Physiology*, 13(4), 210-219.
- Orman Genel Müdürlüğü. 2017. "Dünya Bankası Türkiye Ormancılık Politika Belgesi-2017".
- Orman Genel Müdürlüğü. 2020. "General Directorate of Forestry Strategic Plan 2019-2023".
- Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Orman Genel Müdürlüğü. 2014. "Trüf Ormanı Eylem Planı 2014-2018".
- Ou, S., & Kwok, K. C. (2004). Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(11), 1261-1269.
- Pacioni, G., Leonardi, M., Aimola, P., Ragnelli, A. M., Rubini, A., & Paolocci, F. (2007). Isolation and characterization of some mycelia inhabiting *Tuber ascomata*. *Mycological Research*, 111(12), 1450-1460.
- Pahumunto, N., & Teanpaisan, R. (2023). Anti-cancer properties of potential probiotics and their cell-free supernatants for the prevention of colorectal cancer: An in vitro study. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 15(5), 1137-1150.
- Palanisamy, M., Aldars-García, L., Gil-Ramirez, A., Ruiz-Rodriguez, A., Marín, F. R., Reglero, G., & Soler-Rivas, C. (2014). Pressurized water extraction of  $\beta$ -glucan enriched fractions with bile acids-binding capacities obtained from edible mushrooms. *Biotechnology Progress*, 30(2), 391-400.

- Panel, E. B. (2020). The 2019 updated list of QPS status recommended biological agents in support of EFSA risk assessments. *EFSA Journal*, 18, 5966.
- Park, C. M., Kim, G. M., & Cha, G. S. (2021). Biotransformation of flavonoids by newly isolated and characterized *Lactobacillus pentosus* NG101 strain from kimchi. *Microorganisms*, 9(5), 1075.
- Patel, S. (2012). Food, health and agricultural importance of truffles: a review of current scientific literature. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 6(1), 15-27.
- Patel, S., & Goyal, A. (2012). Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. *3 Biotech*, 2(1), 1-15.
- Patel, S., Rauf, A., Khan, H., Khalid, S., & Mubarak, M. S. (2017). Potential health benefits of natural products derived from truffles: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 70, 1-8.
- Pessione, E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 86.
- Piggot, P. J. (2009). *Bacillus subtilis*. M. Schaechter (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)* (ss. 45-56). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00036-5>
- Portella, A. C. F., Karp, S., Scheidt, G. N., Woiciechowski, A. L., Parada, J. L., & Soccol, C. R. (2009). Modelling antagonistic effect of lactic acid bacteria supernatants on some pathogenic bacteria. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52, 29-36.
- Qadi, W. S., Mediani, A., Kasim, Z. M., Misnan, N. M., Sani, N. A., & Jamar, N. H. (2023). Biological characterization and metabolic variations among cell-free supernatants produced by selected plant-based lactic acid bacteria. *Metabolites*, 13(7), 849.
- Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., ... & Wu, M. (2022). *Pseudomonas aeruginosa*: Pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 199.
- Qing, Y., Ji, L., Li, T. X., Li, X. L., Liu, C. Y., Yang, M., & Lin-Yong, Z. (2015). Topographical and pedological factors adapted to the growth of domestic truffles (*Tuber indicum*). *Ying yong sheng tai xue bao= The Journal of Applied Ecology*, 26(6), 1793-1800.
- Quandt, C. A., Kohler, A., Hesse, C. N., Sharpton, T. J., Martin, F., & Spatafora, J. W. (2015). Metagenome sequence of *Elaphomyces granulatus* from sporocarp tissue reveals Ascomycota ectomycorrhizal fingerprints of genome expansion and a Proteobacteria-rich microbiome. *Environmental Microbiology*, 17(8), 2952-2968.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységu, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(3), 586-621.
- Rajoka, M. S. R., Zhao, H., Mehwish, H. M., Li, N., Lu, Y., Lian, Z., ... & Shi, J. (2019). Anti-tumor potential of cell free culture supernatant of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from human breast milk. *Food research international*, 123, 286-297.
- Rangel, J. M., Sparling, P. H., Crowe, C., Griffin, P. M., & Swerdlow, D. L. (2005). Epidemiology of *Escherichia coli* O157: H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerging Infectious Diseases*, 11(4), 603.
- Richardson, D. B., Cardis, E., Daniels, R. D., Gillies, M., O'Hagan, J. A., Hamra, G. B., ... & Kesminiene, A. (2015). Risk of cancer from occupational exposure to ionising radiation: retrospective cohort

- study of workers in France, the United Kingdom, and the United States (INWORKS). *British Medical Journal*, 351.
- Rodriguez, H., Curiel, J. A., Landete, J. M., de las Rivas, B., de Felipe, F. L., Gomez-Cordovés, C., ... & Muñoz, R. (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 132(2-3), 79-90.
- Rossi, E., La Rosa, R., Bartell, J. A., Marvig, R. L., Haagenzen, J. A., Sommer, L. M., ... & Johansen, H. K. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis. *Nature Reviews Microbiology*, 19(5), 331-342.
- Roy, R., & Singh, S. K. (2024). Microbiome modulates immune system to influence cancer therapy. *Cancers*, 16(4), 779.
- Rupasinghe, H. P., Parmar, I., & Neir, S. V. (2019). Biotransformation of cranberry proanthocyanidins to probiotic metabolites by *Lactobacillus rhamnosus* enhances their anticancer activity in HepG2 cells in vitro. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.
- Rupasinghe, H. V., Nair, S. V., & Robinson, R. A. (2014). Chemopreventive properties of fruit phenolic compounds and their possible mode of actions. *Studies in Natural Products Chemistry*, 42, 229-266.
- Rwubuzizi, R., Kim, H., Holzapfel, W. H., & Todorov, S. D. (2023). Beneficial, safety, and antioxidant properties of lactic acid bacteria: A next step in their evaluation as potential probiotics. *Heliyon*, 9(4).
- Saadatzadeh, A., Fazeli, M. R., Jamalifar, H., & Dinarvand, R. (2013). Probiotic properties of lyophilized cell free extract of *Lactobacillus casei*. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 8(3), 131.
- Saddiq, A. A., & Danial, E. N. (2012). Assessment of phenolic content, free radical-scavenging capacity and antimicrobial activities of Truffle *claveryi*. *Wulfenia J*, 19(9), 403-422.
- Saleh, I., Alwan, N., Barbour, E., Azhar, E., & Harakeh, S. (2012). *Listeria* infections: epidemiology, pathogenesis and treatment. *Listeria Infections: Epidemiology, Pathogenesis and Treatment* (ss. 155-166).
- Salkinoja-Salonen, M. S., Vuorio, R., Andersson, M. A., Kampfer, P., Andersson, M. C., Honkanen-Buzalski, T., & Scoging, A. (1999). Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4637-4645.
- Sauer, S., & Plauth, A. (2017). Health-beneficial nutraceuticals—myth or reality?. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 951-961.
- Savadogo, A., Cheik, A.T.O., Bassole, H.N.I. and Traore, A.S. (2004). Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina faso fermented milk. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3; 1174-1179.
- Savini, S., Loizzo, M. R., Tundis, R., Mozzon, M., Foligni, R., Longo, E., ... Boselli, E. (2017). Fresh refrigerated *Tuber melanosporum* truffle: Effect of the storage conditions on the antioxidant profile, antioxidant activity and volatile profile. *European Food Research and Technology*, 243(12), 2255-2263.
- Sawaya, W. N., Al-Shalhat, A., Al-Sogair, A., & Al-Mohammad, M. (1985). Chemical composition and nutritive value of truffles of Saudi Arabia. *Journal of Food Science*, 50(2), 450-453.

- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), 287-306.
- Schillaci, D., Arizza, V., Davino, S., Gargano, M. L., & Venturella, G. (2015). Antimicrobial Activity of the Desert Truffles " *Tirmania pinoyi*" and " *Terfezia clavaryi*" Against Human Pathogens. In *The 8th International Medicinal Mushrooms Conference. " Medicinal Mushrooms: Entrepreneurial opportunities for young people and Healthcare trends in the 21st Century* (pp. 169-169). COL.
- Schlech III, W. F. (2019). Epidemiology and clinical manifestations of *Listeria monocytogenes* infection. *Microbiology Spectrum*, 7(3), 7-3.
- Shamloo, E., Hosseini, H., Moghadam, Z. A., Larsen, M. H., Haslberger, A., & Alebouyeh, M. (2019). Importance of *Listeria monocytogenes* in food safety: A review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 20(4), 241.
- Sharma, H., Ozogul, F., Bartkiene, E., & Rocha, J. M. (2023). Impact of lactic acid bacteria and their metabolites on the techno-functional properties and health benefits of fermented dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(21), 4819-4841.
- Shen, A., & Higgins, D. E. (2006). The MogR transcriptional repressor regulates nonhierarchal expression of flagellar motility genes and virulence in *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathogens*, 2(4), e30.
- Shokryazdan, P., Jahromi, M. F., Liang, J. B., Sieo, C. C., Kalavathy, R., Idrus, Z., & Ho, Y. W. (2017). In vitro assessment of bioactivities of *Lactobacillus* strains as potential probiotics for humans and chickens. *Journal of Food Science*, 82(11), 2734-2745.
- Silbergleit, M., Vasquez, A. A., Miller, C. J., Sun, J., & Kato, I. (2020). Oral and intestinal bacterial exotoxins: potential linked to carcinogenesis. *Progress in Molecular Biology And Translational Science*, 171, 131-193.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Siskovic, N., Strojnik, L., Grebenc, T., Vidrih, R., & Ogrinc, N. (2021). Differentiation between species and regional origin of fresh and freeze-dried truffles according to their volatile profiles. *Food Control*, 123, 107698.
- Skjermo, J., & Vadstein, O. (1999). Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture*, 177(1-4), 333-343.
- Smiderle, F. R., Morales, D., Gil-Ramirez, A., de Jesus, L. I., Gilbert-Lopez, B., Iacomini, M., & Soler-Rivas, C. (2017). Evaluation of microwave-assisted and pressurized liquid extractions to obtain  $\beta$ -d-glucans from mushrooms. *Carbohydrate polymers*, 156, 165-174.
- Solak, M. H. (2007). *Macrofungi of Turkey: Checklist*. İZMİR.
- Sornsenee, P., Chatatikun, M., Mitsuwan, W., Kongpol, K., Kooltheat, N., Sohbenalee, S., ... & Romyasamit, C. (2021). Lyophilized cell-free supernatants of *Lactobacillus* isolates exhibited antibiofilm, antioxidant, and reduces nitric oxide activity in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *PeerJ*, 9, e12586.
- Stoenescu, A. M., & Trandafir, I. (2023). Ellagic acid: A review on natural sources and medicinal importance. *Annals Of The University of Craiova, Biology, Horticulture, Food products processing technology, Environmental engineering*, 28(64).

- Stojkovic, D., Reis, F. S., Ferreira, I. C., Barros, L., Glamoclija, J., Ciric, A., ... & Sokovic, M. (2013). *Tirmania pinoyi*: Chemical composition, in vitro antioxidant and antibacterial activities and in situ control of *Staphylococcus aureus* in chicken soup. *Food Research International*, 53(1), 56-62.
- Su, C., & Brandt, L. J. (1995). *Escherichia coli* O157: H7 infection in humans. *Annals of Internal Medicine*, 123(9), 698-707.
- Tagg, J., & McGiven, A. (1971). Assay system for bacteriocins. *Applied Microbiology*, 21(5), 943.
- Takatsuka, M., Goto, S., Kobayashi, K., Otsuka, Y., & Shimada, Y. (2022). Evaluation of pure antioxidative capacity of antioxidants: ESR spectroscopy of stable radicals by DPPH and ABTS assays with singular value decomposition. *Food Bioscience*, 48, 101714.
- Talib, W. H. (2017a). Consumption of garlic and lemon aqueous extracts combination reduces tumor burden by angiogenesis inhibition, apoptosis induction, and immune system modulation. *Nutrition*, 43, 89-97.
- Talib, W. H. (2017b). Regressions of breast carcinoma syngraft following treatment with piperine in combination with thymoquinone. *Scientia Pharmaceutica*, 85(3), 27.
- Talib, W. H., & Abukhader, M. M. (2013). Combinatorial effects of thymoquinone on the anticancer activity and hepatotoxicity of the prodrug CB 1954. *Scientia Pharmaceutica*, 81(2), 519-530.
- Tao, L., Song, P., Shao, L., Gao, H., Ji, K., Ren, Y., ... & Wang, M. (2024). miR-129-2-3p inhibits colon cancer cell proliferation by down-regulating the expression of BZW1. *Arab Journal of Gastroenterology*.
- Tarım ve Orman Bakanlığı, Orman Genel Müdürlüğü. 2022. "Trüf Ormanı Eylem Planı 2022-2026", 58.
- Taylor, P. W., Hamilton-Miller, J. M., & Stapleton, P. D. (2005). Antimicrobial properties of green tea catechins. *Food Science and Technology Bulletin*, 2, 71.
- Tejedor-Calvo, E., Amara, K., Reis, F. S., Barros, L., Martins, A., Calhelha, R. C., ... & Ferreira, I. C. (2021). Chemical composition and evaluation of antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of Tuber and Terfezia truffles. *Food Research International*, 140, 110071.
- Tejedor-Calvo, E., Garcia-Barreda, S., Dambolena, J. S., Pelissero, D., Sánchez, S., Marco, P., & Nouhra, E. (2023). Aromatic profile of black truffle grown in Argentina: Characterization of commercial categories and alterations associated to maturation, harvesting date and orchard management practices. *Food Research International*, 173, 113300.
- Tejedor-Calvo, E., García-Barreda, S., Sánchez, S., Morte, A., Siles-Sánchez, M. D. L. N., Soler-Rivas, C., ... & Marco, P. (2022). Application of pressurized liquid extractions to obtain bioactive compounds from *Tuber aestivum* and *Terfezia clavaryi*. *Foods*, 11(3), 298.
- Tetik, N., Rayaman, P., Rayaman, E., & Adaleti, R. (2023). Antimicrobial effect of probiotic microorganisms on clinical and standard *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Research in Pharmacy*, 27(6).
- Thomas, P., Elkhateeb, W., & Daba, G. (2021). Industrial applications of truffles and truffle-like fungi. In *Advances in Macrofungi* (pp. 82-88). CRC Press.
- Todorov, S. D., Vaz-Velho, M., de Melo Franco, B. D. G., & Holzapfel, W. H. (2013). Partial characterization of bacteriocins produced by three strains of *Lactobacillus sakei*, isolated from salpicao, a fermented meat product from North-West of Portugal. *Food Control*, 30(1), 111-121.

- Todorov, S., Onno, B., Sorokine, O., Chobert, J. M., Ivanova, I., & Dousset, X. (1999). Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough. *International Journal of Food Microbiology*, 48(3), 167-177.
- Tong, S. Y., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler Jr, V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603-661.
- Toushik, S. H., Kim, K., Park, S. H., Park, J. H., Ashrafudoulla, M., Ulrich, M. S. I., ... & Ha, S. D. (2023). Prophylactic efficacy of *Lactobacillus curvatus* B67-derived postbiotic and quercetin, separately and combined, against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* ser. Typhimurium on processed meat sausage. *Meat Science*, 197, 109065.
- Trias Mansilla, R., Bañeras Vives, L., Montesinos Seguí, E., & Badosa Romañó, E. (2008). Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *International Microbiology*, 11, 231-236.
- Turati, F., Rossi, M., Pelucchi, C., Levi, F., & La Vecchia, C. (2015). Fruit and vegetables and cancer risk: a review of southern European studies. *British Journal of Nutrition*, 113(2), 102-110.
- Vahdani, M., Rastegar, S., Rahimizadeh, M., Ahmadi, M., & Karmostaji, A. (2017). Physicochemical characteristics, phenolic profile, mineral and carbohydrate contents of two truffle species. *Journal of Agricultural Sciences Technology*, 19, 1091-1101.
- Vahdatzadeh, M., Deveau, A., & Splivallo, R. (2015). The role of the microbiome of truffles in aroma formation: a meta-analysis approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(20), 6946-6952.
- Vazquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., ... & Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 584-640.
- Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K. H., Ehrenreich, P., ... & Gottschalk, G. (2004). The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *Microbial Physiology*, 7(4), 204-211.
- Villares, A., García-Lafuente, A., Guillamon, E., & Ramos, A. (2012). Identification and quantification of ergosterol and phenolic compounds occurring in Tuber spp. truffles. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26(1-2), 177-182.
- Vitrac, X., Monti, J. P., Vercauteren, J., Deffieux, G., & Mérillon, J. M. (2002). Direct liquid chromatographic analysis of resveratrol derivatives and flavanonols in wines with absorbance and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 458(1), 103-110.
- Wang, S., & Marcone, M. F. (2011). The biochemistry and biological properties of the world's most expensive underground edible mushroom: Truffles. *Food Research International*, 44(9), 2567-2581.
- Wasser, S. P., & Didukh, M. Y. (2004). Dietary supplements from culinary-medicinal mushrooms: a variety of regulations and safety concerns for the 21 st century. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 6(3), 231-248.
- Wisnuwardhani, P. H., Ningrum, R. A., Mustopa, A. Z., Vanggi, L. R., & Kusdianawati, K. K. (2021). Antioxidant and cytotoxic activities of lactic acid bacteria on colorectal cancer WiDr cell line. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 12(1), 28-36.

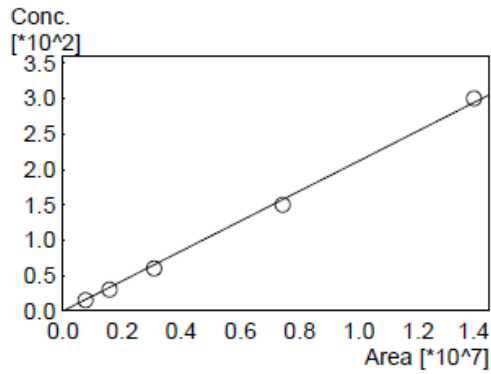
- Wu, Z., Meenu, M., & Xu, B. (2021). Nutritional value and antioxidant activity of Chinese black truffle (*Tuber indicum*) grown in different geographical regions in China. *LWT*, 135, 110226.
- Xin, J., Zeng, D., Wang, H., Sun, N., Zhao, Y., Dan, Y., ... & Ni, X. (2020). Probiotic *Lactobacillus johnsonii* BS15 promotes growth performance, intestinal immunity, and gut microbiota in piglets. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(1), 184-193.
- Yan, X., Wang, Y., Sang, X., & Fan, L. (2017). Nutritional value, chemical composition and antioxidant activity of three Tuber species from China. *AMB Express*, 7(1), 1-8.
- Yibar, A., Cetinkaya, F., & Soyutemiz, G. E. (2012). Detection of rope-producing Bacillus in bread and identification of isolates to species level by Vitek 2 System. *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 6(18).
- Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., & Piao, G. (2016). The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules*, 21(5), 559.
- Zhao, W., Wang, X. H., Li, H. M., Wang, S. H., Chen, T., Yuan, Z. P., & Tang, Y. J. (2014). Isolation and characterization of polysaccharides with the antitumor activity from Tuber fruiting bodies and fermentation system. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 1991-2002.
- Zhao, X., Tang, F., Cai, W., Peng, B., Zhang, P., & Shan, C. (2023). Effect of fermentation by lactic acid bacteria on the phenolic composition, antioxidant activity, and flavor substances of jujube–wolfberry composite juice. *LWT*, 184, 114884.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., ... & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782-2858.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559.

## 7. EKLER

### EK 1- Kalibrasyon Eğrileri

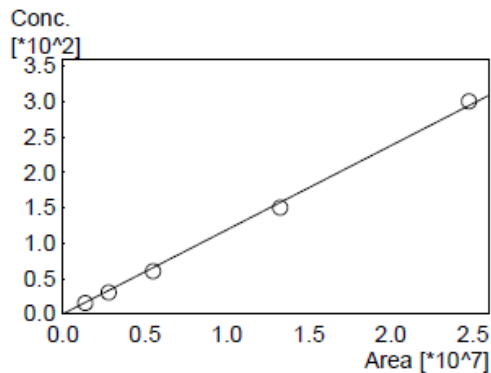
#### <Calibration Curve>

ID# : 1  
 Name : Gallic Acid  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=2.12009e-005*x+0$   
 Rr1=0.9994034 Rr2=0.9988072  
 MeanRF:1.99652e-005 RFSD:1.01078e-006 RFRSD:5.06271  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Through  
 WeightedRegression : None  
 Detector Name : PDA



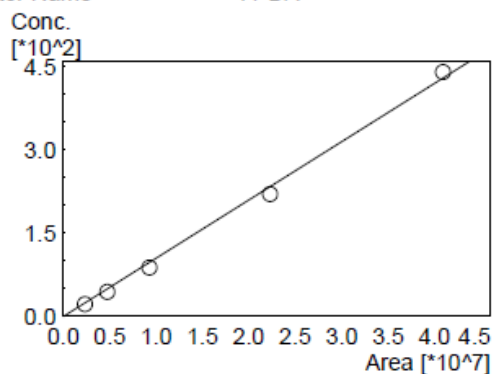
| # | Conc (Ratio) | Area       | Area     |
|---|--------------|------------|----------|
| 2 | 15.000       | 766824.2   | 766824   |
| 3 | 30.000       | 1576844.4  | 1576844  |
| 4 | 60.000       | 3088586.3  | 3088586  |
| 5 | 150.000      | 7423065.7  | 7423066  |
| 6 | 300.000      | 13885235.6 | 13885236 |

ID# : 2  
 Name : 4-Hydroxybenzoic Acid  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=1.1884e-005*x+0$   
 Rr1=0.9993671 Rr2=0.9987347  
 MeanRF:1.12052e-005 RFSD:5.5504e-007 RFRSD:4.95339  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Through  
 WeightedRegression : None  
 Detector Name : PDA



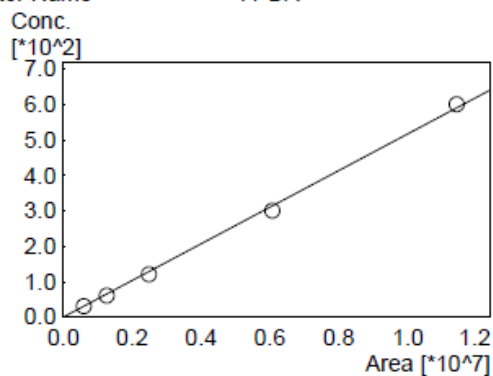
| # | Conc (Ratio) | Area       | Area     |
|---|--------------|------------|----------|
| 2 | 15.000       | 1362814.2  | 1362814  |
| 3 | 30.000       | 2804685.4  | 2804685  |
| 4 | 60.000       | 5506079.3  | 5506079  |
| 5 | 150.000      | 13261295.3 | 13261295 |
| 6 | 300.000      | 24762639.5 | 24762639 |

ID# : 3  
 Name : Chlorogenic Acid  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=1.05008e-005*x+0$   
 Rr1=0.9990358 Rr2=0.9980726  
 MeanRF:9.75705e-006 RFSD:6.03321e-007 RFRSD:6.18344  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Through  
 WeightedRegression : None  
 Detector Name : PDA



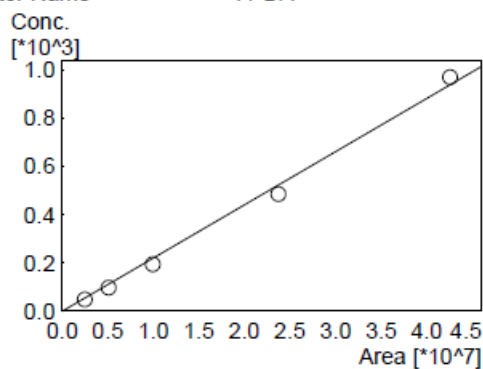
| # | Conc (Ratio) | Area       | Area     |
|---|--------------|------------|----------|
| 2 | 22.000       | 2341426.2  | 2341426  |
| 3 | 44.000       | 4740384.8  | 4740385  |
| 4 | 88.000       | 9293659.9  | 9293660  |
| 5 | 220.000      | 22265655.7 | 22265656 |
| 6 | 440.000      | 40900499.4 | 40900499 |

ID# : 4  
 Name : Vanillic Acid  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=5.16719e-005*x+0$   
 Rr1=0.9994619 Rr2=0.9989240  
 MeanRF:4.96463e-005 RFSD:1.90824e-006 RFRSD:3.84367  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Through  
 WeightedRegression : None  
 Detector Name : PDA



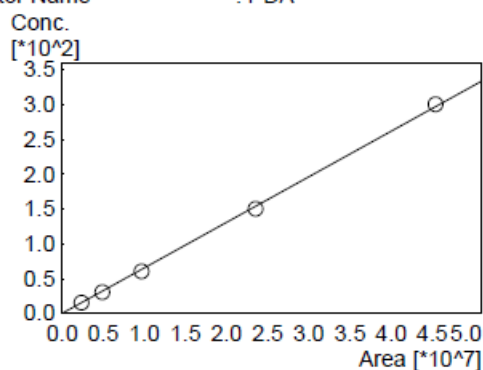
| # | Conc (Ratio) | Area       | Area     |
|---|--------------|------------|----------|
| 2 | 30.000       | 595845.6   | 595846   |
| 3 | 60.000       | 1257295.8  | 1257296  |
| 4 | 120.000      | 2487562.4  | 2487562  |
| 5 | 300.000      | 6074091.5  | 6074092  |
| 6 | 600.000      | 11421734.4 | 11421734 |

ID# : 5  
 Name : Caffeic Acid  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=2.20887e-005*x+0$   
 Rr1=0.9983706 Rr2=0.9967439  
 MeanRF:2.0273e-005 RFSD:1.49961e-006 RFRSD:7.39706  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Through  
 WeightedRegression : None  
 Detector Name : PDA



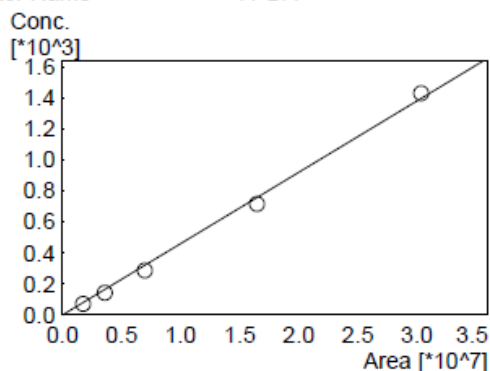
| # | Conc (Ratio) | Area       | Area     |
|---|--------------|------------|----------|
| 2 | 48.500       | 2473599.5  | 2473600  |
| 3 | 97.000       | 5101748.9  | 5101749  |
| 4 | 194.000      | 9947242.2  | 9947242  |
| 5 | 485.000      | 23714865.4 | 23714865 |
| 6 | 970.000      | 42560935.4 | 42560935 |

ID# : 6  
 Name : Ellagic Acid  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=6.54103e-006*x+0$   
 Rr1=0.9998229 Rr2=0.9996459  
 MeanRF:6.34132e-006 RFSD:1.80157e-007 RFRSD:2.841  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Through  
 WeightedRegression : None  
 Detector Name : PDA



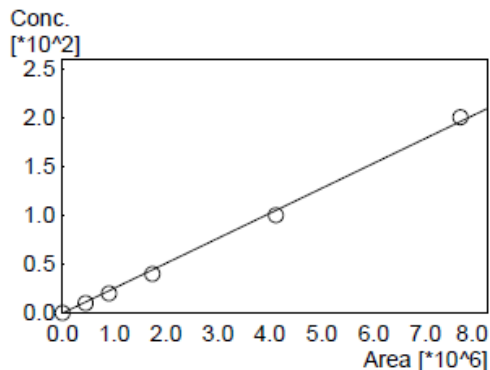
| # | Conc (Ratio) | Area       | Area     |
|---|--------------|------------|----------|
| 2 | 15.000       | 2352737.4  | 2352737  |
| 3 | 30.000       | 4885881.4  | 4885881  |
| 4 | 60.000       | 9661433.7  | 9661434  |
| 5 | 150.000      | 23529494.6 | 23529495 |
| 6 | 300.000      | 45415657.4 | 45415657 |

ID# : 7  
 Name : p-Cumaric Acid  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=4.59901e-005*x+0$   
 Rr1=0.9991167 Rr2=0.9982343  
 MeanRF:4.24061e-005 RFSD:2.95119e-006 RFRSD:6.95935  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Through  
 WeightedRegression : None  
 Detector Name : PDA



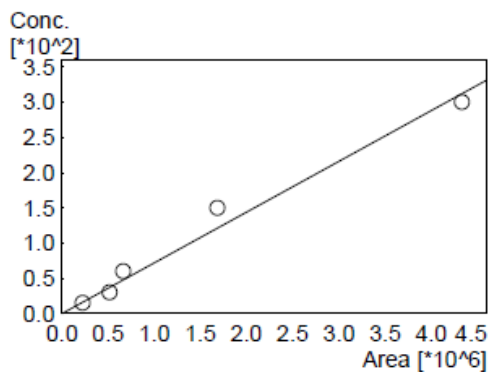
| # | Conc (Ratio) | Area       | Area     |
|---|--------------|------------|----------|
| 2 | 71.500       | 1758934.7  | 1758935  |
| 3 | 143.000      | 3590446.1  | 3590446  |
| 4 | 286.000      | 6972419.4  | 6972419  |
| 5 | 715.000      | 16466314.1 | 16466314 |
| 6 | 1430.000     | 30352953.8 | 30352954 |

ID# : 8  
 Name : Ferrulic Acid  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=2.55326e-005*x+0$   
 Rr1=0.9992536 Rr2=0.9985077  
 MeanRF:1.96662e-005 RFSD:9.74099e-006 RFRSD:49.5316  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Through  
 WeightedRegression : None  
 Detector Name : PDA



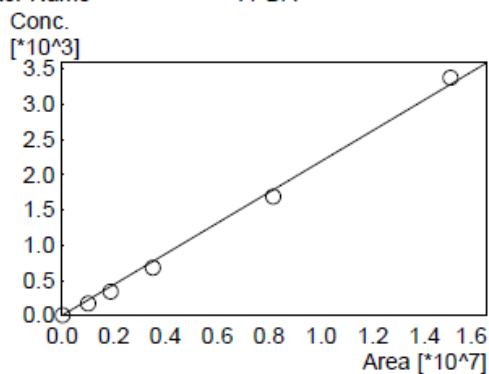
| # | Conc (Ratio) | Area      | Area    |
|---|--------------|-----------|---------|
| 1 | 0.000        | 1924.5    | 1924    |
| 2 | 10.000       | 447647.8  | 447648  |
| 3 | 20.000       | 899110.9  | 899111  |
| 4 | 40.000       | 1735138.2 | 1735138 |
| 5 | 100.000      | 4117506.8 | 4117507 |
| 6 | 200.000      | 7670300.6 | 7670301 |

ID# : 9  
 Name : Cathesine  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=7.20675e-005*x+0$   
 $Rr1=0.9909547$   $Rr2=0.9819912$   
 MeanRF:7.47509e-005 RFSD:1.43197e-005 RFRSD:19.1566  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Through  
 WeightedRegression : None  
 Detector Name : PDA



| # | Conc (Ratio) | Area      | Area    |
|---|--------------|-----------|---------|
| 2 | 15.000       | 224762.2  | 224762  |
| 3 | 30.000       | 515450.7  | 515451  |
| 4 | 60.000       | 663007.0  | 663007  |
| 5 | 150.000      | 1684605.6 | 1684606 |
| 6 | 300.000      | 4330410.1 | 4330410 |

ID# : 10  
 Name : Narengenic Acid  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=0.000218755*x+0$   
 $Rr1=0.9989560$   $Rr2=0.9979131$   
 MeanRF:0.000161324 RFSD:8.16796e-005 RFRSD:50.6309  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Through  
 WeightedRegression : None  
 Detector Name : PDA



| # | Conc (Ratio) | Area       | Area     |
|---|--------------|------------|----------|
| 1 | 0.000        | 23322.0    | 23322    |
| 2 | 168.500      | 1015821.2  | 1015821  |
| 3 | 337.000      | 1885886.4  | 1885886  |
| 4 | 674.000      | 3507582.0  | 3507582  |
| 5 | 1685.000     | 8159830.5  | 8159831  |
| 6 | 3370.000     | 14996744.5 | 14996744 |