



**PROBİYOTİK *PICHIA KUDRIAVZEVII* M16 MAYA HÜCRE  
DUVARINDAKİ BETA-GLUKANIN PARAPROBİYOTİK OLARAK  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Belgin GÜLDESTE**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ARALIK 2022**

## ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri 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.

Belgin GÜLDESTE

23/12/2022

PROBİYOTİK *PICHIA KUDRIAVZEVII* M16 MAYA HÜCRE DUVARINDAKİ BETA-  
GLUKANIN PARAPROBİYOTİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Belgin GÜLDESTE

GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2022

ÖZET

Maya hücre duvarının önemli bir bileşeni olan beta glukan ( $\beta$ -glu), D-glukoz monomerlerinin beta glukozidik bağlarla birbirine bağlı olduğu doğal bir polisakkarittir.  $\beta$ -glukan içeriği açısından mayalar diğer kaynaklara göre daha zengin olduğundan ticari üretimde tercih edilmektedirler. Bu tez çalışmasında, probiyotik *Pichia kudriavzevii* M16 maya suşunun hücre duvarından  $\beta$ -glukan biyopolimeri ( $\beta$ -gluM16) ekstrakte edilerek kimyasal bir modifikasyonla (karboksimetilasyon-CM) suda çözünürlüğü artırılmış ve ardından karakterizasyonu (moleküler ağırlığı ve fonksiyonel grupları) ve bazı biyoaktiviteleri (antioksidan, antimikrobiyal, antibiyofilm, adezyon yeteneği, sitotoksisite, sitokin seviyeleri) incelenmiştir. Elde edilen CM $\beta$ -gluM16 biyopolimerinin antioksidan aktivitesi DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal süpürücü aktivite, hidroksil radikali süpürücü aktivitesi ve süperoksit anyonu süpürücü aktivite yöntemleriyle belirlenmiştir. DPPH radikal süpürücü aktivite sonucu biyopolimerin farklı derişimlerde (0,2-100 mg/mL) uygulanması ile %75-96; süperoksit anyonu süpürücü aktivite sonucu %45-76; hidroksil radikali süpürücü aktivite sonucunda ise %51-70 antioksidan aktivite belirlenmiştir. CM $\beta$ -gluM16'nın antibiyofilm aktivitesi farklı test bakterilerine karşı farklı dozlarda (0,2-0,5-1-5-10-20-30-100) %57-80 oranında tespit edilmiştir. CM $\beta$ -gluM16'nın MTT testi ile sitotoksisitesi iki farklı hücre hattında incelenmiş ve HT-29 insan kolorektal adenokarsinom hücre hattında anti-proliferatif etki bulunurken, L929 sağlıklı fibroblast hücrelerinde dikkate değer bir toksisite bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). CM $\beta$ -gluM16'nın antimikrobiyal aktivitesine rastlanmamıştır. *Lactobacillus plantarum* LP1 probiyotik bakterisi ve farklı dozlarda (50-200-500  $\mu$ g/mL) CM $\beta$ -gluM16 sinbiyotiği kullanılarak çeşitli kombinasyonlarda adezyon deneyi yapılmış ve CM $\beta$ -gluM16'nın probiyotiğin bağırsak epitel hücrelerine adezyon yeteneğini arttırdığı belirlenmiştir. CM $\beta$ -gluM16'nın IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 ve TNF $\alpha$  ELISA kitleri ile sitokin seviyeleri belirlenmiş olup doza ve uygulama saatine bağlı olarak IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  salınımını azalttığı, IL-6 salınımını ise aynı şekilde doza ve uygulama saatine bağlı olarak azalttığı görülmüştür.

Bilim Kodu : 20309  
Anahtar Kelimeler :  $\beta$ -glukan, *Pichia kudriavzevii*, Paraprobiyotik, Biyomalzeme  
Sayfa Adedi : 148  
Danışman : Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

PARAPROBIOTIC EVALUATION OF BETA-GLUCAN IN PROBIOTIC *PICHIA*  
*KUDRIAVZEVII* M16 YEAST CELL WALL

(M. Sc. Thesis)

Belgin GULDESTE

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

December 2022

ABSTRACT

Beta glucan ( $\beta$ -glu), an important component of the yeast cell wall, is a natural polysaccharide in which D-glucose monomers are linked by beta glycosidic bonds. Since yeasts are richer in  $\beta$ -glucan content than other sources, they are preferred in commercial production. In this thesis, the solubility of the probiotic *Pichia kudriavzevii* M16 yeast strain was increased by chemical modification (carboxymethylation) by extracting  $\beta$ -glucan biopolymer from the cell wall, and then its characterization (bond structures, molecular weight, functional groups) and some bioactivities (antioxidant, antimicrobial, antibiofilm, adhesion ability, cytotoxicity, cytokine levels) were investigated. The antioxidant activity of the obtained CM $\beta$ -gluM16 biopolymer was determined by DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil), hydroxyl radical scavenging, and superoxide anion removal methods. The result of the DPPH method was 75 $\pm$ 0.07-96 $\pm$ 0.01% with the application of the biopolymer at different concentrations (0.2-100 mg/mL); the result of superoxide anion removal method was 45-76%; As a result of hydroxyl radical activity, 51-67% antioxidant activity was determined. Antibiofilm activity of CM $\beta$ -gluM16 was determined at the rate of 57-80% at different doses against different ATCC test pathogens. The cytotoxicity of CM $\beta$ -gluM16 was examined in two different cell lines with the MTT assay, and there was no significant toxicity in L929 healthy fibroblast cells, while the anti-proliferative effect was found in the HT-29 human colorectal adenocarcinoma cell line. No antimicrobial activity of CM $\beta$ -gluM16 was found. An adhesion test was performed in various combinations using *Lactobacillus plantarum* LP1 probiotic bacteria and various doses (50-200-500  $\mu$ g/mL) CM $\beta$ -gluM16 synbiotic, and it was determined that CM $\beta$ -gluM16 increased the adhesion ability of the probiotic to intestinal epithelial cells. Cytokine levels of CM $\beta$ -gluM16 were determined with IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, and TNF $\alpha$  ELISA kits, and it decreased IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  release depending on the dose and application time, and IL-6 release was determined. Likewise, it was observed that it decreased depending on the dose and application time.

Science Code : 20309

Key Words :  $\beta$ -glucan, *Pichia kudriavzevii*, Paraprobiotics, Biopolymer

Page Number : 148

Supervisor : Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin ilk gününden son gününe kadar bana sonsuz anne şefkati, anlayış ve sabrı ile yaklaşan, hem akademik hem manevi olarak her türlü olanak ve desteği tarafıma sağlayan, tüm sorunlarımı paylaşma samimiyetini gösteren, her daim ulaşılabilir olan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşmaktan büyük mutluluk duyan, akademik kariyerim için alacağım her kararda desteğini hissettiğim, bu yüksek lisans tezinin tamamlanmasında yol gösteren çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ'a en derinden saygı, sevgi ve minnetlerimi sunarım. Yüksek lisans eğitimim boyunca tarafıma aynı samimiyetle yaklaşan, hiçbir bilgi birikimini ve hayat tecrübesini esirgemeyen, bana her türlü çalışma olanağını sağlayan ve yol gösteren çok değerli hocam Prof. Dr. Belma ASLIM'a en içten saygı, sevgi ve minnetlerimi sunarım. Yüksek lisans eğitimimi eksiksiz ve en güzel şekilde tamamlamam için bana desteğini ve anlayışını hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli sayın hocam Prof. Dr. Aysun ERGENE'ye teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım süresince karşılaştığım deneysel problemlerde yanımda olan, çalışmanın hücre sel deneylerini kapsayan kısımlarında sonsuz bilgi, tecrübe ve emeği olan Öğr. Gör. Serap NİĞDELİOĞLU DOLANBAY ve laboratuvar ekip ruhu deneyimini bana yaşatan başta Buse DENGİZ, Abdullah DEMİR ve Merve İÇİN olmak üzere tüm Biyoteknoloji Laboratuvarı ekibine yanımda oldukları için teşekkür ederim.

Emekleri sayesinde bugünlere gelmemi sağlayan, her zaman elini omzumda hissettiren canım babam İlhan GÜLDESTE ve biricik annem Meral GÜLDESTE'ye beni dünyanın en şanslı evladı yaptıkları için; bilgi ve tecrübeleriyle desteğini bir gün bile eksik etmeyen ablalarım Gülşen GÜLDESTE OT ve Gülseren GÜLDESTE'ye ve abim Yunus OT'a beni dünyanın en şanslı kardeşi yaptıkları için teşekkür ederim. Tez yazım aşamasında geçirdiğim stresli süreçte her daim yanımda olan biricik dostlarım Fatih ORHAN, Ceren ÖZKAN ve Burak YILMAZ'a da teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca, Bilim İnsanı Destekleme Başkanlığı 2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı 2021/2 kapsamında sunulan burs için TÜBİTAK'a teşekkür ederim. Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından FGA-2022-7437 kodlu genel araştırma projesi ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Gazi Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür ederiz.

**İÇİNDEKİLER**

	<b>Sayfa</b>
ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ .....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ .....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	5
2.1. Mayalar .....	5
2.2. Mayaların Hücre Duvarı Bileşenleri ve Görevleri.....	8
2.2.1. Mannoproteinler.....	9
2.2.2. Kitin .....	10
2.2.3. Glukanlar.....	11
2.3. Polisakkaritler .....	14
2.4. Beta Glukanlar .....	19
2.4.1. Beta glukan kaynakları.....	21
2.5. Beta Glukanların Kullanım Alanları .....	26
2.5.1. Gıda endüstrisinde kullanımı .....	27
2.5.2. Kozmetik endüstrisinde kullanımı .....	28
2.5.3. Yem endüstrisinde kullanımı .....	28
2.6. Beta Glukanların Çözünürlüğünü Arttırmak: Karboksimetilasyon .....	29
2.7. Serbest Radikaller .....	32

	<b>Sayfa</b>
2.7.1. DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) radikali .....	35
2.7.2. Hidroksil radikali .....	35
2.7.3. Süperoksit anyon radikali.....	36
2.8. Oksidatif Stres.....	36
2.9. Antioksidanlar.....	37
2.10. Sitokinler.....	39
2.11. Mikrobiyom, Probiyotik ve Paraprobiyotikler.....	41
2.11.1. Mikrobiyom .....	41
2.11.2. Probiyotik.....	42
2.11.3. Paraprobiyotikler.....	44
2.12. Probiyotik Bir Maya: <i>Pichia Kudriavzevii</i> .....	47
<b>3. MATERYAL VE METOD</b> .....	<b>49</b>
3.1. Materyal .....	49
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar .....	49
3.1.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve tampon .....	50
3.2. Metot.....	51
3.2.1. Kültürlerin muhafazası.....	51
3.2.2. <i>Pichia kudriavzevii</i> M16 maya suşunun hücre duvarından $\beta$ -glukan ( $\beta$ -gluM16) eldesi.....	52
3.2.3. $\beta$ -gluM16'nın karboksimetilasyonu .....	53
3.2.4. CM $\beta$ -gluM16'nın karakterizasyonu.....	53
3.2.5. CM $\beta$ -gluM16'nın antioksidan aktivitesi.....	54
3.2.6. CM $\beta$ -gluM16'nın antibiyofilm aktivitesinin belirlenmesi.....	57
3.2.7. CM $\beta$ -gluM16'nın antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi.....	58
3.2.8. Sitotoksisite.....	59
3.2.9. CM $\beta$ -gluM16'nın epitel hücrelere yapışmaki rolü .....	61

	<b>Sayfa</b>
3.2.10. CM $\beta$ -gluM16'nın sitokin seviyelerinin belirlenmesi.....	62
3.2.11. İstatistiksel analizler.....	66
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>69</b>
4.1. $\beta$ -glukanın Ekstraksiyonu .....	69
4.2. $\beta$ -glukanın Karboksimetilasyonu .....	70
4.3. CM $\beta$ -gluM16'nın Karakterizasyonları .....	70
4.3.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR).....	70
4.3.2. SEC .....	72
4.4. CM $\beta$ -gluM16'nın Biyolojik Aktiviteleri .....	72
4.4.1. Antioksidan aktivite .....	72
4.5. Antibiyofilm Etkinin Belirlenmesi .....	76
4.6. Sitotoksosite.....	78
4.6.1. CM $\beta$ -gluM16'nın HT-29 insan kolorektal adenokarsinoma hücre hattında 3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) testi ile antiproliferatif etkinin belirlenmesi.....	78
4.6.2. CM $\beta$ -gluM16'nın L929 Fibroblast Hücre Hattında MTT Testi ile Canlılığının Ölçülmesi .....	83
4.7. Adezyon .....	85
4.8. CM $\beta$ -gluM16'nın IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 ve TNF- $\alpha$ Kitleri ile Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi.....	88
4.8.1. CM $\beta$ -gluM16'nın immünmodülatör etkisinin belirlenmesi için, HT-29 ve L929 hücrelerinden salınan IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 ve TNF- $\alpha$ sitokin seviyelerine etkisi araştırılmıştır. ....	88
4.8.2. IL-1 $\beta$ .....	89
4.8.3. IL-6.....	91
4.8.4. IL-10.....	93
4.8.5. TNF- $\alpha$ .....	95
<b>5. TARTIŞMA</b> .....	<b>99</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	<b>121</b>

	<b>Sayfa</b>
KAYNAKLAR .....	123
ÖZGEÇMİŞ .....	147



## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Mayaların doğal habitatları .....	5
Çizelge 2.2. Mayaların organelleri ve görevleri .....	7
Çizelge 2.3. Maya hücre duvarı bileşenleri .....	8
Çizelge 2.4. Polisakkaritlerin sınıflandırılması .....	14
Çizelge 2.5. Ticari olarak önemli mikrobiyal polisakkaritler ve uygulama alanları .....	18
Çizelge 2.6. Farklı beta glukan kaynakları ve yapıları .....	22
Çizelge 2.7. $\beta$ -glukanların gıda endüstrisinde kullanım alanları .....	27
Çizelge 2.8. $\beta$ -glukan modifikasyonları ve ürünlerinin fizyolojik işlevleri .....	32
Çizelge 2.9. Reaktif oksijen türleri .....	33
Çizelge 2.10. Reaktif oksijen kaynakları .....	33
Çizelge 2.11. Serbest radikaller ve yarattığı hastalıklar .....	34
Çizelge 2.12. Endojen antioksidanlar .....	38
Çizelge 2.13. Ekzojen antioksidanlar .....	38
Çizelge 2.14. Probiyotiklerin etki mekanizmaları .....	44
Çizelge 2.15. <i>Pichia kudriavzevii</i> mayasının taksonomik hiyerarşisi .....	47
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar ve kullanım amaçları .....	49
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri .....	51
Çizelge 3.3. $\beta$ -gluM16 ekstraksiyon basamakları .....	52
Çizelge 4.1. CM $\beta$ -gluM16'nın boyut dışlama kromatografi sonuçları .....	72
Çizelge 4.2. Biyofilm inhibisyon sonuçları .....	76
Çizelge 4.3. CM $\beta$ -gluM16'nın HT29 hücre hattında antiproliferatif etkilerinin MTT testi sonuçları .....	82
Çizelge 4.4. CM $\beta$ -gluM16'nın L929 hücre hattında proliferatif etkilerinin MTT testi sonuçları .....	84
Çizelge 4.5. Probiyotik ve sinbiyotik uygulamaların adezyon yüzde ve indeks değerleri .....	85

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Maya hücresinin yapısı.....	7
Şekil 2.2. Maya hücre duvarı yapısı .....	9
Şekil 2.3. Maya hücre duvarının yapısı .....	9
Şekil 2.4. Mannoprotein kimyasal yapısı .....	10
Şekil 2.5. Kitin molekülünün kimyasal yapısı.....	11
Şekil 2.6. Glukan kimyasal yapısı .....	11
Şekil 2.7. Beta glukan bağ yapıları ve şekilleri .....	13
Şekil 2.8. $\beta$ (1, 3) (1, 6) glukan molekülünün yapısı .....	14
Şekil 2.9. Tahıl $\beta$ -glukanının yapısı.....	23
Şekil 2.10. Lentinan'ın kimyasal yapısı .....	24
Şekil 2.11. Schizophyllan'ın kimyasal yapısı.....	25
Şekil 2.12. Krestin'ın kimyasal yapısı .....	25
Şekil 2.13. Pleuran'ın kimyasal yapısı .....	26
Şekil 2.14. DPPH radikali.....	35
Şekil 2.15. Hidroksil radikali tepkimeleri.....	36
Şekil 2.16. Süperoksit anyon radikalinin yapısı .....	36
Şekil 2.17. Bağırsak mikrobiyotası yoluyla beta glukanların kolon kanseri üzerine etkisi .....	42
Şekil 3.1. Dekstran standartları ile çizilen kalibrasyon grafiği.....	54
Şekil 3.2. IL-1 $\beta$ standart grafiği.....	64
Şekil 3.3. IL-6 standart grafiği.....	65
Şekil 3.4. IL-10 standart grafiği.....	65
Şekil 3.5. TNF- $\alpha$ standart grafiği.....	66
Şekil 4.1. $\beta$ -gluM16 ve CM $\beta$ -gluM16'nın FT-IR spektrumları .....	71
Şekil 4.2. CM $\beta$ -gluM16'nın farklı derişimlerde DPPH radikal süpürücü aktivitesi .....	73

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 4.3. CMβ-gluM16'nın süperoksit anyonu süpürücü aktivitesi .....	74
Şekil 4.4. CMβ-gluM16'nın hidroksil radikali süpürücü aktivitesi .....	75
Şekil 4.5. CMβ-gluM16'nın antioksidan testlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi .....	76
Şekil 4.6. CMβ-gluM16'nın biyofilm inhibisyonu .....	78
Şekil 4.7. HT-29 MTT testi uygulama saatlerinin istatistiksel değerlendirilmesi.....	79
Şekil 4.8. L-929 MTT testi uygulama saatlerinin istatistiksel değerlendirilmesi.....	80
Şekil 4.9. CMβ-gluM16'nın farklı derişimlerde HT29 hücre hattı üzerinde % canlılık değerleri.....	81
Şekil 4.10. CMβ-gluM16'nın farklı derişimlerde L929 hücre hattı üzerinde % canlılık değerleri.....	83
Şekil 4.11. a: 50 mg/mL CMβ-gluM16, b: 200 mg/mL CMβ-gluM16, c: 500 mg/mL CMβ-gluM16, d: 50 mg/mL CMβ-gluM16+ <i>L. plantarum</i> LP1, e: 200 mg/mL CMβ-gluM16+ <i>L. plantarum</i> LP1, f: 500 mg/mL CMβ-gluM16+ <i>L. plantarum</i> LP1, g: Kontrol (HT-29 hücresi ve besiyeri DMEM), h: HT-29 hücresi+ <i>L. plantarum</i> LP1 .....	87
Şekil 4.12. L929 hücre hattında 18 ve 36 saat uygulamada IL-1β sitokin seviyesi .....	89
Şekil 4.13. HT-29 hücre hattında 18 ve 36 saat uygulamada IL-1β sitokin seviyesi .....	90
Şekil 4.14. CMβ-gluM16 biyopolimerinin IL-1β sitokin seviyeleri üzerine etkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi (ns (non-significant): istatistiksel olarak anlamlı bir fark yok).....	91
Şekil 4.15. L929 hücre hattında 18 ve 36 saat uygulamada IL-6 sitokin seviyesi .....	92
Şekil 4.16. HT-29 hücre hattında 18 ve 36 saat uygulamada IL-6 sitokin seviyesi .....	92
Şekil 4.17. CMβ-gluM16 biyopolimerinin IL-6 sitokin seviyeleri üzerine etkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi (ns (non-significant): istatistiksel olarak anlamlı bir fark yok).....	93
Şekil 4.18. L929 hücre hattında 18 ve 36 saat uygulamada IL-10 sitokin seviyesi .....	94
Şekil 4.19. HT-29 hücre hattında 18 ve 36 saat uygulamada IL-10 sitokin seviyesi .....	94
Şekil 4.20. CMβ-gluM16 biyopolimerinin IL-6 sitokin seviyeleri üzerine etkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi (ns (non-significant): istatistiksel olarak anlamlı bir fark yok).....	95
Şekil 4.21. L929 hücre hattında 18 ve 36 saat uygulamada TNF-α sitokin seviyesi.....	96

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 4.22. HT-29 hücre hattında 18 ve 36 saat uygulamada TNF- $\alpha$ sitokin seviyesi ...	96
Şekil 4.23. CM $\beta$ -gluM16 biyopolimerinin TNF- $\alpha$ sitokin seviyeleri üzerine etkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi (ns (non-significant): istatistiksel olarak anlamlı bir fark yok).....	97



## RESİMLERİN LİSTESİ

<b>Resim</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 3.1. Farklı derişimlerde (mg/mL) CM $\beta$ -gluM16'nın DPPH süpürücü aktivitesi .....	56
Resim 3.2. Kullanılan kimyasallar .....	57
Resim 3.3. 12 saat inkübasyon sonucu MTT uygulanan HT-29 hücreleri.....	60
Resim 3.4. 18 saat inkübasyon sonucu DMSO uygulanan HT-29 hücreleri.....	60
Resim 3.5. ELISA kiti içeriğı.....	63
Resim 3.6. Sitokin seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan ELISA kitleri .....	64
Resim 4.1. <i>Pichia kudriavzevii</i> M16 maya suşunun ışık mikroskobu görüntüsü.....	69
Resim 4.2. <i>Pichia kudriavzevii</i> M16 mayasının hücre duvarından ekstrakte edilen $\beta$ -gluM16.....	69
Resim 4.3. Liyofilize $\beta$ -gluM16 .....	70
Resim 4.4. Liyofilize CM $\beta$ -gluM16 örneğı.....	70
Resim 4.5. ELISA kiti durdurma solüsyonu uygulaması sonucu oluşan renk değışimi .....	88

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklamalar</b>
%	Yüzde
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
Da	Dalton
g	Gram
H	Hidrojen Atomu
kDa	Kilodalton
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
°C	Derece
pH	Asitlik Bazlık Birimi
α	Alfa
β	Beta
<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklamalar</b>
<b>ADI</b>	Adezyon İndeksi
<b>ATCC</b>	Amerikan Kültür Koleksiyonu
<b>BHA</b>	Beta Hidroksi Asit
<b>BHT</b>	Butillendirilmiş hidrokstoluen
<b>CM</b>	Karboksil Metil
<b>CMβ-gluM16</b>	Karboksimetillenmiş β-gluM16

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklamalar</b>
<b>CO<sub>2</sub></b>	Karbondioksit
<b>CR3</b>	Tamamlayıcı Reseptör Tip 3
<b>CS</b>	Sitokin Fırtınası
<b>DC</b>	Dentritik Hücre
<b>dk</b>	Dakika
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DMSO</b>	Dimetil Sülfoksit
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
<b>EFSA</b>	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
<b>ELISA</b>	Antijen-antikor ilişkisini araştıran bir kantitatif ölçüm
<b>EPS</b>	Ekzopolisakkarit
<b>FDA</b>	Gıda ve İlaç Dairesi
<b>Fe<sup>+2</sup></b>	Demir iyonu
<b>FT-IR</b>	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi
<b>GIS</b>	Gastro İntestinal Sistem
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen peroksit
<b>HCl</b>	Hidrojen Klorür
<b>HIV</b>	Human Immunodeficiency Virus (İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü)
<b>HSV</b>	Herpes Simplex Virus (Genital Herpes Virüsü)
<b>ISO</b>	Uluslararası Standartlar Teşkilatı
<b>LAB</b>	Laktik Asit Bakterisi
<b>LDLR</b>	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptörü
<b>L-EPS</b>	Liyofilize ekzopolisakkarit
<b>MCA</b>	Monokloro Asetik Asit
<b>MRS</b>	De Man, Rogosa and Sharpe
<b>MTT</b>	3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür
<b>NaOH</b>	Sodyum Hidroksit
<b>NK</b>	Doğal Öldürücü Hücre
<b>NMR</b>	Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
<b>O<sub>2</sub></b>	Oksijen

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklamalar</b>
<b>OH<sup>-</sup></b>	Hidroksil iyonu
<b>RNA</b>	Ribonükleik asit
<b>ROS</b>	Reaktif Oksijen Türleri
<b>rpm</b>	Dakikada Devir Sayısı
<b>SARS-CoV-2</b>	Şiddetli Akut Solunum Yolu Sendromu
<b>SCFA</b>	Kısa Zincirli Yağ Asiti
<b>SEC</b>	Boyut Dışlama Kromatografisi
<b>TGF-β</b>	Dönüştürücü Büyüme Faktörü-β
<b>TLR</b>	Toll Like Reseptor (Toll benzeri reseptör)
<b>UV</b>	Ultraviyole
<b>YPD</b>	Yeast Pepton Dekstroz
<b>B-glukan</b>	Beta Glukan
<b>β-GOS</b>	β-glukoolisakkarit

## 1. GİRİŞ

Mayalar, çok hücreli atalardan evrimleşmiş tek hücreli ökaryotik mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmalar binlerce yıldır insanlığa fayda sağlamaktadır (Jacques ve Casaregola, 2008). Mayaların başlıca yararlı özellikleri arasında probiyotik etkileri, fitatın biyodegradasyonu, folat biyofortifikasyonu, mikotoksinlerin bozunması ve mikotoksinlerin absorpsiyonu yer almaktadır. Mantarlara karşı antagonistik etkileri nedeniyle bazı mayalar gıdada bozulmayı önleyen biyokontrol ajanları olarak da kullanılmaktadır. Mayalar, besin kaynakları için rekabet ederek, ortamın pH'ını değiştirerek, yüksek konsantrasyonlarda etanol üreterek ve öldürücü toksinler veya "mikosinler" gibi antimikrobiyal bileşikler üreterek diğer mikroorganizmalara karşı antagonistik aktivitelerini gerçekleştirirler (Homayouni-rad, Oroozzadeh ve Abbasi, 2021). Mayalar, diğer herhangi bir endüstriyel mikroorganizma grubunun üretimini, kapasitesini ve ekonomik gelirlerini aşan, dünya çapında biyoteknoloji ürünlerinin ana üreticisidir. Çevresel faktörler ve sürdürülebilir enerji kaynaklarına duyulan ihtiyaç nedeniyle, mayalar biyokütleden yakıt alkolü ve diğer endüstriyel ürünlerin üretimi içinde oldukça ilgi çeken bir konuma sahiptir. Ayrıca son yıllarda gıda, yem ve tarım da dahil olmak üzere geleneksel pazarlar için önemli bir enzim kaynağı haline gelmiştir (Rebello ve diğerleri, 2018).

Mikroorganizmalar lokalize üç farklı tipte Beta glukan ( $\beta$ -glukan) üretir: Hücre içi (depolama), hücre dışı (kapsüller, balçık veya biyofilm) ve hücre duvarında (yapısal). Maya hücre duvarı, dış katmanda mannopteinlerden ve iç katmanda  $\beta$ -(1-3),  $\beta$ -(1-6) glukan ve kitinden oluşmaktadır (Ishimoto ve diğerleri, 2018).  $\beta$ -glukan, birbirine glukozidik bağlarla bağlanan, aynı veya farklı monosakkaritten oluşan ve özellikle mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunan bir tür yüksek moleküler ağırlıklı bileşiktir. Çeşitli bağ tiplerine sahip beta glukanın yalnızca  $\beta$ -(1-3,1-6) konformasyonu gösteren çeşitleri insan sağlığında daha aktif rol oynayıcı özellikler göstermektedir.  $\beta$ -glukan kozmetik, gıda, yem ve sağlık endüstrilerinde kullanılan bir biyoaktif bileşiktir. Fonksiyonel gıdalarda aynı zamanda kıvam arttırıcı, kalınlaştırıcı ve stabilize edici olarak da kullanılmaktadır.  $\beta$ -glukan probiyotik ürünlerde kullanıldığında diyet lifi olarak prebiyotik özellik gösteren bir polisakkarittir (Karabiyikli ve Donat, 2019).

Probiyotikler yapılan tanımlara göre uygun miktarlarda kullanıldığında konakçıya olumlu etki sağlayan canlı mikroorganizmalardır. Probiyotiklerin kullanımı son yıllarda oldukça

popüler olmasına rağmen zamanla kullanımları ile ilgili bazı endişeler ortaya çıkmıştır. Bu endişelerden birkaçı; yaşlı bireyler, anormal gastrointestinal sisteme sahip bireyler, prematüre bebekler veya düşük vücut bağışıklığına sahip bireylere verilmesinde canlı mikroorganizmaların ne derece güvenli olduğu ile ilgilidir. Literatürde probiyotik alımına bağlı olarak meydana gelen enfeksiyon, sepsis gibi vakalar bulunmaktadır (R. L. Costa, Moreira, Lorenzo ve Lamas, 2018). Canlı mikroorganizmaların kullanımı ile ilgili yaşanan tüm bu sorunlar “canlı olmayan probiyotikler”, “hayalet probiyotikler” veya “inaktive/tindalize probiyotikler” olarak da adlandırılan paraprobiyotiklerin kullanımına olan ilgiyi artırmıştır. Paraprobiyotiklerin de tıpkı probiyotikler gibi hücre yüzeyindeki moleküller ile (teikoik asit, peptidoglikan, polisakkarit, duvar proteinleri vb.) etkileştiği bilinmektedir (Teame ve diğerleri, 2020). Paraprobiyotikler gıda güvenliğini sağladıkları için gıdaların ısı işlemlerinden önce eklenebilirler ve antibiyotik gibi tedavilerden etkilenmezler. Bu sebeple birçok gıdaya eklenebilir, fonksiyonel gıda tasarımlarında yeni kullanımlara yol açarlar. İnaktive edilmiş probiyotikler (paraprobiyotik) soğuk zincir gerektirmemesi gibi özellikleri sayesinde depolama, taşıma, raf ömrü gibi özellikler açısından probiyotiklerden daha verimlidir. Paraprobiyotiklerin bir diğer ilgi çekici özelliği, geniş pH ve sıcaklık aralıklarında stabilitesini koruyabilmesi ve bu sebeple yüksek oranda asit içeren gıdalara eklenebilme potansiyelidir (Siciliano, Reale, Fiorella Mazzeo, ve diğerleri, 2021a).

Bu tez çalışmasında maya hücre duvarından ekstrakte edilen  $\beta$ -glukanın gıda endüstrisinde paraprobiyotik ve/veya nutrasötik olarak kullanım potansiyelinin belirlenmesi amacıyla;

1. Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu’nda bulunan, peynirden izole edilen ve 18SrRNA analizi ile tanımlanmış olan potansiyel probiyotik *Pichia kudriavzevii* M16 mayasının hücre duvarından  $\beta$ -glukanın ( $\beta$ -gluM16) ekstrakte edilmesi,
2. Elde edilen  $\beta$ -glukanın ( $\beta$ -gluM16) sudaki çözünürlüğünü arttırmak amacıyla karboksimetilasyon yapılması (CM $\beta$ -gluM16),
3. CM $\beta$ -gluM16’nın SEC ve FT-IR ile moleküler ağırlığı ve fonksiyonel gruplarının belirlenmesi,
4. Farklı derişimlerde (0,2-100 mg/mL) CM $\beta$ -gluM16’nın antioksidan, antimikrobiyal aktiviteleri ve antibiyofilm özellikleri gibi bazı biyolojik aktivitelerinin tespit edilmesi,
5. CM $\beta$ -gluM16’nın L-929 fibroblast hücre hattı ile çalışılarak bağırsak epitel hücrelerine yapışma yeteneklerinin belirlenmesi,

6. CM $\beta$ -gluM16'nın HT-29 insan kolorektal adenokarsinoma hücre hattı ve L929 fibroblast hücre hattı üzerinde MTT testi uygulanarak sitotoksitesinin tespit edilmesi,
7. CM $\beta$ -gluM16'nın L-929 ve HT-29 hücre hatları üzerinde farklı uygulama sürelerinde (18 ve 36 saat) çeşitli interlökin kitleri (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ ) kullanılarak sitokin seviyelerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.





## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Mayalar

Mayalar ilk olarak Sümerler, Babiller ve Gürcüler tarafından alkol fermentasyonunda, Mısırlılar tarafından ise ekmek yapımında kullanılmıştır. Mayaların mikroskopik olarak incelenmesi ilk kez 1680 yılında Leeuwenhoek tarafından gerçekleştirilmiş ve 1837 yılında Meyen'in malt mayasına *Saccharomyces cerevisiae* adını vermesi ile maya üzerine yapılan çalışmalar genişlemiştir. Günümüzde mayalar üzerine birçok biyoteknolojik çalışma yapılmaktadır. Mayalar genel olarak tek hücreli, bazı türlerinde çok hücreli olabilen ökaryotik canlılardır. Hücre büyüklükleri yetiştikleri kültürün bileşenlerine ve çevresel koşullara direkt olarak bağlıdır (Pamir, 1985). Mayalar da tıpkı bitki hücreleri gibi hücre çeperi, çekirdek ve sitoplazmadan oluşurlar. Mayaların habitatları Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Mayaların doğal habitatları (Péter, Takashima ve Cadež, 2017)

Hayvanlar	Birkaç patojenik olmayan maya, sıcak kanlı hayvanların bağırsak sistemi ve derisi ile ilişkilidir; mayalar (örneğin <i>Candida albicans</i> ) insanlar ve hayvanlar için fırsatçı patojenlerdir; mayalar, doğal dağılımda önemli vektörler olarak hareket eden böceklerle ortaklaşa ilişkilidir.
Atmosfer	Metreküp hava başına birkaç canlı maya hücresi beklenebilir. Genel olarak, <i>Cryptococcus</i> , <i>Debaryomyces</i> spp., <i>Rhodotorula</i> ve <i>Sporobolomyces</i> , toprak yüzeylerinin üzerindeki katmanlardan hava yoluyla dağılır.
Çevre	Mayalar binalarda oldukça yaygındır. Örneğin, <i>Aureobasidium pullulans</i> mayası nemli evlerde duvar kağıtlarında yaygındır. <i>S. cerevisiae</i> ise şarap imalathanelerindeki yüzeylerden kolaylıkla izole edilebilir.
Toprak	Toprak, büyüme için bir habitattan ziyade yalnızca mayanın uzun süreli hayatta kalması için bir rezervuar olabilir. Mayalar ekili topraklarda bulunabilirler ve toprağın yalnızca üst yani aerobik toprak katmanlarında (10–15 cm) bulunurlar. <i>Lipomyces</i> ve <i>Schwanniomyces</i> yalnızca topraktan izole edilen maya türlerine örnektir.
Bitki	Bitki dokuları (yapraklar, çiçekler ve meyveler) tercih edilen maya habitatlarıdır.
Su	Mayalar, tatlı ve tuzlu suların yüzey katmanlarında baskındır ancak çok sayıda bulunmazlar (yaklaşık 1000 hücre/L). Suda yaşayan maya izolatlarının çoğu kırmızı pigmentli cinslerdendir ( <i>Rhodotorula</i> ). <i>Debaryomyces hansenii</i> türü, neredeyse doymuş tuzlu su çözeltilerinde büyüeyebilen, halotolerant bir mayadır.

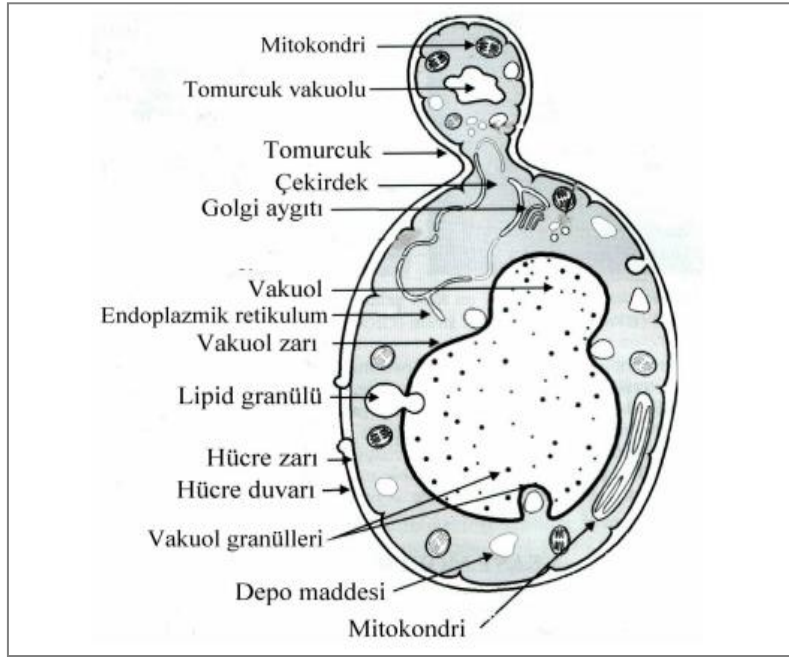
Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan ve beslenmede potansiyel kaynak olarak değerlendirilen mayalar bol miktarda karbonhidrat, protein, yağ ve vitamin içermektedirler. Mayalar farmasötik ve kimya endüstrilerinde doğal ve heterolog enzim kaynakları olarak daha fazla kullanılmaya başlanmıştır. Fonksiyonel genomik ve sistem biyolojisindeki gelişmeler sayesinde *S. cerevisiae* şu anda ökaryotik biyoloji ve insan hastalıklarının incelenmesi için birincil model organizma olarak kabul edilmektedir. Özellikle gıda, tıp ve tarım disiplinlerinde (biyokontrol, biyoremediasyon ajanları ve çevresel kalitenin

göstergeleri) geniş kapsamlı temel ve endüstriyel öneme sahiptirler. Farklı birçok türü bulunup türlere göre boyutları değişkenlik göstermektedir. Türlerin sınıflandırılması, hücre morfolojisi, fizyolojisi ve moleküler biyoloji özellikleriyle ilgilidir. Şu zamana dek yaklaşık 1000 maya türü tanımlanmış ve yeni maya türleri düzenli olarak karakterize edilmektedir. Mayalar bakteriler gibi her yerde bulunmazlar. Fakat birçok kaynaktan elde edilebilirler. Pek çok alanda kullanılan mayalar kolayca üreyebilir ve biyolojik analizleri hızlı bir şekilde yapılabilir. Genellikle bitki dokularında, yaprak, çiçek ve meyvelerde bulunmaktadır. Birçok farklı tür için besin kaynağı oluşturmakla birlikte aynı zamanda üremelerine de fayda sağlarlar. Karbon, nitrojen ve kükürt döngülerinde önemli bir role sahip olan mayalar karbon kaynaklarını geniş bir şekilde kullanabilmektedirler. Hibridizasyon, mutasyon ve nadir çiftleşme, sitodüksiyon, sferolast füzyonu, tek kromozomal transfer ve rekombinant teknolojisi kullanılarak transformasyon yoluyla genetik olarak manipüle edilebilirler (Rosa ve Gábor, 2006).

Mayalar çeşitli alanlarda, farklı amaçlar için kullanılmaktadır. Modern maya biyoteknolojilerinin ürünleri; gıda, içecek, kimyasal, farmasötik, endüstriyel enzim ve tarım da dahil olmak üzere ticari açıdan önemli birçok sektörde kullanılmaktadır. Fermente gıdalardaki aroma geliştirmeye önemli katkılarının yanı sıra, istenmeyen bakterilere karşı antagonist aktiviteleri nedeniyle mayalar artık yaygın olarak bilinmekte ve bu alanda kullanılmaktadırlar. Bu aktiviteler; besin maddelerindeki rekabetçilikleri, büyüme ortamlarını asitlendirmeleri, yüksek etanol konsantrasyonlarına dirençleri, antifungal toksinler (mikotoksinler) ve antibakteriyel bileşikler gibi antimikrobiyal bileşikler üretmeleri gibi aktivitelerdir. Mayalar toksin üretmemeleri, patojenite göstermemeleri (*Cryptococcus* sp. ve *Candida* sp. hariç), antibiyotiklere duyarlı olmamaları, midenin düşük, bağırsağın yüksek pH değerlerine ve sıcaklıklara dirençli olmaları, bakterilere göre 10 kat büyük olmaları nedeniyle daha iyi bir yapısal engel oluşturabilmeleri gibi özelliklere sahiptirler (Loureiro ve Querol, 1999); (Rosa ve Gábor, 2006);(Öztürk, 2008).

Maya hücresi dıştan içe doğru; hücre zarı, sitoplazma zarı, sitoplazma ve çekirdekten oluşan bir oluşuma sahiptir (Şekil 2.1). Maya hücrelerinin içermekte olduğu vakuoller protein ve diğer karmaşık molekülleri parçalar, besin maddelerini depolar ve hücre içi homeostazi sağlar. İçerdikleri mitokondri organelli bitki ve hayvan hücrelerinde bulunan mitokondriye benzer bir rol oynamaktadır. Tüm canlı organizmalarda olduğu gibi mayalarda da solunum,

büyüme, homeostaz için gerekli enerji mitokondri tarafından sağlanır. Mayaların organelleri ve görevleri Çizelge 2.2’de verilmiştir.



Şekil 2.1. Maya hücresinin yapısı (Russell ve Stewart, 1998)

Çizelge 2.2. Mayaların organelleri ve görevleri (Feldmann, 2012)

Bileşen	Görevi
Hücre Duvarı	Maya hücrelerine şekil vererek hücrenin büyüklüğünü belirler. İçeriğinde polisakkaritler, proteinler ve lipidler yer almaktadır. Hücre duvarına fibriler özelliğini veren ise kitin veya selüloz içermesidir.
Sitoplazmik Membran	Hücre duvarının altında yer almaktadır. Üç tabakadan oluşur. Absorbsiyon ve sekresyon olaylarında hücreye büyük avantaj sağlar. Fosfolipit, protein ve steroller içerir.
Sitoplazma	İçerisinde büyük bir vakuol ve vakuolun bir tarafında nükleus bölgesini içerir.
Nükleus ve Nükleolus	Çekirdeğin etrafında çift katlı ve porlar barındıran bir membran bulundurur. Çekirdek içerisinde DNA vardır ve birden fazla sayıdadır.
Endoplazmik Retikulum (ER)	Protein sentezlenmesinde ve metabolizma için gerekli olan maddelerin taşınımında etkili olmaktadır. Lipoprotein yapısına sahiptir.
Vakuol	İçeriğinde pigment, kristal ve bazı maddeler bulunmaktadır. Hücre içi pH kontrolünden sorumludur.
Golgi Aygıtı	Sentez olaylarında görevlidir. Endositoz ve egzositoz olaylarında rol alır.
Ribozom	Yapısında %50-70 oranında RNA ve %35-50 oranında protein vardır. Protein sentezinden sorumludur.
Lomasom	Hücre duvarı ve sitoplazmik membran arasında yerleşmiş ve içe doğru çöküntüler meydana getirmiş bileşenlerdir. Sekresyon ve sitoplazma sentezinde görevlidir.
Mitokondri	Hücrelerin enerji merkezi olarak bilinir. Yapılarında ribozom, protein ve DNA bulunan mitokondriler bölünerek veya tomurcuklanarak çoğalmaktadır.
Sitoplazmik Granüller	Lipid, glikojen granülleri, kristal ve pigmentlerdir.

Mayaların kullanım alanlarını aşağıdaki gibi sınıflandırmak mümkündür (G M Walker, 1999);

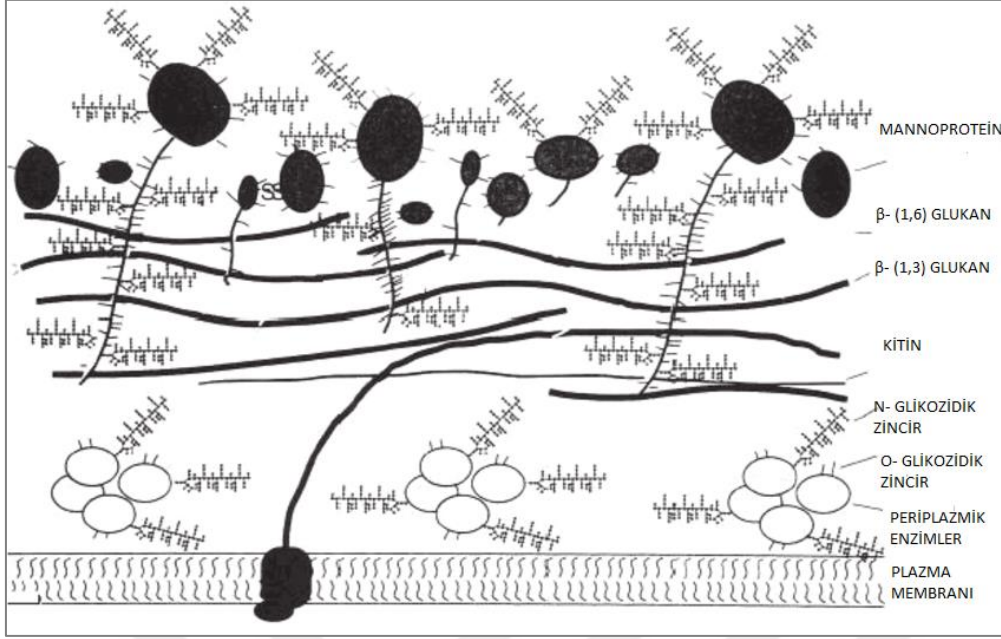
- Fermentasyon Endüstrileri (Bira-şarap mayalama, Biyoetanol üretimi)
- Gıda/ Kimyasal Endüstriler (Asitlik düzenleyici, lezzetlendirici)
- Çevresel Teknolojiler (Biyoremediasyon, metal biyosorpsiyonu)
- Biyomedikal Araştırmalar (İlaç metabolizmaları, genotoksisite ve sitotoksisite belirlenmesi)
- Sağlık Hizmetleri Endüstrileri (İlaç, aşı, probiyotik, hormon ve kan faktörleri)
- Temel Biyolojik Araştırmalar (Hücre biyolojisi, genetik, moleküler biyoloji)

## 2.2. Mayaların Hücre Duvarı Bileşenleri ve Görevleri

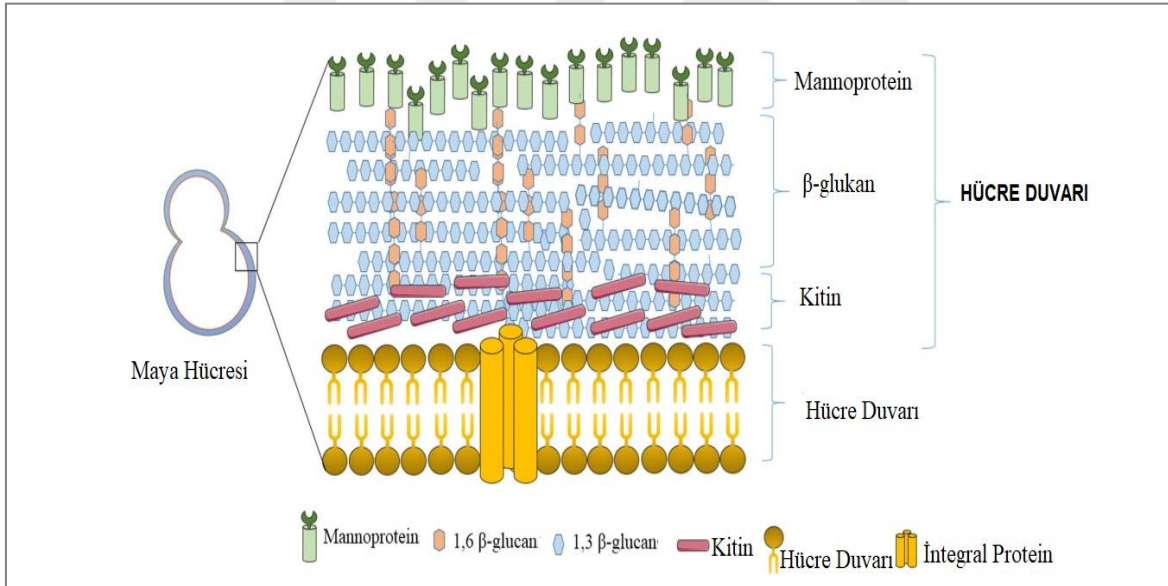
Maya hücre duvarı, hücre morfolojisini koruyan, destekleyen, savunan ve ozmotik basıncı sağlayan özel bir yapıdır. Glukanlar ( $\beta$ -1,3 glukan veya  $\beta$ -1,6 glukan), mannoproteinler ve kitinden oluşmaktadır (Klis, Boorsma ve De Groot, 2006). Bu bileşenler, sağlam bir hücre duvarı oluşturmak üzere bir araya getirilen makromoleküler kompleksler oluşturmak üzere kovalent olarak bağlanırlar. Maya hücre duvarının %45'i hücre duvarı, %55'i de sitoplazmadır. Hücre duvarının da %46'sı glukan, %43'ü mannan oligosakkarit, geri kalan %11'lik kısım da iz mineraller ve B grubu vitaminleridir. Maya hücre duvarının elastik bir yapısı vardır ve ozmotik yolaklardan gelen olası zararlardan hücrenin korunması, hücrenin şeklinin belirlenmesi, geçirgenlik gibi görevleri vardır. Maya hücre duvarı bileşenleri Çizelge 2.3, Şekil 2.2 ve Şekil 2.3'de verilmiştir.

Çizelge 2.3. Maya hücre duvarı bileşenleri (Klis, Mol, Hellingwerf ve Brul, 2002)

Bileşenler	Duvar Kütlesinin %'si	Sentezlendiği Bölge	Ortalama Moleküler Ağırlık (kDa)
$\beta$ 1,3 Glukan	50-55	Plazma membranı	240
$\beta$ 1,6 Glukan	10	Plazma membranı	24
Mannoprotein	40	Salgı yolu	100-200
Kitin	1-3	Plazma membranı	25



Şekil 2.2. Maya hücre duvarı yapısı (Kogan, M Pajtinka, Babincová, Miadokova ve Slamenova, 2008)

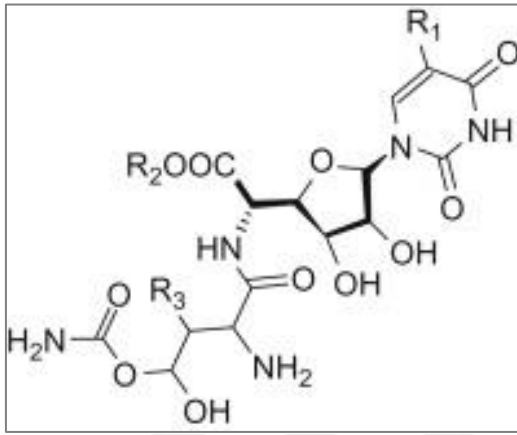


Şekil 2.3. Maya hücre duvarının yapısı (Anwar, Muhammad, Awais ve Akhtar, 2017)

### 2.2.1. Mannoproteinler

Mayaların hücre duvarının bir bileşeni olan ve hücre duvarı kuru maddesinin %20-50'sini oluşturan bir bileşen olan mannoproteinler, çok yüksek oranda glikolize edilmiş ve proteinlere ve peptitlere kovalent/kovalent olmayan bağlarla bağlandığı polipeptitlerdir. Ağırlıkça %50-95 karbohidrattan oluşmaktadır. Maya hücre duvarının en dış tabakasına

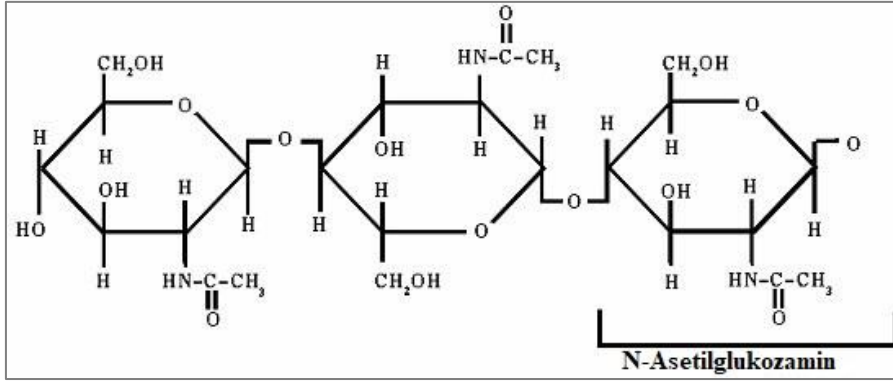
lokalize olmuş filamentsiz glikoproteinlerdir. Mannoproteinlerin yapıları ve moleküler ağırlıkları glukozilasyonun derecesine ve tipine bağlı olarak değişmektedir. Mannoproteinler saflaştırılmış maya hücre duvarlarından glukana 1,3  $\beta$ -glukosidaz enzimi kullanılarak enzimatik ekstraksiyon veya ısıl işlem yoluyla ekstrakte edilmektedir. Enzim, hücre duvarının hidrolizini sağlayarak mannoproteinlerin çözünmesine yol açmaktadır. Isıl işlem yolu ise  $\beta$ -glukanlarla olan bağları koparır. Mannoproteinlerin moleküler ağırlığı 20 kDa'nın altından 450 kDa'nın üzerine kadar değişmektedir (Bzducha-Wróbel, Błazejak ve Tkacz, 2012). Mannoproteinin kimyasal yapısı Şekil 2.4'de verilmiştir.



Şekil 2.4. Mannoprotein kimyasal yapısı (Alexandre, 2011)

### 2.2.2. Kitin

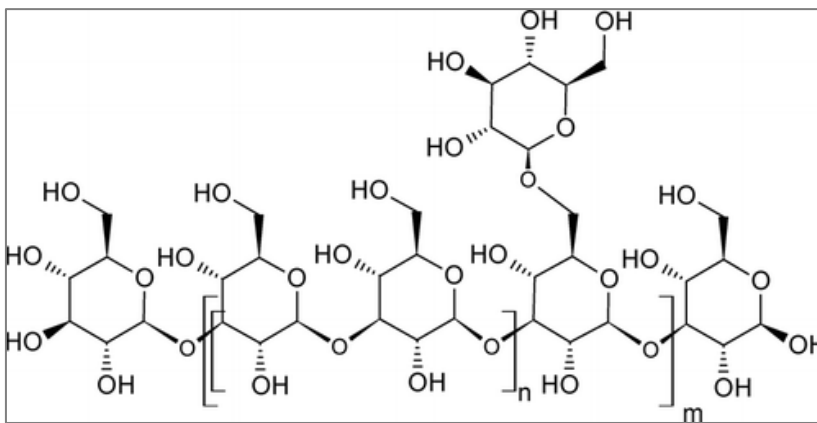
$\beta$ -1,4 bağlı N-asetilglukozamin kalıntılarından oluşan, lineer ve doğal olarak bol miktarda bulunan bir mukopolisakkarit olan kitin, maya hücre duvarı kütlesinin %1 ila %15'ini oluşturmaktadır. Maya hücre duvarının küçük bir bileşeni olmasına rağmen, kitin, hücre duvarının sertliğine ve gücüne önemli katkısı ve özellikle hücre bölünmesindeki rolü nedeniyle hücrenin hayatta kalması için gereklidir. Ayrıca kitinin farklı polisakkaritlerle ilişkisi konuma bağlı olarak değişmektedir: Boyunda kitinin çoğu  $\beta$ -1,3-glukan ile bağlantılıyken, yan hücre duvarında  $\beta$ -1,6-glukana bağlanma baskındır (Arroyo, Farkaš, Sanz ve Cabib, 2016). Kitin, yıllık 100 milyar tonluk biyosentez ile bolluk açısından selülozu takip etmektedir (Tharanathan ve Kittur, 2003). Kitin, kabukluların kabuk atıklarında ana bileşendir ve ayrıca böceklerin ve yumuşakçaların dış iskeletlerinde ve bazı mantarların hücre duvarlarında bulunmaktadır (Abo Elsouid ve El Kady, 2019). Kitin molekülünün kimyasal yapısı Şekil 2.5'de verilmiştir.



Şekil 2.5. Kitin molekülünün kimyasal yapısı (Okay, Özdal ve Kurbanoğlu, 2013)

### 2.2.3. Glukanlar

Doğada en bol bulunan polisakkaritler glukozdan yapılmaktadır ve bunlara glukanlar adı verilir. Glukanlar, bağlantı türlerine ve birleşmelerinde yer alan karbonlara göre adlandırılıp sınıflandırılır. Maya hücre duvarının en önemli yapısal polisakkaritidir ve kuru ağırlığın %50-60'ını oluşturmaktadır. Yapıları oldukça değişkendir örneğin glukoz kısımları alfa veya beta bağlarından biri veya her ikisini de içerebilir. Alfa glukanlar hücre duvarına dayanıklılık sağlayan yapısal mikrofibriller şeklinde bulunmaktadırlar. Beta glukanların yapısı ise daha karışıktır. Doğrusal ya da dallanmış olabilirler ve mikrofibriller şeklinde bulunurlar. Beta (1,3) ve (1,6) bağlarını içermektedirler. Kitin ile maya hücre duvarının en önemli bileşenini oluştururlar. Mayalarda birkaç çeşit alfa glukan yer almaktadır. Alfa glukanların en yaygın polisakkariti  $\alpha$  (1,4) ve  $\alpha$  (1,6) bağlarıyla glukoz tarafından yapılan glikojendir. Alfa glukanların aksine, mayalardaki beta glukanların sınıfları daha fazladır ve yapıları daha komplekstir. Glukanın kimyasal yapısı Şekil 2.6'da verilmiştir.



Şekil 2.6. Glukanın kimyasal yapısı (Novak ve Vetvicka, 2008)

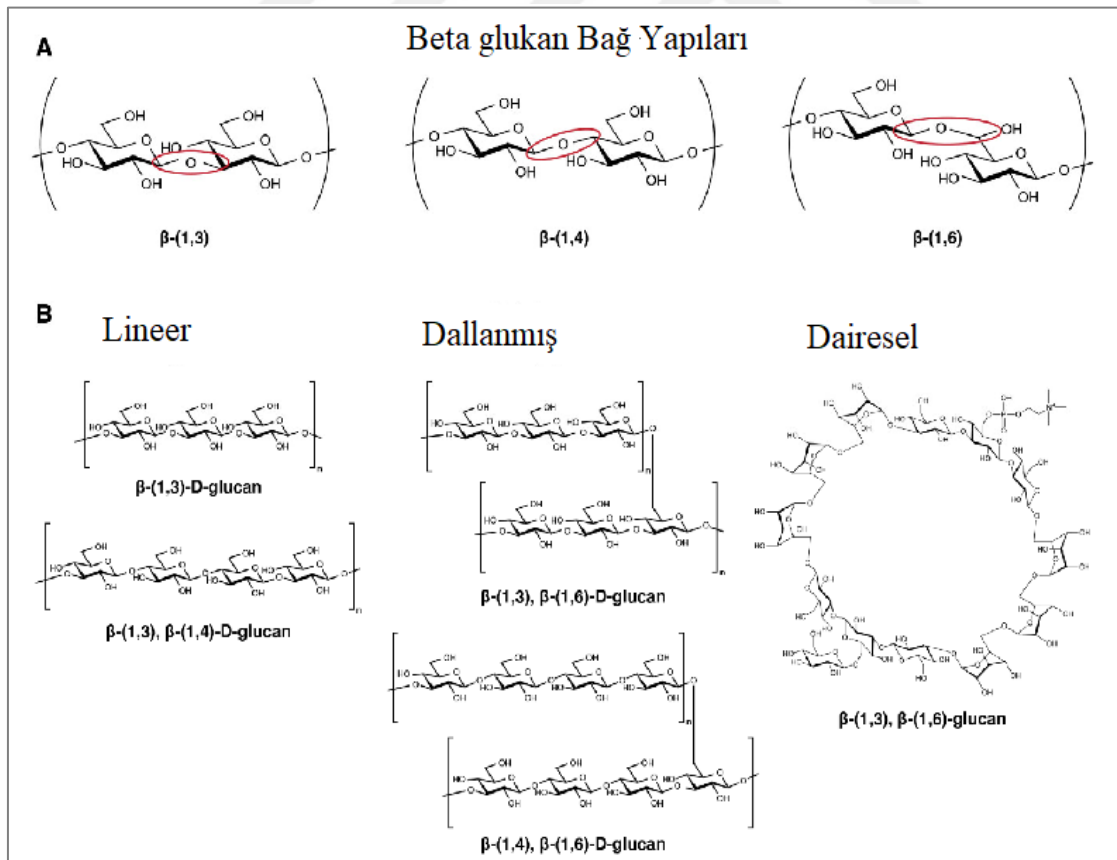
Glukanlar; vücudun sağlığına olumlu etkiler gösterme, hücre farklılaşmasını kontrol etme, hücre büyümesini ve yaşlanmayı düzenleme, hücre tanıma, hücre metabolizması, embriyonik gelişim, viral enfeksiyon, bağışıklık tepkisi gibi biyoaktif tepkiler gösterebilir ve böylelikle yaşam etkinliklerine katılabilmektedirler. Glukanın kimyasal yapısı biyolojik aktivitelerini belirleyen önemli bir faktördür. Glukanlar, genel glukanlar, doğal glukanlar ve sentetik glukanlar şeklinde ayrılmaktadırlar. Doğal aktif glukanlar hayvanlardan, bitkilerden ve mikroorganizmalardan elde edilmektedirler. Güçlü biyolojik aktivite özelliklerini gösteren glukan bağ tipi (1-3) glukozidik bağdır. Glukanlar, anomerik konformasyonlarına göre  $\alpha$ - ve  $\beta$ -D- glukanlar olmak üzere 2 gruba ayrılırlar. Mikrobiyal  $\beta$ -glukanlar tipik olarak, çeşitli glukozidik bağlar ile bağlanmış, tekrarlanan glukoz birimlerinden oluşan ve dallanmış konfigürasyonlar gösteren homopolisakkarit çeşitlerindedir. Bağ tipleri (1-3), (1-3, 1-6) ve (1-6) şeklinde düzenli şekilde bakteriyel ve düzensiz yapıda mantar ve alglerde omurga zincirleri halinde bulunmaktadır. Konak bağışıklık sistemini uyarak, bakteri, viral, mantar ve parazit kaynaklı çeşitli deneysel hastalık durumları üzerine faydalı bir etki gösterirler (Clarke, 2009)(Bohn Dz ve Bemiller, 1995).  $\beta$ -(1-3),  $\beta$ -(1-6)- glukanlar sadece D-glukandan oluştuğundan dolayı hayvanlar ve insanlar için toksisite göstermemektedir. Bunların çözünür türevlerinin kullanımı sentetik ilaçlara kıyasla birçok avantaja sahiptir, bu da etkili olmasına rağmen sıklıkla sitotoksik aktivite göstermektedir. Sadece efektif ajana karşı değil, aynı zamanda konakçı hücrelere de yöneliktir (Şöhretoğlu ve Kuruüzüm Uz, 2015).  $\beta$ -(1-3),  $\beta$ -(1-6)- glukanların antitümör ve antimetastik aktivitesi bir dizi murin tümör modelinde ve insanlarda klinik uygulamada gösterilmiştir (Babincová, Bačová, Machová ve Kogan, 2002).  $\beta$ -Glukanlar vücudu viral, bakteriyel ve fungal enfeksiyonlara, tümörlere, radyasyon etkilerine ve strese dayalı immünosupresyona karşı koruyan bağışıklık sisteminde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca güçlü antioksidan özelliklere ve serbest radikal temizleme yeteneklerine sahiptir ve antibiyotiklerin etkinliğini arttırdığı ve vücuttaki LDL kolesterol seviyesini düşürdüğü bilinmektedir (Othman, Moghadasian ve Jones, 2011).

### $\beta$ (1,3) ve $\beta$ (1,6) glukanlar

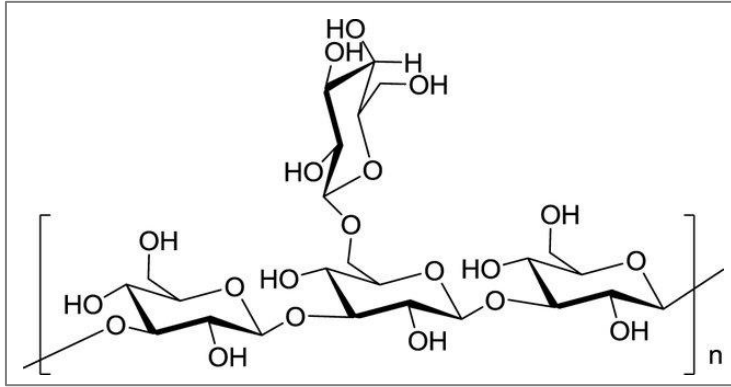
$\beta$  (1,3) glukanlar, esas olarak  $\beta$ -1,3 glukozidik bağlarla bağlanan glukoz polimerleridir ve maya hücre duvarının en önemli, en bol bulunan polisakkaritidir. Bunların miktarları duvarda bulunan toplam glukanların %65-90'nını kapsadığı hesaplanmıştır (Bowman ve Free, 2006). Hücre duvarının direncinde ve mimarisinde rol almalarının yanı sıra bir diğer önemleri ise enzimatik sindirimin veya  $\beta$  (1,3) sentez inhibisyonunun hücre lizisine ve hücre

morfolojisinde değişikliklere yol açtığı yapılan çalışmalarla ortaya çıkmıştır.  $\beta$  (1,3)-glukanlar, güçlü bağışıklık düzenleyici etkiler sergiler. Bu aktiviteler esas olarak  $\beta$  (1,3) glukanların konakçı bağışıklık sisteminin hücresel ve hümoral bileşenlerini aktive etme yeteneğinden kaynaklanmaktadır.

$\beta$  (1,6) glukanlar, yaklaşık 130 glukoz monomerinin bir araya gelmesi sonucu oluşan oldukça dallanmış glukanlardır. Glukanların ağ sistemine  $\beta$  (1,3) glukanlara bağlanarak dahil olurlar. Bu bağlanma ise glukozil fosfatidil inositol (GPI) varlığı ile gerçekleşebilir (Yiğit ve Benli, 2005). Maya ve mantarlarda bulunan  $\beta$ -glukan (1,3)-glukan bağlantısı ve bazen (1,6) bağlantı içerirken, tahıllardan (yani yulaf ve arpa) gelen  $\beta$ -glukanlar (1, 3) ve (1, 4) bağlantı içermektedir. Mayadan türetilen beta-(1, 3/1, 6) glukanın (1,3/1,4) muadillerinden daha fazla biyolojik aktiviteye sahip olduğu ileri sürülmektedir. Beta glukan bağ yapıları ve şekilleri Şekil 2.7’de verilmiştir.  $\beta$  (1,3) ve  $\beta$  (1,6) glukanların Şekil 2.8’de verilmiştir.



Şekil 2.7. Beta glukan bağ yapıları ve şekilleri (Neun, Cedrone, Potter, Crist ve Dobrovolskaia, 2020)



Şekil 2.8.  $\beta$  (1, 3) (1, 6) glukon molekülünün yapısı (Elena De Marco Costra, Philip C. Calder ve Helen M. Roche, 2020)

### 2.3. Polisakkaritler

Polisakkaritler, tüm canlılarda bulunan ve önemli biyolojik fonksiyonları olan makromoleküler polimerlerdir. Antitümör, immünomodülatör, antimikrobiyal, antioksidan, antikoagülan, antidiyabetik gibi birçok aktiviteye sahip olmalarından dolayı çok ilgi görmektedirler. Antiviral ve hipoglisemik aktiviteleri polisakkaritleri biyomedikal ve ilaç sektöründe de popüler moleküller haline getirmektedir. Polisakkaritler bitki, mantar, mikroorganizma, alg ve hayvan gibi birçok kaynaklı olabilirler. Doğadaki karbonhidratların en bol bulunan formu olan polisakkaritler, iki gruba ayrılır. 1) Homopolisakkaritler; aynı monosakkaritlerin bir araya gelmesiyle oluşurken, 2) heteropolisakkaritler farklı monosakkarit birimlerinin bir araya gelmesi sonucu oluşurlar. Glukanlar homopolisakkarit glukoz olarak değerlendirilirken mannan, mannoz homopolisakkariti olarak değerlendirilir. Polisakkaritlerin d-fruktoz, d-galaktoz, l-galaktoz, d-mannoz, l-arabinoz, d-ksiloz gibi birçok bileşeni olmasına rağmen en yaygın bileşen d-glukozdur (Bhatia, 2016a). Polisakkaritlerin sınıflandırılmasına ilişkin bilgiler Çizelge 2.4'te verilmiştir.

Çizelge 2.4. Polisakkaritlerin sınıflandırılması (Bhatia, 2016a)

Polisakkaritler	Sınıfları
Mikrobiyal Polisakkaritler	Bakteriyel Polisakkaritler: selüloz, hiyaluronik asit, ksantan, emulsan, $\beta$ -D-glukanlar, curdolan, aljinat, gellan, pullulan, skleroglukan, şizofilan, kefiran, ekzopolisakkarit (EPS). Fungal Polisakkaritler: Kitin, skleroglukan, lentinan, şizofilan krestin, galaktofuranoz. Maya Polisakkaritleri: Zimosan, glukon, glikojen, mannan
Memeli Polisakkaritleri	Glukozaminoglikanlar (hiyaluronik asit veya hiyaluronan, kondroitin sülfat, jelatin ve heparin sülfat, kitin ve kitosan)
Diğerleri	Çeşitli doğal kaynaklardan (maya, tahıl, mantar, deniz yosunu gibi) elde edilen $\beta$ -1,3-glukanlar

Biyopolimerler, canlı organizmalar tarafından oluşturulmaktadır. Canlıların hayati fonksiyonlarından bağımsız olarak tabiatta var olan organik polimerlerdir (Çankaya, Nevin ve Sökmen, 2017). Polyester, protein, karbonhidrat, yağ, yağ asitleri, polifenoller ve özel polimerler olmak üzere altı ana gruba ayrılırlar. Polisakkaritler (monosakkaritlerin poliasetal ve/veya poliketal organizasyonları), proteinler ( $\alpha$ -aminoasitlerin poliamidleri), polinükleotitler (nükleositlerin ve fosforik asidin poliesterleri) olmak üzere üç ana grupta sınıflandırılmıştır. Polisakkaritler biyopolimerlerin oldukça karmaşık grubu içerisinde yer alır. Monomerleri birbirine bağlayan şeker moleküllerinin farklı bağlanma şekilleri çok farklı özelliklere sahip polimerler ortaya çıkarmaktadır. Böylece çok çeşitli polimer yapıları oluşturulabilir (Münzberg, Rau ve Wagner, 1995). 20 farklı şeker molekülü bulunan ve biyolojik kaynaklardan elde edilen polisakkaritler tespit edilmiştir. Özellikle mikroorganizmalar aracılığıyla üretilen polisakkarit polimerleri biyoteknolojik araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında *Pichia kudriavzevii* M16 mayasının hücre duvarından ekstrakte edilen  $\beta$ -glukan da oldukça önemli bir mikrobiyal polisakkarit grubunu oluşturmaktadır.

Polisakkaritler ayrıca polielektrolitten pozitif yüklü polisakkaritlere (kitosan) ve negatif yüklü polisakkaritlere (alginat, heparin, hiyaluronik asit ve pektin) göre sınıflandırılabilir. Heparin, heparan sülfat, hiyaluronan, kondroitin sülfat, dermatan sülfat ve keratan sülfat, memeli dokularındaki en önemli glukozaminoglikanlar (GAG) kapsamlı bir şekilde çalışılan polisakkaritlerdir. Sülfasyon, fosforilasyon ve karboksimetilasyon gibi kimyasal modifikasyonların polisakkaritlere uygulanması sonucu polisakkaritlerin biyokimyasal ve fiziksel özelliklerinin biyomedikal uygulamalarına katkı sağladığı tespit edilmiştir (Mohammed, Naveed ve Jost, 2021).

Mikrobiyal polisakkaritler; birçok bakteri tarafından üretilen ve suda çözünür özelliğe sahip olan yenilenebilir, biyolojik olarak parçalanabilir ve biyolojik olarak uyumlu polimerlerdir (Giavasis ve Biliaderis, 2006). Mikroorganizmalarda sentezlendikleri yerlere göre hücre içi, hücre dışı ve hücre duvarı olmak üzere üç ayrı grupta incelenebilirler. Bunlar, hücre için karbon ve enerji depolamada görevli olan intraselüler polisakkaritler, hücre duvarının ayrılmaz bileşeni olarak etki gösteren, lipopolisakkarit ve tekoik asit gibi hücre yapılarının bileşeni olan yapısal polisakkaritler ve ekzopolisakkaritlerdir. Hücre dışına sentezlenen mikrobiyal bir polisakkarit olan ekzopolisakkaritler bakteri, arke ve farklı ökaryotik türleri tarafından sentezlenmektedir. Mikroorganizmaların ortama salgıladıkları,

molekül ağırlıkları yüksek olan, geri dönüşebilen, çevre dostu, sağlığa yararları olan doğal polimerlerdir. Ekzopolisakkaritler gastrointestinal sistemde sindirilmeden bağırsaktaki probiyotik mikroorganizmalara ulaştığı için prebiyotik özellik göstermektedir (Bikric ve diğerleri, 2022a). Ekzopolisakkaritlerin sağlık üzerinde; antitümör, antiülser, antidiyabetik ve kolesterol düşürücü gibi önemli biyolojik etkinlikleri bulunmaktadır. Ekzopolisakkaritler fermente ürünlerin stabilitesini, biyoteknolojik ve reolojik yapısını geliştirirken, bakterileri; virüslere, toksik bileşiklere, kurumaya ve ozmotik strese karşı koruyucu özellikler göstermektedir. Ekzopolisakkaritler zincir yapısı ve biyosentez şekillerine göre iki grupta incelenmektedir. Heteropolisakkaritler; mikroorganizma hücresinin içinde sentezlenip çeşitli monosakkaritlerden oluşmaktadır. Homopolisakkaritler ise tek tip monosakkarit içerip mikroorganizma tarafından harici olarak salınan enzim tarafından üretilmektedir.  $\alpha$ -D-glukanlar,  $\beta$ -D-glukanlar, fruktanlar ve poligalaktanlar homopolisakkaritler grubunda bulunmaktadır (Soyuçok, Ekiz ve Başyigit Kılıç, 2016).

Mikrobiyal polisakkaritler, sahip olduğu reolojik ve biyolojik özelliklerden dolayı bağlayıcı, pıhtılaştırıcı, emülsifiye edici, film oluşturucu, jelleştirici, stabilize edici ve koyulaştırıcı ajanlar olarak kimya, tıp, gıda ve farmasötik endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Endüstriyel kullanım sebebiyle doğal polimerlere talep oldukça fazladır. Birbirine glukozidik bağlarla bağlı uzun monosakkarit birimlerinden meydana gelen polisakkaritlerin, piyasada mevcut olan diğer geleneksel polisakaritler ile büyük bir rekabette olduğu görülmektedir (Huang, Liang, Tang, Ding ve Wang, 2013). Ayrıca, mikrobiyal polisakkaritlerin anti-inflamatuar, antitümör ve antimikrobiyal aktivite gibi potansiyel sağlık yararları olduğu bildirilmiştir (Giavasis ve Biliaderis, 2006). Mikrobiyal polisakkaritler önemli ölçüde ticari öneme sahiptir. Gıda endüstrisinde, çeşitli endüstriyel ve farmasötik bileşiklerin geliştirilmesinde rol alırlar. Polisakkaritin ticari önemi, reolojik özelliklerine bağlıdır. Viskoziteyi artırarak koyulaştırıcı ve jelleştirici maddeler olarak kullanılabilirler. Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen polisakkaritler, gıda endüstrisinde olduğu kadar petrol endüstrisinde de yağların geri kazanımında ve petrol sızıntılarının önlenmesinde rol alarak önemli yer edinmiştir (Bhatia, 2016). Birçok mikrobiyal polisakkarit olmasının yanı sıra en önemli endüstriyel öneme sahip olanlar Çizelge 2.5.'de belirtilmiştir.

Polisakkaritlerin, özellikle sülfatlanmış polisakkaritlerin anti-tümör, antioksidan ve antikoagulan aktiviteleri kanıtlanmıştır. Karides, yengeç, ıstakoz vb. kabuklu deniz hayvanları, deniz yosunları, deniz mantarları, mikroalgler, bitkisel polisakkaritler gibi farklı

kaynaklardan elde edilen doğal polisakkaritler potansiyel antikoagülan (pıhtılaşma önleyici) ajan olarak kabul edilmektedir (Ling Chen ve Huang, 2017).

Bulaşıcı ve viral hastalıklar dünyada her zaman insan hayatını tehlikeye atan, çok ciddi sağlık problemlerine yol açmıştır. Bu sebeple antiviral ajan olarak kullanılabilecek moleküllerin arayışı ortaya çıkmıştır. Hayvan, bitki, mikroorganizma gibi kaynaklardan elde edilebilen makromoleküller olan polisakkaritlerin sahip olduğu terapötik özellikler, düşük toksik etkileri ve kolay elde edilebilirliği sebebiyle dikkat çekici olmuş ve üzerinde çeşitli antiviral deneyler yapılmıştır. Polisakkaritlerin *Herpes simplex* virüsü (HSV), insan immün yetmezlik virüsü (HIV) dahil olmak üzere zarflı virüslere karşı replikasyon inhibe edici özellik göstererek antiviral özelliğe sahip olduğu kanıtlanmıştır. Polisakkaritleri bitkisel kaynaklı, hayvansal kaynaklı, mikrobiyal kaynaklı ve sentetik olanlar olarak ayırmak mümkündür. Bunların içinde yer alan mikrobiyal polisakkaritler; bakteri, mantar, maya gibi mikroorganizmalar tarafından doğal metabolizma sürecinde üretilen biyopolimerler olarak tanımlanmaktadır (Ling Chen ve Huang, 2017). Üzerinde en çok çalışılan polisakkarit grubunun mikrobiyal polisakkaritler olmasının sebebi; immünmodülatör, anti-tümör, antiviral, anti-radyasyon, anti-aging gibi etkileri bulunmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca polisakkaritlerin biyolojik aktivitelerinin yapısı ile yakından ilişkili olduğu ve uygulanacak kimyasal modifikasyonlarla bu aktivitelerinin iyileştirilebileceği kanıtlanmıştır (Huang ve diğerleri, 2013).

Polisakkarit	Kaynak(lar)	Tanım	Uygulama Alanı
Dekstran	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Acetobacter</i> sp., <i>Streptococcus mutans</i>	3-2000 kDa uzunluklarında zincirlerden oluşan birçok glukoz molekülünden yapılmış, bilinen en eski kompleks bakteriyel polisakkarittir.	Tromboz önlemede adsorban olarak kullanılır. Gıdalarda, kozmetikte, yara pansuman malzemelerinde yaygın olarak kullanılmaktadır.
Ksantan	<i>Xanthomonas campestris</i>	2:2:1 molar oranında glukoz, mannoz ve glukuronik asit içeren pentasakkarit tekrar birimlerinden oluşur.	Gıda sektöründe stabilize edici, jelleştirici olarak kullanılır. Petrol endüstrisinde yağın geri kazanımını artırmak amacıyla; diş macunu ve boya imalatında kullanılmaktadır.
Pullulan	<i>Aureobasidium pullulans</i> mantarı tarafından nişastadan üretilen bir polisakkarit polimeridir.	$\alpha$ -1,4-; $\alpha$ -1,6-glukan olarak da bilinen ve bir $\alpha$ -1,4 glikosidik bağ ile birbirine bağlanan üç maltotrioz biriminden oluşur.	Gıda paketlenme ve ambalajlamada kullanılır, biyolojik olarak parçalanabilir.
Gellan	<i>Sphingomonas elodea</i> (eski adıyla <i>Pseudomonas elodea</i> )	Gellan zıncık suda çözünür bir anyonik polisakkarittir. İki D-glukoz kalıntısından ve her bir L-ramnoz ve D- glukuronik asit kalıntısından oluşan bir tetrasakkarit polimerin tekrarlanan biriminden oluşur.	Kıvam artırıcı ve katılaştırıcı ajan olarak gıda sektöründe kullanılmaktadır.
Rekombinant Hiyaluronan	rDNA teknolojisi ile üretilir.	Doğada dağılmış anyonik, sülfatlanmamış bir glukozaminoglikandır.	Kanser, yara onarımı, inflamasyon, hücre migrasyonu, cilt iyileşmesi, fetal yara iyileşmesi gibi amaçlarla kozmetik endüstrisinde kullanılmaktadır.
Curdlan	<i>Agrobacterium biovar</i> gibi patojenik olmayan bakteriler tarafından üretilir. <i>Alcaligenes faecalis</i> tarafından üretilen curdlan üretimi jel üretiminde de kullanılmak üzere geliştirilmektedir.	Yüksek moleküler ağırlıklı bir glukoz polimeri olan doğrusal bir beta-1,3-glukandır. $\beta$ -(1,3)-bağlı glukoz kalıntılarından oluşur ve sulu süspansiyonda ısıtıldığında elastik jeller oluşturur.	Pişmiş gıdalarda jelleştirici olarak ve enzim immobilizasyonunda kullanılmaktadır.
Skleroglukan	Filamentli mantar <i>Sclerotium rolfii</i> 'nin fermentasyonu ile üretilir.	Suda çözünür, doğadan üretilmiş bir polisakkarittir.	Lateks boyalarını ve matbaa mürekkeplerini stabilize etmede kullanılmaktadır.
Bakteriyel Aljinat	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ve <i>Azotobacter vinelandii</i> bakterileri ve algler	Algin veya aljinat olarak da adlandırılan alginik asit, kahverengi alglerin hücre duvarlarında ve suyla bağlanarak viskoz bir sakız oluşturduğu çeşitli bakteri suşlarının hücre duvarlarında yaygın olarak bulunan bir anyonik polisakkarittir.	Kalınlaştırıcı, jelleştirici, iyon değiştirici ajan olarak gıda endüstrisinde kullanılmaktadır.
$\beta$ -Glukanlar	Tahılların, mayaların, bakterilerin ve mantarların hücre duvarlarında doğal olarak bulunur.	Kaynağa bağlı olarak önemli ölçüde değişen fizikokimyasal özelliklere sahip bir grup $\beta$ -D- glukoz polisakkaritinden oluşur. Tipik olarak, $\beta$ -glukanlar, 1-3 $\beta$ -glikosidik bağ ile doğrusal bir omurga oluştururlar ancak moleküler kütle, çözünürlük, viskozite, dallanma yapısı ve jelleşme özelliklerine göre değişiklik gösterirler ve hayvanlarda çeşitli fizyolojik etkilere neden olurlar.	Çeşitli nutrasötik ve kozmetik ürünlerde, tekstrü edici ajanlar ve çözünür lif takviyeleri olarak kullanılmaktadır.
Levan	<i>Pseudomonas syringae</i>	Bir grup fruktandır.	Mikro elementlerin güvenli ve verimli bir şekilde verilmesini sağlamada gıda endüstrisinde kullanılmaktadır.
Emülsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Polianyonik bir heteropolisakkarit biyoemülgatördür.	Petrol endüstrisinde petrol geri kazanımını artırmak ve petrol sızıntılarının temizlenmesinde kullanılmaktadır.

## 2.4. Beta Glukanlar

$\beta$ -glukan, maya, mantar, yulaf, arpa, deniz yosunu, buğday gibi canlıların hücre duvarlarının bir bileşeni olan ve glukoz polimerlerinden oluşmuş doğal bir polisakkarittir. Bu doğal polisakkaritler, birbirine  $\beta$ -glukozidik bağ ile bağlanmış olan 250.000'den fazla D-glukoz monomerlerinden oluşan birer biyopolimerdir.  $\beta$ -glukanların biyolojik aktiviteleri sahip oldukları konformasyon, bağ sıklığı, moleküler ağırlık, çözünürlük ve viskozite gibi özelliklerine bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Literatürde  $\beta$ -glukanların anti-oksidan, anti-inflamatuvar, anti-kolesterol, yaşlanmayı geciktirici, anti-tümör, kan şekeri düzenleyici ve anti-tümör ajan, makrofajlar, nötrofiller ve granülositler dahil olmak üzere doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinin aktivasyonu ile konakçı immün tepkisinin modifikasyonu yoluyla etki eden immünomodülatör bir molekül olarak birçok özelliğine rastlanmaktadır.  $\beta$ -glukanlar; sağlık, ilaç, gıda, kozmetik, kimyasal endüstrilerinde, hayvancılık, besicilik ve veterinerlik gibi sektörlerde çok ciddi kullanıma sahiptir (Zhu ve diğerleri, 2016).

Beta glukanlar, glukanların doğada en yaygın bulunan grubudur. Beta glukanlar birer prebiyotiktir ve insan sağlığı üzerinde çok ciddi faydalı etkileri vardır. Bir bileşiğin prebiyotik olarak değerlendirilebilmesi için oral yoldan alındığında bağırsaklara kadar sindirilmeden hidrolize uğramadan gelebilmesi gerekir. Maya alerjisi olan kişiler tarafından güvenle tüketilebilir çünkü mayaların hücre duvarından beta glukan elde etme süreci boyunca gerçekleştirilen işlemler sonucu mayada alerjiye sebep olabilecek tüm bileşenler ortadan kaldırılmış olur. Beta glukanlar makrofaj, doğal katil hücreler, nötrofiller gibi savunma hücrelerimizin aktivitesini artırarak bizlerin bağışıklığımızı güçlendirerek son zamanlarda kanser tedavisinde adjuvan olarak kullanılma potansiyellerini ciddi anlamda arttırmıştır. Beta glukanların immün stimüle edici etkisi sayesinde alerjik rinit, osteoporoz, menopoz, artrit gibi hastalıkların tedavisinde kullanımı da yaygınlaşmış bir özelliğidir. Beta glukanların yara iyileşmesi üzerine etkilerine yönelik yapılan çalışmalarla ilgili ise bu polisakkaritlerin insan venöz ülserlerinde epitelyal hiperplaziyi, anjiyogenez ve fibroblast proliferasyonunu arttırdığı yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Medeiros ve diğerleri, 2012). Ayrıca beta glukanların kozmetik sektöründe de önemli bir yer işgal etmesinin sebebinin altında topikal olarak cilde uygulandığında ciltte yenilenme, onarma, kırıxıklık giderme, beyazlatma gibi etkileri olduğu kanıtlanmıştır. 2020 yılı itibariyle beta glukanların kullanımındaki artış COVID-19 ile ilgisini gözler önüne sermektedir. Beta glukanlar bağışıklık kuvvetlendirici etkisiyle ve vücutta virüsle savaşan hücrelerin aktivitesini artırma

yeteneği ile virüse karşı savunmamızı arttırarak koronavirüsün sebep olduğu sitokin fırtınasını hafifletmektedir (Bedirli ve diğerleri, 2007).

Beta glukan, kırışıklık giderici, genel koruyuculuk sağlayan kremler, tozlar ve süspansiyonlarda kullanılmaktadır.  $\beta$ -glukan kollejen üretimini arttırarak kırışıklıkları, egzamayı, sivilceleri, selülit, sedef hastalığını, cilt rahatsızlıklarını, dermatiti azaltmaktadır. Yaşlanma deride proteinlerin çapraz bağlanması, kollagenler ve elastinlerin oksidasyonu ile oluşur, bu oksidasyon  $\beta$ -glukanın antioksidan aktivitesi ile engellenebilir. Antioksidanlar UV sebebiyle oluşun ROS'u önleyebilmektedir. Yara iyileşmesinde kullanılabilir.  $\beta$ -glukanlar, makrofajların yaraya taşınmasını ve iyileştirmeyi, doku granülasyonunu arttırmayı, tekrar epitelizasyon yapılmasını sağlamaktadır (Du, Bian ve Xu, 2013)..  $\beta$ -glukanlar fibroblastlarda NF-1 aktivitesini artırarak kollajen doku sentezini uyardıkları ve prokollojen mRNA miktarını ve tip1 ile tip 3 kollajen seviyelerini artırarak yara iyileşmesinde rol oynadığı anlaşılmıştır (Tokmak, 2017).  $\beta$ -glukanın sistemik ve lokal uygulamaları sonucu yanıkla oluşun oksidatifleri önleyici etkisi bulunmaktadır.  $\beta$ -glukan A vitamini eksikliğinden kaynaklanan bir göz hastalığı olan kseroftalmiyi azaltmak için göz damlalarında da kullanılabilir.  $\beta$ -glukanlar bağışıklık arttırıcı ve antitümör aktivitesi sebebiyle hayvan yemlerine katılabilir.  $\beta$ -glukanın alabalıklarla yapılan bir deney sonucu serumdaki antikor salınımı yapan hücrelerin miktarını ve immünoglobulin seviyesini arttırdığı ve sonuç olarak bağışıklığı stimüle edici özelliğinin olduğu kanıtlanmıştır (Altıntaş, 2006).

Bir gıda bileşenini prebiyotik olarak sınıflandırmak için çeşitli *in vitro* testler uygulanmaktadır. Örneğin bahsi geçen gıda bileşeninin mide asidi, memeli enzimleri veya hidroliz tarafından bozunmaya direnç göstermesi, bağırsak mikropları tarafından fermantasyonu (parçalanma, metabolizma) ve bağırsaktaki yararlı mikroorganizmaların büyümesi ve aktivitesinin selektif tahmin edilmesi gibi özellikler taşıması onun bir prebiyotik olarak sınıflandırılmasını sağlar.  $\beta$ -glukan biyopolimeri, yapılan tüm bu testlere göre çok popüler olarak kullanılan bir prebiyotiktir (Russo ve diğerleri, 2012).

Kolon kanseri dünyamızda ciddi bir prevalansa sahip olup ölüm oranlarından sorumludur. Kanser tedavisinde kemoterapi, radyasyon terapileri ve daha birçok doğal ürünler içeren tedaviler kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışma sonucu,  $\beta$ -glukanların kolon kanseri önleyici etkileri bulunmuştur (Şekil 2.20). Mantarlardan ekstrakte edilen ve üzerinden en çok

çalışılan  $\beta$ -glukan çeşitlerinden lentinan, skleroglukan, schizophyllan ile çalışmalar yürütülmüştür.  $\beta$ -glukanların inflamatuvar sitokinlerin üretiminde, lökositlerin aktive edilmesinde ve metastaz ile yayılımını inhibe ettiği bulunmuştur (Jayachandran, Chen, Chung ve Xu, 2018).

Mantar kaynağından elde edilen  $\beta$ -glukanlar, tahıllardan daha yüksek antikanser potansiyeline sahiptir. Kolon kanserinde bütirat, kolon kanseri oluşumunu önleyen hayati bir SCFA olduğu için kilit bir rol oynamaktadır. Bu profilaktik etki, bağırsağın epitel hücrelerini yeniden oluşturma yeteneğinden kaynaklanıyor olabileceği ileri sürülmüştür. Yapılan bir çalışmada, 25 sağlıklı gönüllüye 8-12 hafta boyunca yulaf kepeği  $\beta$ -glukan diyet takviyesi verilmiş ve ardından dışkıdaki bütirat konsantrasyonunda önemli bir artış gözlenmiştir. Bu durum da kolon kanserine karşı potansiyel bir korumaya işaret etmiştir (Jayachandran ve diğerleri, 2018).

$\beta$ -glukanlar çekum ve kolonda fermentasyona uğrayan ve mikrobiyotadaki diğer faydalı bakterilerin (probiyotik) sayısının artmasına yardımcı olan polisakkaritlerdir. Kolon kanserinde önemli bir rol alan çok bilinen bir kısa zincirli yağ asidi (SCFA) olan bütirat molekülünün konsantrasyonunun  $\beta$ -glukan tüketimiyle arttığı da Nilsson ve arkadaşlarının 2008'de sağlıklı gönüllüler ile yaptığı bir çalışma ile sonuçlanmıştır (Nilsson, Johansson, Nilsson, Björck ve Nyman, 2008).

#### **2.4.1. Beta glukan kaynakları**

$\beta$ -glukanların pek çok kaynağı olmasına rağmen insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri kanıtlanmış olan ve en sık kullanılanı mayaların hücre duvarından ekstrakte edilen gruplarıdır. Maya hücre duvarında iki farklı  $\beta$ -D glukan bulunmaktadır. Bunlar hücre duvarının yaklaşık %50-55'inden fazlasını oluşturan  $\beta$ -(1,3)-D glukan ve  $\beta$ -D-(1,6) glukandır.  $\beta$ -(1,3) glukan maya hücre duvarının mekanik özelliklerinden sorumludur ve toksin emilimine fayda sağlamaktadır.  $\beta$ -(1,6) glukan ise  $\beta$ -(1,3) glukana diğer hücre duvarı bileşenleri olan kitin ve mannopteinlerle bağlayarak hücre duvarını güçlendirmektedir (Varelas, Liouni, Calokerinos ve Nerantzis, 2016). Beta glukan polisakkariti çeşitli kaynaklardan ekstrakte edilebilmektedir. Ekstrakte edilen kaynağa göre beta glukanların etkilerinin ve yapılarının değiştiği bilinmektedir. Birçok ekstraksiyon yöntemi mevcut olmakla birlikte en uygun yöntem  $\beta$ -glukanların kaynaklarına ve yapılarına bağlıdır. Alkali

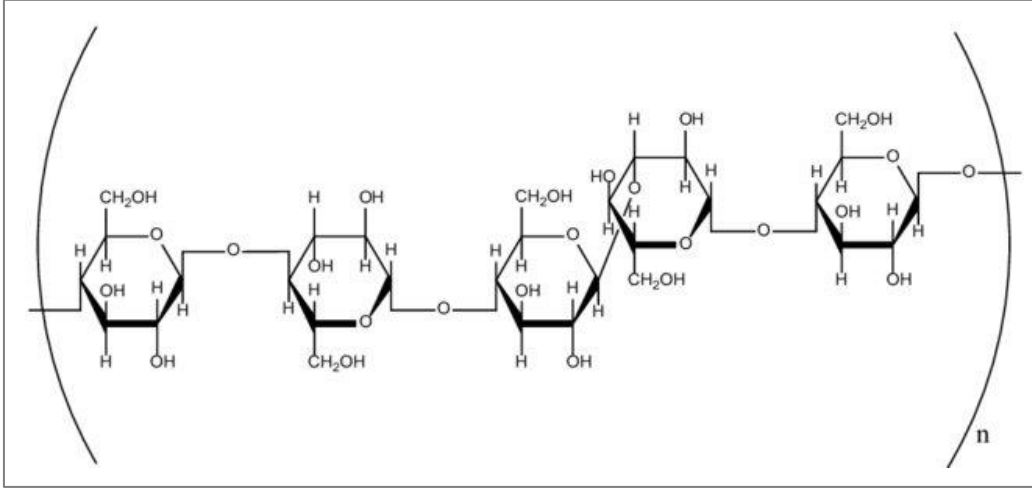
ekstraksiyonu(Kao ve diğeri, 2012), ultrason destekli ekstraksiyon (Zhu ve diğeri, 2016) mikrodalga ekstraksiyonu (Ookushi, Sakamoto ve Azuma, 2006)enzim ekstraksiyonu (Zhu ve diğeri, 2016) ve sıcak su ekstraksiyonu, asidik ekstraksiyon (Jeon, Park ve Yoo', 2001) gibi yöntemler mevcuttur. İçlerinde en yaygın kullanılan yöntemin sıcak su ekstraksiyonu olduğu bilinmektedir.  $\beta$ -glukanların kaynakları ve yapıları Çizelge 2.6'da verilmiştir.

Çizelge 2.6. Farklı beta glukan kaynakları ve yapıları (Noss, Doekes, Thorne, Heederik ve Wouters, 2013)

Glukan	Kaynak	Tür	Bağ Yapısı	Moleküler Ağırlık (kDa)
Fırıncı Mayası Glukanı	Maya	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$\beta$ -(1,3), $\beta$ -(1,6)	35-5000
Arpa Glukanı	Bitki	<i>Hordeum vulgare</i>	$\beta$ -(1,3), $\beta$ -(1,4)	23-137
Curdlan	Bakteri	<i>Alcaligenes faecalis</i>	$\beta$ -(1,3), $\beta$ -(1,6)	53-2000
Laminarin	Alg	<i>Laminaria digitata</i>	$\beta$ -(1,3), $\beta$ -(1,6)	3,5-7,7
Lichenan	Liken	<i>Cetraria islandica</i>	$\beta$ -(1,3), $\beta$ -(1,4)	20-35
Yulaf Glukanı	Bitki	<i>Avena sativa</i>	$\beta$ -(1,3), $\beta$ -(1,4)	1-300
Pachyman	Mantar	<i>Poria cocos</i>	$\beta$ -(1,3), $\beta$ -(1,6)	21-100
Paramylon	Alg	<i>Euglena gracilis</i>	$\beta$ -(1,3)	118
Pullulan	Mantar	<i>Aurobasidium pullulan</i>	$\alpha$ -(1,3), $\alpha$ -(1,4)	200
Pustulan	Liken	<i>Umbilicaria</i> sp.	$\beta$ -(1,6)	20
Schizophyllan	Mantar	<i>Schizophyllum commune</i>	$\beta$ -(1,3), $\beta$ -(1,6)	76,8-450
Scleroglucan	Mantar	<i>Sclerotium glaucanicum</i>	$\beta$ -(1,3), $\beta$ -(1,6)	1000-5000
Xyloglucan	Bitki	<i>Tamarind</i>	$\beta$ -(1,4)	202

### Tahıl $\beta$ - glukanları

Tahıllardan ekstrakte edilen  $\beta$ - glukanlar, diğeri polimerlerden fizikokimyasal yönlerden farklıdır. Tahıl  $\beta$ -glukanları, yüksek moleküler ağırlıklı, lineer ve uzun zincirli  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) ve  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) bağlarından oluşan homopolisakaritlerdir (Henrion, Francey, Lê ve Lamothe, 2019).Molekül yapısı Şekil 2.9'da verilmiştir.



Şekil 2.9. Tahıl  $\beta$ -glukanının yapısı (Abdi ve Joye, 2021)

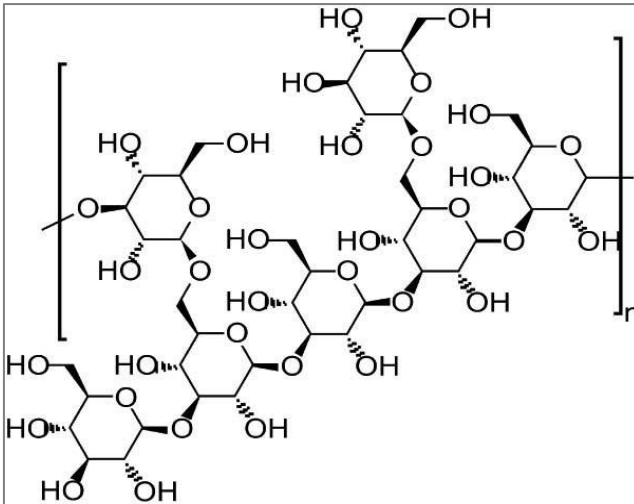
Tahıl  $\beta$ -glukanları %4,5  $\beta$ -glukan içeren yulaf ve arpada doğal olarak bulunan bu diyet lifleri kan kolesterol seviyelerini iyileştirmek, tip II diyabet ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi gibi birçok sağlık üzerinde olumlu etkilere sahiptir (Cho, 1993). Yulaf ve arpa haricinde buğday ve çavdarda da daha düşük konsantrasyonlarda bulunduğu bilinmektedir.  $\beta$ -glukanların obezite ile ilişkili metabolik bozuklukları kontrol etmede kullanılabilmesinin yanı sıra Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından yulaf  $\beta$ -glukanlarının hiperkolesterolemiye sahip bireylerde kandaki kolesterol seviyesini düşürebileceği ve iştah hastalıklarını da önleyici etkileri olduğunu açıklamıştır (Biörklund, van Rees, Mensink ve Önning, 2005). Ek olarak tahıllardan elde edilen  $\beta$ -glukanlar kahvaltılıklara, ekmek, kek, makarna gibi unlu mamüllere, et ve süt ürünlerine dahil edilmiştir (Lazaridou ve Biliaderis, 2007).

Tahıl  $\beta$ -glukanlarının mide-bağırsak iç viskoziteyi artırması sonucu karbonhidratların sindirimini yavaşlattığı bu sebeple de kolesterol, safra asidi, metabolitlerin emilimini azalttığı ve hiperglisemiye önlediği bulunmuştur.  $\beta$ -glukanların kan şekeri üzerinde olumlu etkileri olduğu Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından onaylanmıştır. Bu mekanizmanın  $\beta$  glukanların viskozite özellikleri sonucu alınan besinin emilimini geciktirdiği, böylelikle glukozun kan akışına daha yavaş karışmasını sağladığı ve sonuç olarak stabil kan şekeri seviyeleri ile sonuçlanmaktadır. Arpa  $\beta$ -glukanlarının anti-hiperkolesterolemik, antioksidan ve antimikrobiyal etkileri yapılan çalışmalar (Jeddou ve diğerleri, 2016) (Kong ve diğerleri, 2020) sonucu kanıtlanmakla birlikte Lee ve arkadaşları (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, arpa  $\beta$ -glukanından elde edilen  $\beta$ -gluko-oligosakkarit ( $\beta$ -GOS) bileşiğinin probiyotiklerin gelişimini ve antimikrobiyal aktivitesini

modüle ederek prebiyotik aktivitesi gösterdiği kanıtlanmıştır (Jeddou ve diğerleri, 2016) (Kong ve diğerleri, 2020).

### Mantar beta glukanları

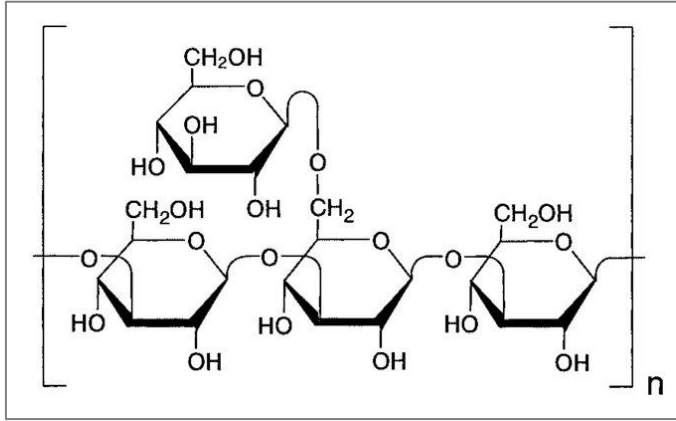
Mantarlarda en yaygın bulunan polisakkaritler kitin, hemiselüloz, beta-glukan, alfa-glukan, mannan, ksilan ve galaktandır. Mantar polisakkaritlerinin biyolojik aktiviteleri, yapılarında barındırdıkları monomerlerin moleküler ağırlığına, dallanma derecelerine, suda çözünürlük kabiliyetlerine bağlı olarak değişmektedir. Yapılan bazı çalışmalar  $\beta$ -(1,3) bağ yapısına sahip olan mantar glukanlarının yüksek derecede anti-kanser özellikte olduğunu göstermiştir (H. Xu, Zou, Xu ve Zhang, 2016) (Zhang, Cui, Cheung ve Wang, 2007). *Lentinula edodes* mantarının hücre duvarından elde edilen  $\beta$ -glukanın (Lentinan) tümörlü hücre apoptozunu indükleyici hatta tümör hücrelerini doğrudan öldürmek gibi çeşitli mekanizmalara sahip olduğu Wang ve ark. tarafından yapılan çalışma ile kanıtlanmıştır (Huang ve diğerleri, 2013). *L. edodes* mantarından elde edilen  $\beta$ -glukanın düşük seviyede toksisiteye sahip olması onu tıbbi ve farmakolojik yönden popüler hale getirmiş ve üzerinde birçok çalışma yürütülmüştür. İmmün sistemi uyarıcı, antikanser, antioksidan özelliklerinin yanı sıra kandaki lipid seviyesini düşürücü özelliği de keşfedilmiştir (Rodriguez-Morales ve diğerleri, 2020) (Zi, Jiang, He ve Liu, 2020).



Şekil 2.10. Lentinan'ın kimyasal yapısı (Bisen, Baghel, Sanodiya, Thakur ve Prasad, 2010)

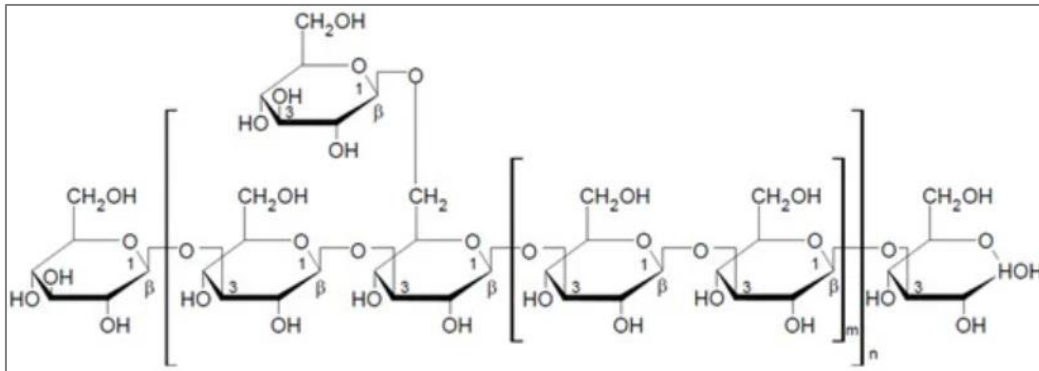
*Schizophyllum commune* mantarından elde edilen Schizophyllan glukanı (Şekil 2.11),  $\beta$ -(1,3), (1,6) dallanmaya sahip, iyonik olmayan, suda çözünür özellikte olan bir

homoglukandır (Huang ve diğeri, 2013). Yapılan son çalışmalar, Schizophyllan'ın farelerin makrofaj hücrelerinde anti-inflamatuvar yanıt geliştirdiğini, proinflamatuvar sitokin seviyesini arttırdığını özellikle interlökin 10 (IL-10)'un üretimini arttırdığını ortaya koymuştur (Mirończuk-Chodakowska, Kujawowicz ve Witkowska, 2021).



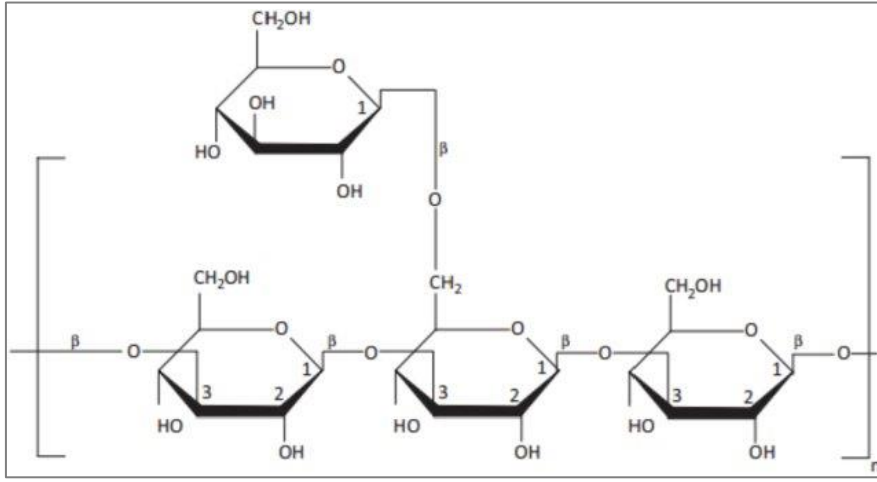
Şekil 2.11. Schizophyllan'ın kimyasal yapısı (Mizu, Koumoto, Kimura, Sakurai ve Shinkai, 2003)

Japonya'da çok popüler bir ilaç olan ve *Trametes versicolor* mantarından ekstrakte edilen Krestin adlı  $\beta$ -glukan (Şekil 2.12) bileşiğinin ise meme, karaciğer, mide, kolon, akciğer ve prostat gibi birçok kanser türünden muzdarip olup kemoterapi gören hastaların üzerinde T lenfosit ve antijen sunan hücreleri uyarmak gibi olumlu etkileri olduğu saptanmıştır (Lemieszek ve Rzeski, 2012). Krestin'in immün sistem güçlendirici, antiviral etkinlik, hipokolesterolemik ve prebiyotik aktiviteye sahip olduğu da yapılan çalışmalar sonucu ortaya çıkarılmıştır (Yamashita ve diğeri, 2007) (Maehara ve diğeri, 2012).



Şekil 2.12. Krestin'in kimyasal yapısı (Mirończuk-Chodakowska ve diğeri, 2021)

*Pleurotus ostreatus* mantarından elde edilen  $\beta$ -(1,3), (1,6) dallanmaya sahip olan Pleuran (Şekil 2.13) ilaç sektöründe “Immunoglukan” ticari adıyla diyet takviyesi olarak satılan bir glukan çeşitidir. Pleuran’ın epitelyum oluşturucu yeteneği ve HSV (Herpes Simplex Virüs)’ye karşı antiviral etkinliği kanıtlanmıştır (Jesenak ve diğerleri, 2013) (Urbancikova ve diğerleri, 2020). Ayrıca Bergendiova vd., (2011) tarafından yapılan bir çalışmada *Pleurotus*’tan türetilen  $\beta$ -glukanın patojenleri ortadan kaldırmaya yönelik olan fagositoz olayının uyarılmasını içeren en güçlü immünomodülatör ajan olduğunu kanıtlamıştır (Bergendiova, Tibenska ve Majtan, 2011).



Şekil 2.13. Pleuran’ın kimyasal yapısı (Selvamani ve diğerleri, 2018)

## 2.5. Beta Glukanların Kullanım Alanları

Biyopolimerler gıda endüstrisinde gıda maddelerinin yapımından ambalajlarına kadar yaygın olarak kullanılmaktadır. Bazıları emülgatörler, sertleştirici maddeler veya koyulaştırıcılar olarak kullanılırlar. Aljinatlar gibi poliüronatlar, diyet takviyeleri için vitaminleri ve az yağlı gıdalar için misel sistemlerini kapsüllemek için kullanılmaktadır. Gıda ambalajı ve yenilebilir filmler, gıda endüstrisinde nişasta bazlı biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerin iki ana uygulamasıdır (Augustine, Rajendran, Cvelbar, Mozetič ve George, 2013).  $\beta$ -glukan, koyulaştırma, stabilize etme, emülsifikasyon ve jelleşme gibi çeşitli fiziksel özelliklere sahiptir (Ahmad, Anjum, Zahoor, Nawaz ve Dilshad, 2012).  $\beta$ -Glukan, çok çeşitli ek sağlık yararları sunan kabul edilebilir sağlık ürünlerinde kullanım potansiyeline sahip bir doğal polisakkarittir.  $\beta$ -Glukanlar tıp ve eczacılık, gıda, kozmetik ve kimya endüstrilerinde, veterinerlik ve yem üretiminde potansiyel uygulama alanına sahiptir (Zhu ve diğerleri, 2016).

### 2.5.1. Gıda endüstrisinde kullanımı

Polimerler, gıda üretiminde yoğun şekilde kullanım alanına sahip olan özellikle jelleşme, stabilize etme gibi fizikokimyasal özelliklere sahiptir. Karagenan, guar zımkı, ksantan zımkı, alginat, pektin, agar, nişasta ve farklı kaynaklardan elde edilen  $\beta$ -glukanlar gibi birçok doğal polisakkarit hali hazırda gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Glisemik yanıtı manipüle edici beta glukan içeren yoğurtlar, beta glukan içeren kolesterol düşürücü ve kalorisi azaltılmış ekmekler bu uygulamalardan yalnızca birkaçıdır. Farklı kaynaklardan elde edilen  $\beta$ -glukanlar gıda koyulaştırıcı, emülgatör, diyet lifi takviyesi gibi alanlarda sıkça kullanılmaktadır (Krpan, Srećec ve Krbavčić, 2010). Beta-glukanlar, gıda ürünlerine dahil edildiğinde prebiyotik özellikler gösterebilmektedir (Lam ve Chi-Keung Cheung, 2013). Bunların yanı sıra bisküvilerde, kurabiyelerde, süt ve süt ürünlerinde, mayonezlerde, sirkelerde kullanılmaktadır (Krpan ve diğerleri, 2010). Sağlık ve beslenme faydalarının yanı sıra  $\beta$ -glukan ayrıca koyulaştırma, stabilize etme, emülsifikasyon ve jelleşme gibi çeşitli uygun fonksiyonel özelliklere sahiptir. Bu özellikler,  $\beta$ -glukanın çorbalara, soslara, içeceklere ve diğer gıda ürünlerine katılma uygunluğunu belirlemektedir (Dawkins ve Nnanna, 1995) (Burkus ve Temelli, 1999).  $\beta$ -glukanların gıda sektöründe çeşitli kullanım örnekleri Çizelge 2.7’de verilmiştir.

Çizelge 2.7.  $\beta$ -glukanların gıda endüstrisinde kullanım alanları (Krpan ve diğerleri, 2010)

Gıdadaki İşlev	$\beta$ -glukan Adı	Biyolojik Orjin	Referans
Kalorisiz Gıda Koyulaştırıcı	Curdlan Maya $\beta$ -glukanı	<i>Alcaligenes faecalis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Jezequel, 2009) (Shukla ve Gregory, 2005) (Reed ve Nagodawithana, 1991)
Yağ İkame Maddeleri	Tahıl $\beta$ -glukanı Maya $\beta$ -glukanı	Arpa Bira mayası	(Laroche ve Michaud, 2008); (Brennan ve Tudorica, 2007); (Worrasinchai, Supphantharika, Pinjai ve Jamnong, 2006)
Emülsifiye Edici	EPS Maya $\beta$ -glukanı	Bakteri Bira Mayası	(Laroche ve Michaud, 2008); (Thammakiti, Supphantharika, Phaesuwan ve Verduyn, 2004.)
Su Tutucu	Maya $\beta$ -glukanı	Bira Mayası	(Thammakiti ve diğerleri, 2004)
Yağ bağlayıcı	Maya $\beta$ -glukanı	Bira Mayası	(Thammakiti ve diğerleri, 2004)
Film Özellikleri	Curdlan $\beta$ -glukan	<i>Alcaligenes faecalis</i> Mantar	(Laroche ve Michaud, 2007)
LDL Kolesterol Düşürücü	$\beta$ -glukan	Yulaf	(Nicolosi ve diğerleri, 1999) (Queenan ve diğerleri, 2007)
Kan Şekeri Seviyesi Düşürücü	$\beta$ -glukan	Maya	(Kida ve diğerleri, 1992) (Nicolosi ve diğerleri, 1999)
Diyet Lifi	$\beta$ -glukan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Sucher R. E, Robbins E. A., Sidoti D. R., Schuldt Jr. E. H., 2002)
Prebiyotik Uygulamalar	$\beta$ -glukan hidrolizatları $\beta$ -glukan	Yulaf <i>Pleurotus</i> mantarı	(Synytsya ve diğerleri, 2009a)

### 2.5.2. Kozmetik endüstrisinde kullanımı

$\beta$ -Glukan, genel koruyucu kremler, merhemler, tozlar ve süspansiyonlarda kullanılmaktadır (Zhu ve diğeri, 2016). Biyopolimerler, doğal ve sürdürülebilir hammaddeler oldukları için kozmetik biliminde popülaritesi artmaktadır. Protein ve karbonhidratlar da dahil olmak üzere farklı türde biyopolimerler, eski zamanlardan beri kozmetik ajanlar olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Augustine ve diğeri, 2013). Yapılan çalışmalar  $\beta$ -glukanın deriyeye epidermise ve dermise derinlemesine nüfuz ettiğini göstermekte ve sağlıklı cilt bakımı ve yaşlanma belirtilerinin kozmetik tedavisinde  $\beta$ -glukanın kullanımını desteklemektedir.  $\beta$ -glukanın cilt yaşlanmasını geciktirebildiğini, cilt beyazlatma etkisi sağladığını ve cilt hasarını etkili bir şekilde iyileştirdiğini göstermiştir (Jeon ve diğeri, 2001).

Kozmetik sektöründe özellikle hücre yenileyici özelliğinden dolayı beta glukan içerikli kremler bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda; beta glukanın epidermis hücrelerini yenilediği, yaşlılık etkilerini geciktirdiği, cilde esneklik kattığı görülmüştür (Aslankoç ve diğeri, 2020). Birçok marka beta glukan içerikli serumlar, saç kremleri, vücut losyonları, cilt maskeleri gibi ürünleri piyasaya sürülmüştür.

Selüloz, kitin, dekstrinler, pektin, ksantan zankı, hiyalüronik asit, kondroitin sülfat, guar zankı, agar, alginatlar ve karagenan gibi polisakkaritler, doğal kaynakları nedeniyle ucuz ve kolay temin edilebilir olduklarından, kozmetikte uzun süredir kullanılmaktadırlar (Augustine ve diğeri, 2013). Uzun süreli bir glukan kullanımı, muhtemelen fibroblastın uyarılmasından ve kolajen üretiminin artmasından kaynaklanan kırışık derinliğinde, yüksekliğinde ve genel pürüzlülükte azalma göstermektedir (Vetvicka, Vannucci, Sima ve Richter, 2019).

### 2.5.3. Yem endüstrisinde kullanımı

$\beta$ -Glukanlar sadece gıda ve ilaç endüstrilerinde antikanser ve immünomodülatör ajanlar olarak değil, aynı zamanda su ürünleri ve hayvancılık endüstrilerinde hayvanların doğal bağışıklığını arttırmak için üretilmiştir (Hee JUNG ve diğeri, 2007). Hayvancılık endüstrisinde de beta glukan antibiyotiklerin hayvan ve insanlar üzerindeki olumsuz etkilerini önlemek amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu

hayvanlarda immünstimülant ve performans iyileştirici etkileri olduğu görülmüştür (Keser, 2008).

## **2.6. Beta Glukanların Çözünürlüğünü Arttırmak: Karboksimetilasyon**

Karboksimetilasyon, polisakkarit zincirine karboksimetil gruplarının katılmasıdır. Polisakkaritlerin %10 ve/veya %20 alkol gruplarının karboksimetil grupları ile eterleştirilebildiği Williamson eter sentezine dayanmaktadır. İlk aşamada, polisakkaritlerin hidroksil gruplarının sodyum hidroksit ile reaksiyonu ile alkoksit grupları üretilir. İkinci aşamada, karboksimetil grupları daha sonra alkoksit ve monokloroasetik asit (MCA) arasındaki  $SN_2$  reaksiyonu yoluyla oluşturulur (Chakka ve Zhou, 2020).

D-glukanlar, immün stimüle edici etkileri ve terapötik ajanların geliştirilmesinde büyük potansiyele sahip olduğu bilinmektedir ve bu biyopolimerlerin biyolojik aktiviteleri çeşitli kimyasal modifikasyonlar yoluyla artırılabilir (Nie, Shi, Ding ve Tao, 2006). Fonksiyonel grupların (karboksimetil, fosfat, sülfat) eklenmesi sonucu polisakkaritler sulu ortamlarda daha çözünür hale gelerek biyolojik etkinliklerini arttırmaktadır. Glukanların çözünürlüğünü artırmak amacıyla çeşitli modifikasyonlar geliştirilmiştir. Bunlar karboksimetilasyon, sülfonasyon, asetilasyon, fosforilasyondur (D. L. Williams ve diğerleri, 1991).

Karboksimetilasyon, polisakkaritin yapısındaki hidroksil (-OH) gruplarının yerini karboksil gruplarının alması sonucu oluşur ve bu işlem genellikle karboksimetillenecek biyopolimerin alkali koşullarda monokloroasetik asit (MCA) içerisinde süspanse edilmesi sonucu gerçekleşir. Primer ve sekonder alkol gruplarının eterleştirilmesini içerir. Karboksimetilasyon az miktarda su ve suyla karışabilen organik çözücülerle gerçekleştirilir. Literatürdeki çoğu yöntemde, etil alkol ve su karışımında sodyum hidroksit ve monokloroasetik asit (MCA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (De Nooy, Rori, Masci, Dentini ve Crescenzi, 2000).

Beta glukan ( $\beta$ -glukan) biyopolimerinin suda çözünür ve çözünmez formları bulunmaktadır. Her iki formun da nutrasötik sektörü için çeşitli amaçlarla kullanıldığı bilinmektedir. Maya hücre duvarlarından elde edilen  $\beta$ -glukan, çözünmeyen bir parçacık yapısına sahiptir. Bu biyopolimerin çeşitli kimyasal yöntemlerle çözündürülmesi, farklı

sektörlerde kullanımının önünü açmaktadır. Çünkü polisakkaritlerin biyolojik aktiviteleri çözünürlüklerine bağlı olarak değişmektedir. Çözünür  $\beta$ -glukanın birçok biyolojik aktivitesi olmakla birlikte çözünmeyen  $\beta$ -glukanın çözündürülmesi,  $\beta$ -glukanların olası uygulamalarının da önünü açacaktır.  $\beta$ -glukanın çözünürlüğünün çeşitli kimyasal modifikasyonlar uygulanarak artırılması söz edilen maddenin biyoyararlanımını arttıracaktır (Karşlıoğlu, Ertunç, Hitit ve Akay, 2021a).

Karboksimetil beta glukanlar özellikle kimya, gıda, ilaç ve kozmetik sektörlerinde kullanımda büyük potansiyel taşımaktadır. Polisakkaritlere yapılan bu kimyasal türevlendirmeler polisakkaritlerin yapısında bulundukları hidroksil (-OH) gruplarına kimyasal grupların eklenmesi sonucu moleküller arası ve molekül içindeki etkileşimleri azaltarak molekülün hidrofisitesini arttırmaya yöneliktir (Huang ve diğerleri, 2013) (Ai ve diğerleri, 2007).  $\beta$ -glukanların suda çözünürlükleri, insanlarda ve hayvanlarda kolesterol ve tokluk serum glukoz seviyelerini düşürmede önemli bir rol oynar (Kahlon ve Chow, 1997). Çözünür  $\beta$ -glukanlar sulu çözeltide yüksek viskozite gösterirler ve viskoziteyi artırarak (sindirim sistemindeki hidrasyonun bir sonucu olarak) veya jel halindeki maddeler oluşturarak çeşitli besinlerin absorpsiyonunu yavaşlatabilirler. Çözünür arpa  $\beta$ -glukanları, bağırsak yolunda sindirimin viskozitesini artırır ve böylece nişastanın sindirim ve emilimini yavaşlatır (Gaosong ve Vasanthan, 2000). Karboksimetillenmiş  $\beta$ -glukanlarda (CM $\beta$ -glukan), glukanın yapısı yer değiştirme derecesine bağlıdır ve bu ikame derecelerinin artması sonucu glukan üçlü sarmal yapısından tekli sarmal yapıya geçiş yapar ve çözünürlük artırılmış olur. Çözünürlüğü artırılan  $\beta$ -glukanın, farmasötik, kozmetik, biyomedikal uygulamalarında kullanım alanı genişler (Yuan, Lan, He, Li ve Ma, 2020).

Karboksimetillenmiş polisakkaritler, demir iyonu indirgeme kapasitesini artırarak antioksidan özelliklerini de geliştirmektedir (Francini Y. Kagimura ve diğerleri, 2015a). Ayrıca karboksimetillenmiş beta glukanlarda ortaya çıkan çözünürlük ve azalan viskozite sonucu kanserli hücrelerin antiproliferasyonu ve daha gelişmiş antioksidan aktivitelere sahip olacağı da belirlenmiştir (Babincová ve diğerleri, 2002). CM $\beta$ glu'nun radikal süpürücü aktivitesi dolayısıyla antioksidan özelliğinin artması sonucu artrit tedavisinde kullanımı da olası tıbbi uygulamalarından yalnızca biridir. Karboksimetillenmiş beta glukanın radyoaktif etkileri, kan kaybına karşı güçlü koruyucu etkileri (hemopoezi) olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Aleksiev, Reznitskii, Vereshchagin, Vasil'ev ve Vakalova, 1994); (Kofuji ve diğerleri, 2012).

(Šandula, Kogan, Kačuráková ve MacHová, 1999) yapmış olduklarını bir çalışma sonucunda karboksimetillenmiş *Saccharomyces cerevisiae* mayasına ait beta glukanın (1-3)- $\beta$ -D-glukanın, karsinom hücrelerini inhibe ederek dolayısıyla pulmoner metastazları da inhibe ettiğini bulmuştur. Beta glukanın birçok hastalığa (insan venöz ülserleri, tip I ve tip II diyabet, artrit gibi) tedaviye ek terapötik ajan olarak kullanımı ve çözünürlüğünün artırılması ile dolayısıyla biyoyararlanımının da artırılması biyolojik ve biyoteknolojik açıdan çok önemli olmakla birlikte bu konuda yapılacak klinik çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. (Upadhyaya, Singh, Agarwal ve Tewari, 2014), yapmış oldukları bir çalışmada karboksimetilasyonu uğratılmış kitosanların biyomedikal potansiyellerini araştırmıştır. Biyoyoumluluk, yüksek oranda nem tutma kapasitesi gibi özellikleri karboksimetil kitosanın normal kitosandan daha fazla antimikrobiyal özelliği olduğunu ve bu sebeple hidrojel ve yara iyileştirme uygulamalarında potansiyel bir kullanımı olduğu görülmüştür. Karboksimetilasyon yapılmış kitosanın biyoyoumluluğu, biyomateryal olarak çeşitli doku mühendisliği çalışmalarında kullanılabilceğinin bir göstergesidir. Kitosanın karboksimetilasyonu, çözünürlüğünü arttırarak çözünmez haldeki ilaçların verilmesi için bir araç haline getirerek biyoyararlanımını arttırır. Karboksimetil kitosanın nanopartiküllere işlenmesinin de biyosensör, gen tedavisi, ilaç dağıtımı gibi sektörler için önemli bir unsur olduğu da bu araştırma sonucu ortaya konmuştur. Ayrıca birçok immünomodülatör aktiviteye sahip olan fungal  $\beta$ -glukanlar, eğer suda çözünmez formda parentetal yolla uygulanırsa çok ciddi yan etkilere (granülom oluşumu, mikroembolizasyon, ağrı, inflamasyon) sebep olmaktadır. Bu durumu önlemek için  $\beta$ -glukan biyopolimerinin suda çözünür forma geçirilmesi ve bu amaçla kimyasal modifikasyonların uygulanması önemlidir (Upadhyaya ve diğerleri, 2014).

$\beta$ -glukanlara uygulanan bazı kimyasal modifikasyonlar ve fizyolojik işlevleri Çizelge 2.8’de verilmiştir.

Çizelge 2.8.  $\beta$ -glukan modifikasyonları ve ürünlerinin fizyolojik işlevleri (Bai ve diğerleri, 2019)

Uygulanan Modifikasyon	Kullanılan Beta Glukan	Beta Glukan Kaynağı	Fonksiyon	Referans
Sülfonasyon	(1 → 3) (1 → 6) - $\beta$ -D-glukan	<i>Russula virescens</i> / mantar	Antitümör	(Sun, Shi, Wang, Fang ve Huang, 2017)
Sülfonasyon	(1 → 3) (1 → 6) - $\beta$ -D-glukan	Maya	İmmün sistem module edici	(Sun ve diğerleri, 2017)
Karboksimetilasyon	(1 → 3) (1 → 6) - $\beta$ -D-glukan	<i>Lasioidiplodia theobromae</i> / mantar	Antioksidan	(Francini Kagimura ve diğerleri, 2015a)
Karboksimetilasyon	(1 → 3) (1 → 6) - $\beta$ -D-glukan	<i>Pleurotus tuber rejimi</i> / mantar	Antitümör	(H. Xu ve diğerleri, 2016)
Karboksimetilasyon - sülfonasyon	(1 → 3) (1 → 6) - $\beta$ -D-glukan	<i>Poria cocos</i> /mantar	İmmünomodülatör	(M. Wang ve diğerleri, 2016)
Asetilasyon	(1 → 3) (1 → 6) - $\beta$ -D-glukan	Yulaf	Safra aside bağlama kapasitesinin artırılması	(De Souza ve diğerleri, 2015)
Fosforilasyon	(1 → 3) (1 → 6) - $\beta$ -D-glukan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> /maya	İmmün stimüle edici etki	(Shi, Shi ve Li, 2014)

## 2.7. Serbest Radikaller

Oksijen molekülü insan yaşamı için oldukça önemli bir unsur olmasına rağmen metabolizma esnasında üretilen bazı reaktif oksijen türleri vücuda zarar verme eğilimine sahiptir (Diplock ve diğerleri, 1998). Hücreler enerji üretimi için oksijen kullanarak mitokondri tarafından serbest radikaller dediğimiz yan ürünler üretilmesine yol açmaktadır. Serbest radikaller, dış orbitalinde bir veya birden fazla sayıda eşlenmemiş elektron barındıran, kararsız, saldırgan ve diğer radikallerle etkileşime girme yeteneğine sahip olan moleküllere verilen addır (Balakrishnan, Kandasamy ve Nithyanand, 2014). Reaktif oksijen türleri (ROS), normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali ( $O_2 \cdot^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikali ( $OH\cdot$ )'dir (Çizelge 2.9). Günlük hayatımızda sigara içmek, güneş ışınlarına uzun süre maruz kalmak, duygusal stres, sağlıksız beslenme gibi sebeplerden ötürü serbest radikallere sürekli maruz kalınmaktadır (Tiwari ve Jatawa, 2011). Reaktif oksijen türlerinin kaynakları Çizelge 2.10'da verilmiştir.

Çizelge 2.9. Reaktif oksijen türleri (Chiurchiù ve MacCarrone, 2011)

Radikal reaktif oksijen türleri	Radikal olmayan reaktif oksijen türleri
Süperoksit Radikal	Hidrojen Peroksit
Hidroksil Radikal	Lipid Hidroperoksit
Alkoksil Radikal	Hipoklorik Asit
Peroksil Radikal	Ozon

Çizelge 2.10. Reaktif oksijen kaynakları (Aslankoç ve diğerleri, 2019)

Endojen kaynaklar	Ekzojen kaynaklar
Mitokondri	UV ışınları
Peroksizom	Radyasyon
Lipoksijenaz	Sigara ve hava kirliliği (Çevresel toksinler)
NADPH Oksidaz	İnflamatuvar Sitokinler

Bazı serbest radikaller normal metabolizma esnasında ortaya çıkarak yararlı roller üstlenebilir (Das Sarma, Mallick ve Ghosh, 2010). Bunlardan birkaçı;

- Atardamarlardaki kan akışının kontrolü,
- Enfeksiyona karşı savaşmak,
- Beyni uyanık ve odakta tutabilmek,
- Düşük seviyelerdeki bazı serbest radikaller sinyal molekülleri olarak görev yapması,
- Nitrit oksit ve süperoksit gibi serbest radikallerin, virus ve bakterileri zehirlemek amacıyla bağışıklık hücreleri tarafından yüksek miktarda üretilmesi.

Oksidanlar DNA, lipid, protein, hücre zarı gibi kısımlarda çeşitli hasarlara sebep olarak bazı hastalıkların oluşumunda rol alırlar. Bu hastalıklardan birkaçı kanser, ateroskleroz, diyabet, astım gibi çeşitli solunum yolu rahatsızlıkları, nörolojik bozukluk, hipertansiyon, romatoid artrit, deri hastalıkları, Behçet hastalığı, iskemi, katarakttır (Balakrishnan ve diğerleri, 2014); (Z. X. Gao, Rao ve Li, 2017). Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu inflamasyon, radyasyon, yaşlanma, kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı uyarıların etkisiyle artar. Serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasar, yaşla birlikte artar ve kronik rahatsızlıklara, bağışıklık sisteminin zayıflamasına ve yaşamı tehdit eden diğer birçok hastalığa neden olur (Tiwari ve Jatawa, 2011). Bu serbest radikaller metabolizma içerisinde durmaksızın üretilmekte ve antioksidanlar adı verdiğimiz savunma sistemleri ile ortadan

kaldırılmaktadır. Fakat serbest radikal (oksidan) artışında veya onları baskılayan antioksidan savunma sisteminde azalma meydana geldiğinde sistem çökmekte ve bu durum sonucunda oksidatif stres adını verdiğimiz bir durum ortaya çıkmaktadır (Pham-Huy, He ve Pham-Huy, 2008). Oksidatif stresin, serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarıyla birçok kronik hastalığın komplikasyonlarına (aterogenez, amfizem/bronşit, Parkinson hastalığı, Duchenne tipi kas distrofi, serviks kanseri, alkolik karaciğer hastalığı, Diabetes mellitus, akut renal yetmezlik, Down sendromu, yaşlanma, serebrovasküler bozukluklar) gibi durumların patogenezinde oksidatif stresin rolünden söz edilmektedir. Serbest radikallerin sebep olduğu bazı hastalıklar Çizelge 2.11’de verilmiştir.

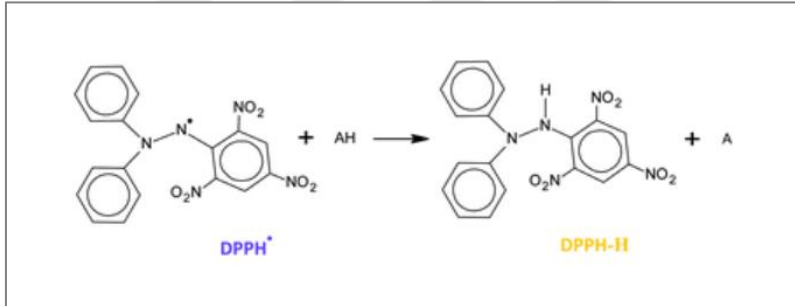
Çizelge 2.11. Serbest radikaller ve yarattığı hastalıklar

Hastalıklar		Kaynak
Kanser	Serbest radikaller, genetik materyalin yapısındaki bileşenler ile reaksiyona girerek DNA’nın bazlarına ve omurgasına modifikasyon, mutasyon gibi zararlara sebep olur ve kanser dokularında hasar meydana getirmektedir. Bu durum onkogen aktivasyonuna ve kromozomal bozukluklara yol açabilir. Serbest radikallerin saldırısını durduran antioksidan adlı bileşiklerin anti-tümör rolü olduğu da bilinmektedir.	Tiwari ve Jatawa, 2011
Romatoit Artrit	Romatizmal eklem iltihabının ilerlemesi, inflamasyon bölgesinde bulunan reaktif oksijen türlerinin üretimine bağlıdır.	X. Wang ve diğerleri, 2022
Kalp-damar hastalıkları	Nötrofiller, makrofajlar gibi spesifik inflamatuvar hücreler veya oksidaz, mitokondri gibi bazı enzimler serbest radikalleri ürettiğinde lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres sonucu felce yol açabilmektedir. Deneysel kanıtlara göre oksidatif stress; iskemi, kardiyomiyopati, hipertansiyon ve kalp hipertrofisi gibi önemli hastalıkların oluşumunda rol oynamaktadır. Diyet antioksidanlarının bir kısmının, ateroskleroz gen ekspresyonunu potansiyel olarak olumlu yönde etkileyebileceği kanıtlanmıştır	Pham-Huy ve diğerleri, 2008
Akciğer Hastalıkları	Serbest radikallerin hücrelerde meydana getirmiş olduğu hasar, bronşlardaki iltihaplanmanın bir sebebi olarak kabul edilmektedir ve yapılan bazı araştırmalar sonucu ROS türlerinin astıma yol açabileceği görülmüştür.	Percival, 1996
Diyabet	Serbest radikallerin yol açtığı oksidatif hasar, insulin direnci, tip II diyabet ve disglisemi gibi rahatsızlıklarda önemli ölçüde rol almaktadır. Diyabet hastalarında yüksek ROS konsantrasyonu gözlenmektedir.	Jay, Hitomi ve Griendling, 2006
Nörodejeneratif hastalıklar	Reaktif oksijen türlerinin nöron kaybına sebep olmasının ardından hafıza kaybı, MS (multiple skleroz), depresyon gibi hastalıklara yol açma olasılığının olduğu bulunmuştur.	Pham-Huy ve diğerleri, 2008
Yaşlanma	ROS üretimi yaşa bağlı olarak artar ve oksidasyon sebebiyle oluşan mitokondriyal hasar olasılığı da bununla birlikte artar. Oksidatif stress, antioksidan aktiviteye sahip olan diyet bileşenleri ile module edilebilir ve bu da oluşabilecek hastalıkların azalmasına neden olmaktadır.	Meydani, 2001
Nefropati	Kronik böbrek yetmezliği, üremi, glomerülonefrit ve proteinüri gibi böbrek hastalıklarında oksidatif stres önemli rol oynar. Reaktif oksijen türleri, diyabetik nefropatiyi destekleyen düşük yoğunluklu lipoproteinlerin ve diğer lipidlerin oksidasyonunu başlatır. Plazmadaki endojen antioksidanlar oksidasyon hızını baskılar.	Mshelia, 2004

Birçok rahatsızlığa sebep olmasından dolayı, metabolizmayı serbest radikallerden korumak ve bu radikallerin yarattığı oksidatif hasarı en aza indirmek için yeni doğal antioksidanların keşfi çok önemlidir. Hayvan, bitki ve mikroorganizmalarda bol miktarda bulunan polisakkaritlerin radikal süpürücü etkileri kanıtlanmıştır (Tsiapali ve diğerleri, 2001); (Zhang, Li, Xiao, Xie ve Yang, 2022). Polisakkaritlerin biyolojik aktivitelerinin ise suda çözünürlüğüne bağlı olduğu yapılan çalışmalar sonucu belirlenmiştir (Xia ve diğerleri, 2021).

### 2.7.1. DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) radikali

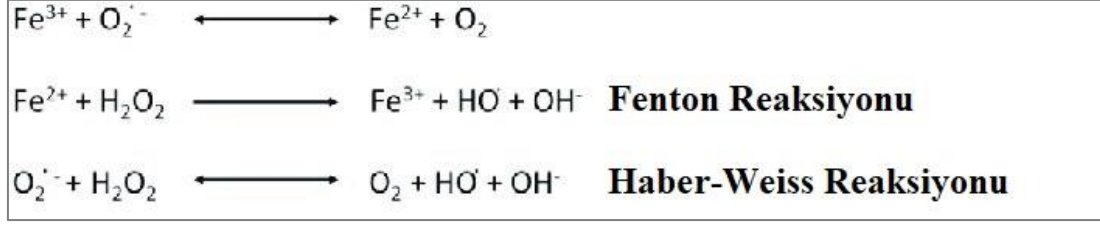
DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidraz) (Şekil 2.17), kararlı ve serbest bir radikaldir (Sharma ve Bhat, 2009). DPPH radikalının üretim gerektirmemesi, sabit olması gibi sebeplerden dolayı antioksidanların aktivitesini belirlemede ucuz, hızlı, doğru ve kolay bir yöntem olarak kabul edilen yaygın kullanılan spektrofotometrik yöntemdir. DPPH reaktifinin zayıf antioksidanlarda dahi etkileşim meydana getirmesi yöntemin avantajlarından biridir (Kedare ve Singh, 2011).



Şekil 2.14. DPPH radikali (Pyrzynska ve Pe, 2013)

### 2.7.2. Hidroksil radikali

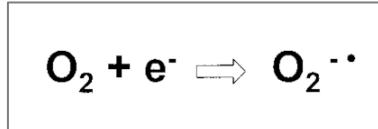
Hidroksil ( $\text{OH}^\cdot$ ) radikali, Şekil 2.18'de de gösterildiği gibi hidrojen peroksitin bazı geçiş elementleri varlığında indirgenerek hidroksil ( $\text{OH}^\cdot$ )'e dönüştürülmesi sonucu oluşur. Bu indirgenme reaksiyonuna Fenton reaksiyonu adı verilir. Süperoksit radikalının fenton reaksiyonu sonucu oluşan metal iyonları ile yeniden kullanılmasında da Haber-Weiss reaksiyonu etkilidir. Hidroksil radikali, biyolojik moleküller ile oluşturduğu güçlü reaksiyondan dolayı reaktif oksijen türlerinin (ROS) arasında en güçlüsü olarak değerlendirilmektedir (Aslankoç ve diğerleri, 2019).



Şekil 2.15. Hidroksil radikali tepkimeleri (Chawla, Beers-Mulroy ve Tidmarsh, 2019)

### 2.7.3. Süperoksit anyon radikali

Süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot -}$ ) (Şekil 2.19), aerobik hücrelerde organizmanın yaşamı için gerekli olan ve oksijen molekülünün bir elektron alarak indirgenmesi sonucu meydana gelen bir radikaldir. Bu serbest radikal, programlı hücre ölümü (apoptoz), yaşlanma gibi birçok biyolojik prosesi düzenleyen sinyal görevi gören bir moleküldür. Antioksidan savunma sisteminin yetersiz kalması sonucu oluşan aşırı süperoksit anyon radikali oluşumunda meydana gelen oksidatif stres biyomoleküllere zarar vererek fizyolojik fonksiyonları bozmaktadır. Bu bozulmalar sonucu hastalıklar ortaya çıkmaktadır.  $O_2^{\cdot -}$ 'nin ortamdan süpürülmesi, çeşitli bileşiklerin antioksidan aktivitesini test etmekte yaygın kullanılan bir yöntemdir (Chiste, Freitas, Mercadante ve Fernandes, 2015).



Şekil 2.16. Süperoksit anyon radikalının yapısı (Ann Liebert, Evans ve Goldfine, 2000)

### 2.8. Oksidatif Stres

Vücut hücrelerin enerji ihtiyacını karşılamak amacıyla sürekli oksijen molekülüyle reaksiyona girmektedir. Oksidatif stres ise, bu reaksiyonlar sonucu oluşan serbest radikaller ile hücrelerin antioksidan özellikleri arasındaki dengesizlikten kaynaklanan bir hasardır. Serbest radikallerin çoğalması ve antioksidan miktarının üstüne çıkması sonucu hücrelerde oluşan oksidatif stress, birçok nörodejeneratif hastalığın oluşumunda rol alır. Parkinson hastalığı bunlardan biridir (Gandhi ve Abramov, 2012). Ayrıca (Pisoschi ve Pop, 2015) tarafından yapılan bir çalışma sonucu oksidatif stresin Down sendromunun biyolojik yapısında rol aldığı da kanıtlanmıştır (Pisoschi ve Pop, 2015). Oksidatif stresin ateroskleroz

gibi ciddi damar tıkanıklığı hastalıklarında, reaktif oksijen türlerinin onkogenleri stimüle etmesi sonucu oluşan oksidatif stresin de kanser patogenezinde rol aldığı görülmüştür (Tandon, Sharma, Mahajan ve Bardi, 2005).

## 2.9. Antioksidanlar

Reaktif oksijenlerin oluşumunu bloke etmek, serbest radikallerce meydana gelen oksidatif stresin hücrelere verdiği hasarı önlemek gibi görevlere sahip savunma sistemlerine “antioksidan savunma sistemi” denmektedir (Karabulut ve Gülay, 2016).

Antioksidanların etki mekanizması;

1. Toplayıcı etki: Oksidanları baskılayarak zayıflatma etkisidir.
2. Bastırıcı etki: Oksidanlarla etkileşime girme sonucu onlara bir hidrojen (H) atomu vererek saldırganlıklarını durdurma, inaktive etme etkisidir.
3. Zincir kırıcı etki: Oksidanları bağlayarak zincirlerini ayırıp fonksiyonlarını engelleme etkisidir.
4. Onarıcı etki: Oksidanların meydana getirmiş olduğu hücre hasarlarını onarma etkisidir.

Antioksidanlar, iki ana grupta incelenmektedir. Bunlar; 1) enzimatik antioksidanlar, 2) non-enzimatik antioksidanlardır. Enzimatik antioksidanlar kendi içerisinde alt gruplara ayrıldıkları gibi, enzimatik olmayan antioksidanlar da endojen kaynaklı ve ekzojen kaynaklı olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır (Carocho ve Ferreira, 2013).Endojen antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar (Çizelge 2.12).

Çizelge 2.12. Endojen antioksidanlar (Da Costa, Badawi ve El-Sohemy, 2012)

Enzim endojen antioksidanlar	Enzim olmayan endojen antioksidanlar
Süperoksit Dismutaz	Melatonin
Glutasyon Peroksidaz	Seruloplazmin
Glutasyon S-Transferaz	Transferrin
Katalaz	Miyogloblin
Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz Sistemi	Hemoglobin
Hidroperoksidaz	Ferritin
	Bilirubin
	Glutasyon
	Sistein
	Metiyonin
	Ürat
	Laktoferrin
	Albümin

Ekzojen antioksidanlar, vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere sınıflandırılabilirler (Çizelge 2.13)

Çizelge 2.13. Ekzojen antioksidanlar (Carocho ve Ferreira, 2013)

Vitamin ekzojen antioksidanlar	İlaç olarak kullanılan ekzojen antioksidanlar	Gıda antioksidanları
$\alpha$ -tokoferol (vitamin E).	Ksantin oksidaz inhibitörleri	Bütil Hidroksi Toluen (BHT)
$\beta$ -karoten	NADPH oksidaz inhibitörleri	Bütilhidroksianisol (BHA)
C vitamini (askorbik asit)	Rekombinant süperoksit dismutaz	Sodyum Benzoat
Folat (folik asit)	Trolox-C (vitamin E analogu)	Etoksisin
	Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar	Propil Gallat
	Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)	Süperoksit Dismutaz
	Demir redoks döngüsü inhibitörleri	
	Sitokinler (TNF ve IL-1 ve 10)	
	Demir şelatörleri	

Antioksidan savunma sisteminin etkinliği; E vitamini, C vitamini ve karotenoidler gibi antioksidan vitaminleri ve esansiyel iz mineralleri içeren gıdaların yeterince alınmasına bağlıdır (Duthie, Wahle ve James, 1989). Bu vitaminler birlikte etkin bir şekilde çalışarak hastalık ve hasarlara neden olan zararlı reaktif oksijen türlerinin etkisini yok etmektedir. E vitamini (tokoferoller), yağda çözünebilen başlıca antioksidanlardan olup tüm hücre

membranlarında bulunmakta ve çoklu doymamış yağ asitlerini oksidasyona karşı korumaktadır (Diplock ve diğerleri, 1998). E vitamininin yüksek dozlarda diyetle ilavesinin LDL düzeylerini önemli ölçüde artırdığı ve oksidatif strese karşı oldukça koruyucu olduğu bildirilmektedir (Reaven, Khouw, Beltz, Parthasarathy ve Witztum, 1993). Askorbik asit de vücudun ekstraselüler sıvılarında bulunan ve suda çözünebilen önemli bir antioksidandır. Vücutta sentezlenemediği için gıdalarla dışarıdan alınması gerekmektedir. Karotenoidler ise; antioksidan aktivitelerini serbest radikal reaksiyonlarına katılarak zararlı hidrojen peroksitlerin oluşum hızını azaltmak suretiyle gösterirler (Di Mascio, Murphy ve Sies, 1991). Özellikle bitkisel gıdalarda bulunan fenolik bileşikler de indirgen ajan, hidrojen verici, tekli oksijen yakalayıcı ve metal kelatör olmaları nedeniyle önemli antioksidanlar arasında sayılmaktadır (Rice-Evans, Miller', Bolwell', Bramley ve Pridham', 1995). Selenyum, bakır, manganez ve çinko gibi mineraller de koruyucu enzimlerin yapıları ve katalitik aktiviteleri için gereklidir (Diplock ve diğerleri, 1998).

## 2.10. Sitokinler

Polisakkaritler; makrofaj, T lenfosit, B lenfosit, sitotoksik T lenfosit, doğal öldürücü hücreler gibi birçok efektör hücreleri TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  gibi sitokinleri eksprese ederek aktivasyon sağlamaktadır (Lei Chen ve diğerleri, 2019).

Doğal polisakkaritlerin anti-inflamatuvar aktiviteleri deneysel olarak tespit edilmiş ve inflamasyonu engellemek ve kontrol etmek için nanomalzemelerde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Doğal polisakkaritlerin sitokinler (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) ve nitrik oksit (NO) gibi inflamasyonla ilgili araçlar üzerinde supresif bir etkisi olduğu ve iltihaplı hücrelerin şişmesini azalttığı yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Ullah, Khalil, Shaukat ve Song, 2019).

Sitokinler, bağışıklık tepkisini düzenlemek ve etkilemek için makrofajlar ve lenfositler tarafından salgılanan ve immün sistem hücrelerinin proliferasyonunda ve farklılaşmasında rol oynayan, hücreler arası iletişimi sağlayan proteinlerdir. Proinflamatuvar sitokinlerin salınımı, bağışıklık hücrelerinin aktivasyonuna, üretimine ve ayrıca başka sitokinlerin de salınmasına yol açacaktır. Yapılan çalışmalar çok sayıda hastalığın patogenezi veya tedavisinde sitokinlerin rolü bulunduğunu ortaya koymaktadır (Habtemariam, 2013). Doğal immünyetede rol oynayan sitokinler arasında, tümör nekrozis faktör-alfa (TNF $\alpha$ ), interlökin 1

(IL-1), interlökin 6 (IL-6), interlökin 10 (IL-10) ve interlökin 12 (IL-12) vardır. İnterlökin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), monosit/makrofaj kökenli ikinci en belirgin proinflamatuvar sitokin IL-1 $\beta$ 'dir. IL-1 $\beta$ 'nin kronik inflamatuvar durumların patolojisindeki rolü iyi bilinmektedir (Gabay, Lamacchia ve Palmer, 2010). IL-1beta, otoinflamatuvar hastalıklara aracılık etme rolü nedeniyle IL-1 ailesinin en çok çalışılan üyesidir (Dinarello, 2009). Bazı klinik çalışmalar, IL-6'ya karşı bir monoklonal antikoru, romatoid artrit tedavisinde faydalı etki gösterdiğini göstermiştir (Blanco Alonso ve Agudo Bilbao, 2009). Araştırmalar IL-6'nın Crohn's hastalığı, Romatoid artrit, Alzheimer hastalığı ve tip 2 *Diabetes mellitus* hastalığında rol oynadığını bildirmiştir (Maggio, Guralnik, Longo ve Ferrucci, 2006).

TNF birçok hücre tipinde salgılanan bir glikoproteindir. TNF'nin hücrel kaynağı LPS ile aktive olan mononükleer fagositlerdir. İki çeşit TNF vardır. Bunlar; genellikle aktif makrofajlardan salınan TNF- $\alpha$  (kaşektin) ile aktif T hücrelerinden salınan TNF- $\beta$  (lenfotoksin)'dir (Habtemariam, 2013);(Raffaele Badolato ve diğerleri, 1994) TNF- $\alpha$ , monositler/makrofajlar tarafından salgılanan başlıca proinflamatuvar sitokenlerden biridir. TNF- $\alpha$  nötrofiller, aktive olmuş lenfositler, NK hücreleri, endotelial hücreler ve mast hücreleri tarafından salgılanan proinflamatuvar sitokindir (Steinke ve Borish, 2006).TNF- $\alpha$ , fagostozu arttırarak ve süperoksitlerin salınımına yol açarak solunumun bozulmasına neden olur. Bunun dışında, lökositleri uyararak mikroorganizmalara ve tümör hücrelerine karşı etkinin ortaya çıkmasına neden olur (Steinke ve Borish, 2006); (Samlaska ve Winfield, 1994). TNF- $\alpha$ , monositlerin IL-6 ve IL-8 gibi inflamatuvar sitokinleri yapma kapasitesini arttırır. TNF- $\alpha$  artık romatoid ve osteoartrit, ankilozan spondilit, Crohn hastalığı ve ülseratif kolit, sedef hastalığı vb. dahil olmak üzere kronik inflamatuvar hastalıklar için ana hedef olarak kabul edilmektedir (Wong ve diğerleri, 2008); (Vinay ve Kwon, 2012). TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 serbest bırakıldıktan sonra vasküler endotelial hücreleri ve lökositleri aktive ederek çeşitli adezyon moleküllerinin ekspresyonuna yol açar (Habtemariam, 2013).

Interleukin-10 (IL-10), monositlerden ve diğer aktive edilmiş bağışıklık hücrelerinden salınan başka bir sitokindir. IL-10, TNF- $\alpha$  dahil sitokinlerin üretimini azaltma yeteneğinden dolayı başlangıçta sitokin sentezi inhibitör faktörü olarak adlandırılmıştır (Mocellin, Marincola ve Young, 2005). Bu sitokin bu nedenle immüsupresif olarak kabul edilir ve üretim seviyesi, AIDS gibi hastalıklarda yaygın olan enfeksiyona duyarlılıkla ilişkilidir (Barcellini ve diğerleri, 2000). IL-10 uygulaması, soriasis, Crohn hastalığı, romatoid artrit

ve diğ er birçok kronik enflamatu ar hastalı ktan muzdarip hastalara fayda sağ ladı ğı bilinmektedir (Mocellin, Marincola, Rossi, Nitti ve Lise, 2004).

Monositlerden/makrofajlardan proinflamatu ar sitokinlerin (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6) üretimi ve salınımı, kronik inflamatu ar hastalı kların patogenezinde kritik rol oynamaktadır. Birçok bitkisel ilacın anti-inflamatu ar etkisinin, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve/veya IL-6 salınımının güçlü baskılayıcı etkisine atfedildi ği gösterilmiştir (Habtemariam, 2013).

## 2.11. Mikrobiyom, Probiyotik ve Paraprobiyotikler

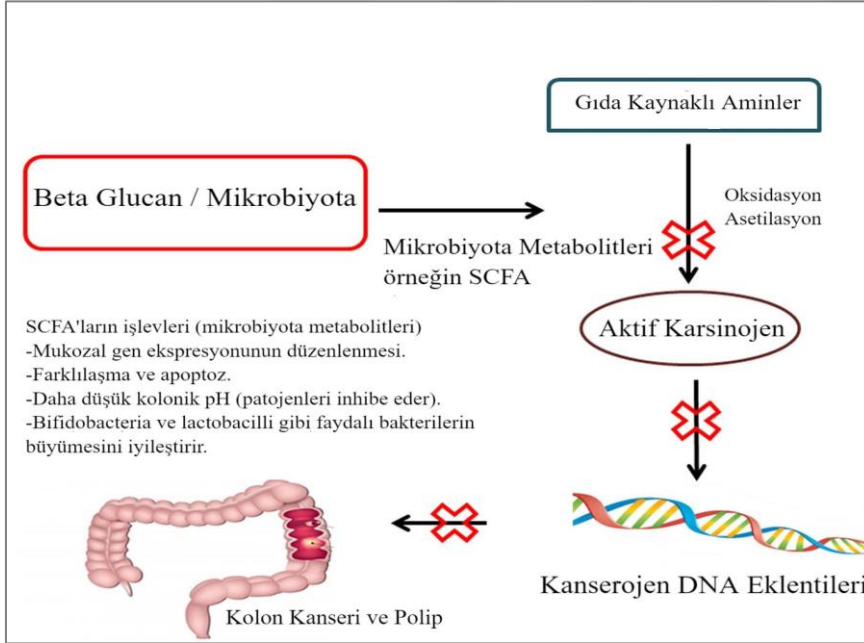
### 2.11.1. Mikrobiyom

İnsanlar da dahil olmak üzere birçok hayvanın ve birçok canlı nın sahip oldu ğu toplam mikroorganizma popülasyonuna mikrobiyota adı verilir. İnsan mikrobiyotasında yaklaşık olarak 100 trilyon mikrobiyal birey vardır. Mikrobiyotalar kişiye spesifiktir ve mikrobiyota çeşitlili ği bireyin yıl, doğ um şek li, diyet biçimi, antibiyotik kullanımı ve çevresel birçok etkene bağlıdır. Mikrobiyom adını verdi ğimiz ekosistem mikrobiyal hareketlilikler sonucunda oluş an metabolitler, genler, enzimler ve buldukları ortam için kullanılan bir kavramdır. İntestinal mikrobiyomumuzda yararlı olan bakteriler bulunmaktadır. Bunlardan en çok bilinen ve içlerinde üzerinde en çok çalış ma yapılan türler arasında *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* vardır. Mikrobiyotayı etkileyen bir diğ er önemli faktör ise prebiyotik ve probiyotik gıda tüketimidir. Fonksiyonel gıdaların en önemli grubu olan probiyotikler yeterli miktarda alındı ğında konakçıya sağ lık yararı sağ layan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır. Probiyotikler sadece *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* gibi bakteri türlerini de ğil aynı zamanda *Saccharomyces* spp. gibi maya türlerini de içerebilir. Normalde zaten mikrobiyotada bulunan bu yararlı bakteri ve mayalar dışarıdan doğ al olarak bunları içeren gıdalarla, gıda takviyeleriyle veya farmasötik şek ilerde alınabilmektedir (Yangılar, 2015).

Son yıllarda yapılan çalış malar sonucunda canlı olmayan mikroorganizmaların ve onların bileş enlerinin de probiyotikler gibi sağ lık üzerinde olumlu etkileri oldu ğu saptanmıştır. Canlı olmayan probiyotiklere "paraprobiyotik" denmektedir. Postbiyotikler ise organizmaların metabolitleri, hücre içermeyen süpernatantlar, fonksiyonel enzimler/proteinler, hücre dışına salgılanan ekzopolisakkarit adını verdi ğimiz EPS'ler, teikoik asitleri içeren bir gruptur. Örne ğin fermente süt ürünlerinde bulunan laktik asit bakterileri (LAB),

laktik asit, bakteriyosin, peptidoglikan gibi birçok postbiyotik olarak değerlendirilecek metabolit salgılamaktadır (Siciliano, Reale, Mazzeo, ve diğerleri, 2021).

Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak tanımlanabilmesi için gereken esas özellik bağırsağa kadar sindirilmeden ulaşabilmesi ve bağırsakta epitel hücrelere tutunma yeteneğine sahip olmasıdır. Probiyotik bakterilerin bağırsağa yapışma özelliğinin (adezyon) patojenlere karşı bir bariyer oluşturması, patojenlerin epitel hücrelere bağlanmasını önemli ölçüde azaltmaktadır (Yeşilova ve diğerleri, 2010). Probiyotiklerin canlı olma zorunluluğu onların bazı gıdalarda kullanımını kısıtlamaktadır. Fakat postbiyotik ve paraprobiyotikler üretimi sırasında ısı işlemi gerektiren ürünlere kolayca eklenebilmeleri, canlılığın yok olması gibi bir kaygı olmadığı için soğuk zincir sistemine gereksinim olmaması, deponma ve taşıma işlemlerinin probiyotiklere kıyasla daha kolay olması gibi avantajları sebebiyle gıdalarda daha sık kullanımı önem kazanmaktadır.



Şekil 2.17. Bağırsak mikrobiyotası yoluyla beta glukanoların kolon kanseri üzerine etkisi (Jayachandran ve diğerleri, 2018)

### 2.11.2. Probiyotik

Probiyotik kelimesi Yunanca bir terim olup “yaşam için” anlamına gelmektedir (Soyuçok, Ekiz ve Kılıç, 2016). Fuller 1989’da probiyotikleri “konak hayvanın yararına olacak şekilde intestinal mikrobiyal dengesini iyileştiren canlı mikrobiyal besin katkısı” olarak ifade

etmiştir (N. T. Williams, 2010). Doğumda steril olan gastrointestinal sistem (GİS) doğumdan 2-10 saat içerisinde bakterilerle kontamine olmaya başlamaktadır. İlk dönemde baskın olan *E. coli*, *Streptococcus* ve fakültatif aerob bakteriler zamanla yerlerini *Bifidobacterium* ile *Bacteroides* gibi zorunlu anaerob bakterilere bırakmaktadır. Doğumdan hemen sonra maternal, vajinal ve intestinal flora başlar. Bir diğer etken diyet ve çevredir. Yetişkin bir insanın GİS'inde *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus* ve *Fusobacterium* türleri baskın olmak üzere 500'ün üzerinde bakteri çeşidi bulunmaktadır. Probiyotikler konağı patojen organizmalara karşı korur ve immün sistemi stimüle ederek etki gösterirler. Probiyotik olarak nitelendirdiğimiz bakteri türleri epitelyal hücrelerin gen ekspresyonunu yöneterek uygun flora oluştururlar. Bu oluşum patojen bakterilerin üremesini engellemektedir. Patojen mikroorganizmaların üremesini inhibe eden bir diğer özellikleri ise probiyotik suşların hidrojen peroksit, asit, bakteriosin gibi maddeler salgılayabilmeleridir. Probiyotiklerin etki mekanizması bu şekilde özetlenebilir; gerçek bir probiyotik tercihen insan kaynaklı, güvenli ve antibiyotiklere ve patojenite veya toksisite faktörlerine direnç aktarabilen vektörlerden arındırılmış olmalıdır. Ek olarak, bir probiyotiğin bağırsak koşullarında (asidik pH, enzimler, safra tuzları, vb.) hayatta kalma kapasitesinin yüksek olması gerekir (Plaza-Diaz, Ruiz-Ojeda, Gil-Campos ve Gil, 2019).

Probiyotikler patojen organizmalara karşı antagonizma sergilemeli, bağışıklık sistemini uyarmalı ve nihayetinde konakçı üzerinde kanıtlanabilir faydalı etkilere sahip olmalıdır. Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak nitelendirilebilmesi için bazı özelliklere sahip olması gerekir. Bunlardan ilki patojen ve toksijenik olmamasıdır. Bir diğeri gastrointestinal sistem boyunca maruz kalacağı düşük pH, safra tuzları, pankreatik enzimlere karşı dirençli olmalarıdır. Laktobasillus cinsi bakterilerin çoğu tarafından asetik asit ve laktik asit üretilir. Bu maddeler bağırsak lümeninde pH'ı azaltarak patojenlerin üremesini engeller ve antibakteriyal etkinlik gözlenir. Probiyotiklerin immün sistem üzerindeki etkilerinden bazıları antikor üretimi ve doğal öldürücü (NK) hücrelerinin aktivitesini arttırmak, nükleer faktör kappa-B (NFkB) yolağını modüle etmek ve T hücre apoptozisini indüklemekten oluşmaktadır (Aziz ve Bonavida, 2016). Probiyotiklerin genellikle interlökin-10 (IL-10) ve transforming growth factor-beta (TGF-beta) gibi intestinal antiinflamatuvar sitokin üretimini arttırdığı görülürken tümör nekrosiz faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ), interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), IL-8 gibi proenflamatuvar sitokin üretimini düşürdükleri gözlenmiştir (Doğan, 2011). Probiyotiklerin etki mekanizmaları Çizelge 2.14'de verilmiştir.

Çizelge 2.14. Probiyotiklerin etki mekanizmaları (Gürsoy ve Kınık, 2006; Özden, 2008; Gönülateş, 2008)

Patojen bakterilerin üremelerine engel olacak inhibe edici maddeler üretirler ve patojenlerin sayılarını azaltırlar.
Antimikrobiyal bileşik üretimleri vardır.
Sindirim sistemini düzenleyen enzimleri üretirler.
Amonyak, amin veya toksik enzimlerin üretimini azaltırlar.
Antikor düzeyinde artışa sebep olarak immün sistemi geliştirirler.
Makrofaj aktivitesini arttırarak immün sistemi güçlendirirler.
Paneth hücreleri ve epitel hücrelerde savunma oluşturulmasında rol alırlar.
Patojen bakterilerle besin rekabeti içerisinde girip onların tüketeceği besinleri de tüketerek sistemde uzun süre durmalarını engellemektedirler.
Bağırsak mukozasının bariyer fonksiyonunu arttırır ve mukus üretimini uyarır.
IL-10, TGF- $\beta$ ve PGE2 ekspresyonunu arttırırken TNF- $\alpha$ ve INF- $\gamma$ ekspresyonunu azaltırlar.
Doğal öldürücü hücrelerin ve T hücrelerinin aktivitesini arttırırlar.

### 2.11.3. Paraprobiyotikler

Probiyotiklerin sağlığa sayısız faydaları olduğu iyi bilinmesine rağmen, bu tür canlı mikroorganizmaların işlevselliği ve pratik kullanımı hakkında endişeler dile getirilmiştir; örneğin, yem veya gıda ürünlerindeki probiyotik türlerin yaşayabilirliği, farklı kolonizasyon modelleri, kalıcılığı ve bağırsaktaki patojenik bir bakteriden bir virülans geninin yatay gen transferi olasılığı gibi. Bu endişeler ve son çalışmalar, canlı olmayan mikroorganizmaların bile, tüketiciler için canlı emsallerine benzer bir şekilde faydalı olabileceğini kanıtlamış ve son zamanlarda “paraprobiyotikler” olarak adlandırılan canlı olmayan probiyotik preparatların kullanımını hızlandırmıştır. Canlı olmayan mikroorganizmaların kullanılmasının ardındaki fikir, canlı mikroorganizmaların uygulanmasıyla ilgili birçok dezavantajı ortadan kaldırmaktır. Örneğin, probiyotik mikroorganizmaların canlılığı için belirli saklama gereksinimleri esastır çünkü birçok probiyotik mikroorganizmanın istenen canlılığı saklama sırasında kaybolabilir. Probiyotik destekli yem preparatlarında canlı ve cansız mikroorganizmaların nispi oranı değişebilir ve ölü hücrelerin popülasyonu canlı hücrelerden bile daha büyük olabilir. Canlı mikroorganizma hücrelerinin alınmasına ilişkin süregelen güvenlik endişeleri artmaktadır ve bu endişeler, raf ömrü sorunlarını büyük ölçüde azaltabilecekleri ve mikrobiyal translokasyon risklerini ortadan kaldıracabilecekleri için canlı olmayan mikroorganizmaların veya mikrobiyal hücre özlerinin kullanımına olan ilgiyi yoğunlaştırmıştır (Taverniti ve Guglielmetti, 2011). Bu konular, paraprobiyotik uygulama gibi alternatif yaklaşımları keşfetme ihtiyacını vurgulamaktadır. Güncel çalışmalar, inaktive

edilmiş probiyotik mikroorganizmaların sağlık açısından da fayda sağlayabileceğini göstermektedir. Kurutulmuş veya parçalanmış maya probiyotik hücreleri probiyotik aktivite gösterebilir ve faydalı bir etki yaratabilir. Bu ürünler esas olarak  $\beta$ -(1,3)-D-glukanlar,  $\beta$ -(1,6)-glukanlar, kitin ve mannoproteinler, teikoik ve lipoteikoik asitler, hücre homojenatları, S-katman proteinleri, pili proteinleri, moonlighting proteinleri ve LPTXTG proteinleri gibi hücre yüzey proteinleri, peptidoglikanlar, lipopolisakkaritler ve benzeri hücre duvarı parçalarından oluşmaktadır (Akter, Park ve Jung, 2020).

ParaprobİYotiklerin takviye olarak geliştirilmesi ve yiyecek ve içeceklerde uygulanması, probiyotiklerin zarar gördüğü ve işleme ve/veya raf ömrü sırasında canlı olmadığı belirli durumlara önemli bir alternatif oluşturmaktadır. Bu nedenle, paraprobİYotikler, probiyotiklerin eklenmesinin teknolojik bir zorluk olduğu uygulamalarda kullanılma potansiyeli olabilecektir. Gerçekten de paraprobİYotik ürünler, canlı probiyotik ürünlere göre daha güvenli ve daha kararlı ürünlerin üretilmesine izin vermektedir. ParaprobİYotiklerin artan popülaritesi nedeniyle gıda, ilaç, takviye ve yemlerde yaygın olarak kullanılabilir (Taverniti ve Guglielmetti, 2011).

Çoğu durumda, paraprobİYotiklerin mekanizmaları ve sağlık etkileri, sitokin ekspresyonunun uyarılması ve hücre sinyal sisteminin aktivasyonu açısından probiyotikler tarafından uygulananlara çok benzer, bu da hücre inaktivasyonundan kaynaklanan canlılık kaybının faydalı fonksiyonları engellemediğini göstermektedir. Proinflamatuvar sitokinlerin (IL-8, TNF- $\alpha$ ) ekspresyonundaki azalma ve anti-inflamatuvar sitokinlerin (IL-10) artan sentezi, anti-inflamatuvar hastalıklar üzerindeki faydalı etkilerle ilişkili anahtar bir mekanizmadır. IL-12 ve IFN- $\gamma$  ekspresyonunun artmasını ve IL-4 ve IL-13 ekspresyonunun azalmasını içeren Th1/Th2 hücre farklılaşmasındaki bir değişim, Th1 hücre popülasyonunun artırılması, alerjiler ve atopik dermatit tedavisi üzerindeki olumlu etkilerin temelidir. ParaprobİYotiklerin alkolün neden olduğu ishal, kolit, solunum, bağırsak ve karaciğer hastalıkları, iltihaplanma ve alerjiler dahil olmak üzere çeşitli patolojilerin profilaksisinde ve tedavisinde yararlı etkilerine dair kanıtlar, fare modellerinde ve insan klinik deneylerinde *in vivo* çalışmalarla desteklenmiştir. Probiyotikler özellikle bu denekler için güvenlik riskleri oluşturabileceğinden, yaşlılar gibi hassas kişilerde paraprobİYotik uygulamasının etkisini araştırmak için özel bir çaba gösterilmiştir. Yaşlılar enfeksiyonlara ve yaşa bağlı inflamatuvar hastalıklara karşı daha duyarlı olabilir ve hem doğuştan (nötrofiller, monositler, dendritik ve doğal öldürücü hücrelerde kantitatif ve fonksiyonel değişiklikler, hem de TLR'lerin ve

sitokinlerin değişmiş ekspresyonu dahil) ve adaptif bağışıklık sisteminde işlev bozuklukları sergileyebilir. Hem gvenelik hem de denekler tarafından kolayca tüketimebilecek yeni fonksiyonel gıdaların üretilmesi açısından sunabilecekleri avantajlar nedeniyle özellikle yaşlılar için büyük önem taşıdığı bildirilmiştir. Ayrıca paraprobiyotiklerin potansiyel anksiyolitik ve antidepresan etkileri olduğu da rapor edilmiştir. Nitekim anksiyete, stres ve depresyon yaşlılarda sıklıkla karşılaşılmakta ve onların iyilik hali için ek risk faktörleri oluşturmaktadır. Bu çerçevede, paraprobiyotiklerin anksiyete, stres ve depresyon semptomlarını hafifletmek için doğal bir yardımcı olarak kullanma olasılığı, ilaca bağlı yan etkilere daha duyarlı oldukları için özellikle yaşlılar için önemli olabileceği vurgulanmıştır (Siciliano, Reale, Mazzeo, ve diğerleri, 2021).

Bağırsakta kalıcı veya en azından geçici kolonizasyon, konakçı ile yakın ve uzun süreli bir etkileşim, bağışıklık fonksiyonu modülasyonu ve patojen dışlama gibi yararlı etkileri gerçekleştirmelerine izin verdiğinden, probiyotiklerin arzu edilen bir özelliğidir.  $\beta$ -D-glukanlar ayrıca bağırsak mukozasına patojen yapışmasına karşıt olabilir ve/veya probiyotikleri bağırsaktaki düşmanca ortamdan korumak için antioksidanlar olarak işlev görebilmektedirler (Russo ve diğerleri, 2012).

Probiyotikler, prebiyotikler ve sinbiyotikler, fonksiyonel gıdaların detaylandırılması için sıklıkla kullanılan bileşenlerdir. şu anda, ticarileştirilmiş probiyotiklerin çoğu ekzopolisakkarit (EPS) üreten *Bifidobacteria*, *Lactobacillus* ve *Streptococcus* cinsinin birkaç suşu ile sınırlıdır. Probiyotikler, prebiyotikler ve sinbiyotikler (pro- ve prebiyotiklerin karışımı), günümüzde fonksiyonel gıdaların hazırlanmasında kullanılan en yaygın bileşenlerdir. Probiyotikler, aktif durumda bağırsağa ulaşabilen ve dolayısıyla sağlık üzerinde olumlu etkiler gösteren canlı mikroorganizmalardır. Bir prebiyotik, gastrointestinal mikrobiyotanın bileşiminde ve/veya aktivitesinde spesifik değişiklikleri teşvik eden seçici olarak fermente edilmiş bir bileşendir ve bu da konak sağlığı ve sağlığı üzerinde faydalar sağlar (De Vrese ve Schrezenmeir, 2008).

Fonksiyonel gıdalar; temel beslenmenin ötesinde vücut için faydaları olan, belirli hastalıkların önlenmesinde ve hastalığa yakalanma riskinin azaltılmasında rol oynayan gıdalar olarak tanımlanmaktadır. Bir fonksiyonel besinden beklenen özelliklerden başlıcaları şu şekilde özetlenebilir: bireyin beslenmesine olumlu yönde katkıda bulunmalı, besleyici ve sağlığı olumlu yönde etkileyici özelliklere sahip olmalı, günlük uygun alım miktarı

belirlenmiş olmalı, güvenilir olduğu kanıtlanmış olmalı, besin işlenerek fonksiyonellik kazanmışsa bu işlemler sırasında besleyici özelliğinden bir şey kaybetmemiş olmalıdır. Gıdaların vitamin, mineral, yağ asidi, antioksidanlar gibi yönlerden zenginleştirilmesi ve içeriğinin güçlendirilmesi fonksiyonel gıdaların temel yöntemidir. Probiyotikler, prebiyotikler, omega-3, vitaminler ve mineraller, beta-glukan, beta keratin, lökopen gibi içerikler fonksiyonel gıdalarda kullanılan önemli içeriklerden bazılarıdır. Düzenli fonksiyonel besin tüketiminin kanser ve kardiyovasküler rahatsızlıklardan korunma ve tedavisinde etkili olduğu; gastrointestinal sistemin sağlığının korunması, menopoz semptomlarının hafifletilmesi, göz sağlığının korunması gibi çeşitli birçok alanda da etkili olduğu görülmüştür (Coşkun, 2005).

## 2.12. Probiyotik Bir Maya: *Pichia kudriavzevii*

*Pichia kudriavzevii* ilk olarak, Kudryavtsev (1960) tarafından *Issatchenkia orientalis* olarak tanımlanmıştır. *Pichia kudriavzevii* probiyotik bir maya suşudur ve *Candida krusei*'nin teleomorfudur. Teleomorf, organizmanın üreme aşamasıdır. *Pichia kudriavzevii*, haploid hücrelerin füzyonu aracılığıyla çoğalır. Diğer birçok maya hücresi gibi *Pichia kudriavzevii* hücresi de sitoplazma, çekirdek, hücre zarı, hücre duvarı, mitokondri ve kofuldan oluşmaktadır. Hücrelerin şekli, uzatmak için oval veta elipsoidaldir. Gıda kaynağı olarak glukoz, sakkaroz, galaktoz, fruktoz ve mannoz kullanabilmektedir (Cletus Kurtzman vd., 2011).

*Pichia kudriavzevii* mayasının taksonomik hiyerarşisi Çizelge 2.15’de verilmiştir.

Çizelge 2.15. *Pichia kudriavzevii* mayasının taksonomik hiyerarşisi (Kurtzman, 2008)

Alem	Eukaryota
Şube	Ascomycota
Sınıf	Saccharomycetes
Familya	Saccharomycetales
Ordo	Pichiaceae
Cins	<i>Pichia</i>
Tür	<i>Pichia kudriavzevii</i>

Çevrede özellikle toprakta, meyve ve sebzelerin dış yüzeylerinde ve fermente içeceklerde bol miktarda bulunur. 45°C'ye kadar yüksek sıcaklıklarda ve düşük pH değerlerinde

metabolik olarak aktif olabilir. Biyoyakıt endüstrisi için çok önemli olan etanolü yüksek verimde üretir. Birçok maya gibi şarap ve bira fermentasyonunda da yer alır ancak kakao çekirdeği fermentasyonunda çok değerlidir. Yalnızca immün yetmezliği olan hastalarda patojenite gösterdiği belgelenmiştir. Bu sebeple "fırsatçı patojen" olarak adlandırılır. *P. kudriavzevii* mayasına özgü bir şey, fitazdan fitik asidi hidroliz etme yeteneğine sahip olmasıdır. Fitik asit çoğu memeli tarafından sindirilemeyen bir asittir. Bu özelliği *P. kudriavzevii*'ye özellikle insan gıdalarında olmak üzere gıda endüstrisinde geniş bir kullanım alanı sunmaktadır.

Yapılan bir araştırmada biyoetanol üretimi için termotolerant bir maya olan *P. kudriavzevii* mayaların genellikle yaşayamacağı bir sıcaklık olan 42°C'de iyi derece büyüme gerçekleştirdiği gözlenmiştir. *P. kudriavzevii*, glukozdan yüksek miktarda etanol üretmiş ve asetik asit, furfural, formik asit, hidrojen peroksit ve etanol gibi streslere karşı güçlü tolerans göstermiştir. Bu çoklu stres toleransı özelliği *P. kudriavzevii*'ye özgüdür ve onun endüstriyel uygulamalar için çok ideal bir aday yapmaktadır (Oberoi ve diğerleri, 2012).

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan ve paraprobiyotik özellikleri belirlenen  $\beta$ -glukanın kaynağı olan *Pichia kudriavzevii* M16 maya suşu ve test bakterileri Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir (Çizelge 3.1).  $\beta$ -glukanın sitotoksitesinin belirlenmesi için yapılan MTT, adezyon, sitokin seviyeleri gibi hücresel deneylerde ise GİS epitel hücrelerine bir model olarak kullanılan insan kolorektal adenokarsinoma hücre hattı HT-29 (ATCC® HTB-38™) ve L929 sağlıklı fare fibroblast hücre hattı Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilerek kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar ve kullanım amaçları

Mikroorganizma	Kullanım Amacı
<i>Pichia kudriavzevii</i> M16	Hücre duvarından $\beta$ -glukan ekstraksiyonu
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	CM $\beta$ -gluM16'nın antimikrobiyal ve antibiyofilm özelliklerinin belirlenmesi
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	
<i>Lactobacillus plantarum</i> LP1	CM $\beta$ -gluM16'nın adezyon yeteneklerinin belirlenmesi

#### 3.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalışma süresince Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda bulunan cihazlar kullanılmıştır. Bunlar: Manyetik Karıştırıcı (Velp), Soğutmalı Santrifüj (Sigma 2-16KC), -80 ve -30°C Derin Dondurucu (Sanyo), Otoklav (Tomy-Sx 700E), Hassas Terazî (0,1-10 Mg), Çeker Ocak (Vortice), Santrifüj (Nüve), Mini Santrifüj (Selecta), Etüv (Raypa/Incuberm/Dıgıt), CO<sub>2</sub>'li etüv (Sanyo), Evaporatör (Heidolph), Su Banyosu (GFL), Vorteks (Dragonlab), pH Metre (Jenco 6173), Spektrofotometre (Digilab Hitachi U-1800), Buzdolabı (Beko), Işık Mikroskobu (Leica), Distile Su Cihazı (Mes/MES06), Otomatik Pipetler (Ependorf), McFarland Densitometre (Biosan Den-1), Liyofilizatör (Christ Alpha 2-4 LD plus), Mikroplaka Okuyucu (Epoch, BioTek) ve Inverted Mikroskop (Leica)'tur.

### 3.1.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve tampon

Araştırma süresince kullanılan *Pichia kudriavzevii* maya suşu Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) besiyerinde geliştirilmiştir. *Lactobacillus plantarum* LP1 kültürünün geliştirilmesinde De Man Rogosa and Sharp Broth (MRS, Merck) ve antibiyofilm ve antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan *E. coli* ATCC 11229, *S. aureus* ATCC 25923 ve *P. aeruginosa* ATCC 29212 patojen kültürlerin gelişiminde Nutrient Broth besiyeri kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Her bir besiyeri için çizelgede belirtilen maddeler verilen oranlarda tartılıp bir miktar distile su ile manyetik karıştırıcı karıştırılmış ardından uygun pH değerlerine ayarlanmıştır. Hazırlanan besiyerleri otoklavda 121°C’de 15 dk steril edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. Katı besiyeri hazırlamak içinse sıvı besiyerleri içerisine 15 g/L olacak şekilde Agar-agar (Merck) ilave edilip aynı şekilde otoklavda sterilizasyon sağlanmıştır. Agar besiyeri otoklavdan çıktıktan sonra uygun oda koşullarında ılımaya bırakılmış daha sonra uygun petri kaplarına aktarılarak 37°C’lik etüve kaldırılmıştır. 1 gece etüvde kalan agarlar kontrol edilip kontaminasyon olup olmadığına emin olduktan sonra +4°C’de saklanmıştır.

HT-29, bir insan kolorektal adenokarsinom hücre dizisidir. Bu hücre dizisi, kolorektal adenokarsinomlu 44 yaşındaki beyaz bir kadının primer tümöründen 1964 yılında Fogh ve Trempe (1975) tarafından izole edilmiştir. HT-29 hücre hattı, kolorektal kanser için bir ksenograft tümör modeli olmasının yanı sıra, bağırsak hücreleri tarafından absorpsiyon, taşıma ve salgılamayı incelemek için bir *in vitro* model olarak da kullanılmaktadır. HT-29 ve L929 hücre hatlarının gelişiminde kullanılan besiyeri Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri

Besiyeri/Tampon	İçerik/L
MRS; De Man, Rogosa and Sharpe (Merck)	10 g Pepton 10 g Et ekstraktı 5 g Maya ekstraktı 20 g Glukoz 2 g Dipotasyum Sülfat 1 mL Tween 80 2 g Diamonyum sitrat 5 g Sodyum asetat 0,2 Magnezyum sülfat 0,05 g Manganez Sülfat pH 5,7 ± 0,2
YPD	10 g Maya ekstraktı 20 g Pepton 20 g D-Glukoz pH 6,5± 0,2
Nutrient Sıvı Besiyeri (Merck)	10 g Pepton 10 g Et ekstraktı 5 g Sodyum Klorür pH 6,8± 0,2
Hücre hatlarının gelişiminde kullanılan besiyeri	%89 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) %10 Fetal Bovin Serum (FBS) %1 Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin (PSA) %1 L-Glutamin %40 MCDB-201
PBS Tamponu	8 g Sodyum Klorür 0,2 g Potasyum Klorür 1,44 g Disodyum Fosfat 0,24 g Potasyum Dihidrojen Fosfat pH 7,4

### 3.2. Metot

#### 3.2.1. Kültürlerin muhafazası

Maya ve bakteriler uygun besi ortamlarında iki kez aktifleştirilmiş ve bakteriler Gram boyama tekniği ile ve maya basit boyama tekniği ile boyanarak kontaminasyon kontrolü yapılmıştır. Maya ve bakterilerin kültür stokları gliserol ve uygun besiyeri içinde -80°C'lik derin dondurucu içerisinde muhafaza edilmiştir.

#### Gliserol ile muhafaza tekniği

2 mL'lik kriyo tüpler içerisine 1 mL gliserol (Merck) konularak otoklavda 121°C'de 15 dk sterilizasyon sağlandıktan sonra septik koşullarda kriyotüpler içerisine 1 mL iki kez

akifleştirilmiş ve kontaminasyon olmadığına emin olunan maya/bakteri ilave edilmiş ardından vortekslenerek  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de kullanıma hazır halde saklanmıştır.

### 3.2.2. *Pichia kudriavzevii* M16 maya suşunun hücre duvarından $\beta$ -glukan ( $\beta$ -gluM16) eldesi

*P. kudriavzevii* M16 maya suşunun hücre duvarından beta glukan ( $\beta$ -gluM16) ekstraksiyonu Magnani vd (2009)'un ve Liu vd. (2008) metodlarında bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir (Magnani ve diğerleri, 2009); (Liu, Wang, Cui ve Liu, 2008) *P. kudriavzevii* mayası YPD besiyerinde aktifleştirildikten sonra 2 litre'lik YPD besiyerine %2 oranında inoküle edilerek geliştirilmiştir. İnkübasyondan sonra aktif kültürler santrifüjlenmiş, süpernatant atılmış ve pellet toplanmıştır. Hazırlanan hücre süspansiyonu Çizelge 3.3'te verilen ekstraksiyon işlemlerine tabi tutulmuştur.

Çizelge 3.3.  $\beta$ -gluM16 ekstraksiyon basamakları

1. Otoliz
Elde edilen maya pelletine, 20 mL steril %3'lük NaCl çözeltisinden ilave edilerek 200 rpm, $55^{\circ}\text{C}$ , 24 saat çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Çalkalamalı etüvde inkübasyon süresi sona eren örnek 4000 rpm'de 15 dk. santrifüjlenerek süpernatant atılmıştır (Otolizat). Örnek $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat bekletilmiştir.
2. Sıcak su banyosu
Otolizatın $80^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika sıcak su banyosunda bekletilmesinin ardından 4000 rpm'de 15 dk. santrifüjlenerek süpernatant atılmıştır. Otolize maya hücreleri bir sonraki adıma hazır halde $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.
3. Otoklav
Otolizata 20 mL 0,02 M sodyum fosfat tamponu (pH 7,5) ve 8 g cam boncuk ilave edilmiş ve $121^{\circ}\text{C}$ 'de 4 saat otoklavlanmıştır. Ardından 4000 rpm'de 15 dk. santrifüjlenerek süpernatant atılmıştır. Otolize maya hücreleri bir sonraki adıma hazır halde $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.
4. Sonikasyon
Örnek 20 kHz'de buz banyosu içerisinde sonike edilmiştir. Ardından 4000 rpm'de 15 dk. santrifüjlenerek süpernatant atılmış ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.
5. Organik çözücü muamalesi
Sonikasyondan sonra lipidlerin uzaklaştırılması amacıyla örnek izopropanol (2-propanol) (Sigma) ile 2 saat reflux cihazında muamele edilmiştir. Bunun için numune, filtre kâğıdı ile sarılmış ve uygun bir biçimde konumlandırılmıştır. Kalan tortu tartılarak ağırlığıyla orantılı bir şekilde (1:1) asetonla 2 kez, distile su ile 1 kez yıkanarak ardından santrifüjlenip $4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafazaya alınmıştır.
6. Proteaz enzim muamalesi ve liyofilizasyon
Örnekten proteinleri arındırmak için, örneğe 0,4 U proteaz enzimi (Sigma) ve 10 mL distile su ilave edilerek $55^{\circ}\text{C}$ 'de 5 saat enzim aktivasyonu sağlanmıştır. Ardından örnek $80^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika sıcak su banyosunda bekletilerek enzim inaktivasyonu sağlanmıştır. Ardından santrifüjlenmiş ve pellet 5 mL distile suda çözülürülerek penisilin şişelerine paylaştırılmış ve en az 1 gece $-80^{\circ}\text{C}$ 'de beklettikten sonra liyofilizasyon (Christ alpha 2- 4 LD Plus freze) aşamasına geçilmiştir.

### 3.2.3. $\beta$ -gluM16'nin karboksimetilasyonu

$\beta$ -gluM16'nin çözünürlüğünü artırmak için kimyasal bir modifikasyon yöntemi olan karboksimetilasyon uygulanmıştır (Resim 4.4).

- 90 mg  $\beta$ -gluM16 tartılarak üzerine 5,4 mL 2-propanol (Sigma) eklenmiş, elde edilen karışım 15-30 dakika karıştırıcıda bırakılmıştır.
- Karıştırma işlemi devam ederken öncesinde hazırlanmış 10 mL %30'luk NaOH çözeltisi yavaş yavaş eklenmiştir.
- Karıştırıcının ısısı 50°C'ye ayarlanarak bu şekilde 15-30 dakika daha karıştırma işlemi sürdürülmüştür.
- 1,1 g monokloroasetik asit (MCA) (Carlo Erba) 2-3 mL distile suda çözülerek karışıma eklenmiştir.
- Çözelti bu şekilde 8 saat 50°C'de bırakılmıştır.
- Karışım oda sıcaklığında soğutularak ardından 0,5 M HCl (Merck) çözeltisi ile pH 7'ye ulaşana dek karışıma ilave edilmiştir.
- Daha sonra 1:1 oranda %96'luk alkol (Teksol) ile nötralize edilerek filtreleme işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Elde edilen bu karışım evaporatör cihazı kullanılarak alkolünden arındırılmıştır.
- Son aşama olarak evapore edilen örnek uygun miktar distile suda çözülerek liyofilize edilmiştir (Yongjiang Wang ve diğerleri, 2012) ; (Francini Y. Kagimura ve diğerleri, 2015a)

### 3.2.4. CM $\beta$ -gluM16'nin karakterizasyonu

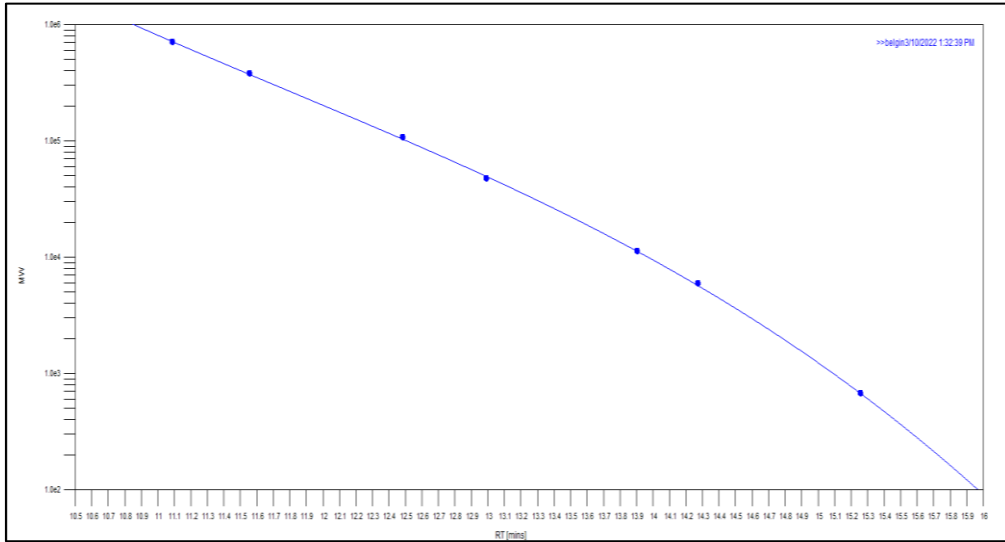
#### Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)

Bir tür titreşim spektroskopisidir. FT-IR matematiksel Fourier dönüşümü yöntemi ile ışığın infrared yoğunluğuna karşı dalga sayısını ölçen bir kimyasal analitik yöntemidir. Bu yöntemin temeli, molekül içi bağlar üzerine düşürülen kızılötesi ışınların, bağların titreşim ve dönme hareketleri ile soğurulmasına dayanmaktadır. Ancak bu olay sadece dipol momente sahip polar moleküllerde gözlenmektedir (Movasaghi, Rehman ve Rehman, 2008). Çalışmamızda, FT-IR analizi ile fonksiyonel grupların belirlenmesi amaçlanmıştır. FT-IR analizi Bruker Vertex 70 V ile yapılmıştır. Analizler 400-4000 cm<sup>-1</sup> dalgaboyu aralığında ve

4  $\text{cm}^{-1}$  çözünürlükte ATR tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Her bir spektrum, 4  $\text{cm}^{-1}$ 'lik çözünürlükle elde edilen 32 adet taramanın birleştirilmesi ile oluşmuştur. Analiz, Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

### Boyut dışlama kromatografisi (Size Exclusion Chromatography, SEC)

En yaygın uygulanan kromatografik yöntem olup voltametrik gibi saptama teknikleriyle birlikte kullanılmaktadır. Çalışmada, CM $\beta$ -gluM16'nın moleküler ağırlığının belirlenmesi amacıyla (Kang ve diğerleri, 2015) tarafından belirlenen metot kullanılmıştır. Analizde kırılma indisi dedektörü (Refraktif İndeks Dedektör, RID) kullanılmış, mobil faz olarak ultra saf su PL aquajel OH mixed kolonunda (8  $\mu\text{m}$ ) 0,6 mL/dk akışında kullanılmış ve 20  $\mu\text{L}$  örnek enjeksiyonu yapılmıştır. Örnek solventi olarak didistile su kullanılmıştır. Standart oluşturulmasında polisakkarit kalibrasyon kiti kullanılmıştır. 66, 5900, 11100, 47100, 107000, 375000 ve 708000 Da Mp değerlerine sahip farklı dekstran standartları kullanılarak oluşturulan standart Şekil 3.5'te verilmiştir. Analiz, Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (UNAM)'nde hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Dekstran standartları ile çizilen kalibrasyon grafiği

### **3.2.5. CM $\beta$ -gluM16'nın antioksidan aktivitesi**

CM $\beta$ -gluM16'nın antioksidan aktivitesinin belirlenebilmesinde üç farklı metot kullanılmıştır.

- a) 2,2-difenil-1-pikrilhidraz (DPPH) radikal süpürücü aktivitesi (Fan, Li, Deng ve Ai, 2012) metodunda modifikasyon yapılarak,
- b) Süperoksit anyonu süpürücü aktivitesi (Lei ve diğerleri, 2015) metodunda modifikasyon yapılarak,
- c) Hidroksil radikali süpürücü aktivitesi (Lei ve diğerleri, 2015) metodunda modifikasyon yapılarak çalışılmıştır.

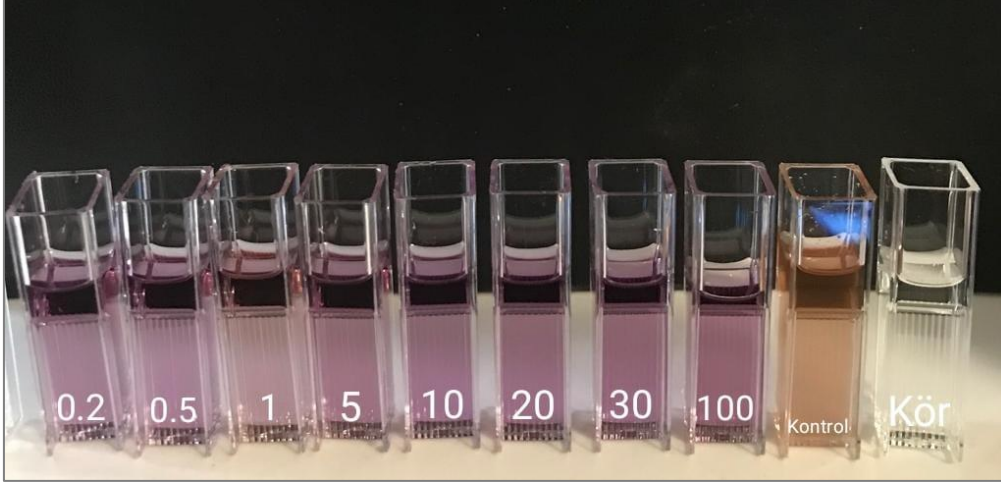
### 2,2-difenil-1-pikrilhidraz (DPPH) radikal süpürücü aktivitesi

CM $\beta$ -gluM16'nın radikal süpürücü aktivitesi 1,1-difenil-2-pikrilhidraz (DPPH) yöntemi ile belirlenmiştir (Fan ve diğerleri, 2012).

- 5 g CM $\beta$ -gluM16, 10 mL su içerisinde (500 mg/mL) çözündürülmüştür. Ana stoktan son derişim 0,2-0,5-1-5-10-20-30-100 mg/mL olacak şekilde farklı derişimleri hazırlanmıştır.
- 0,4 mg DPPH (Sigma) 10 mL DMSO'ya (Merck) eklenerek tüp folyo ile kaplanmıştır.
- Çözelti 1 dk 20 kHz'de sonike edilmiştir.
- Her bir cam tüpe 1 mL DMSO eklenmiştir.
- Son derişimleri 0,2, 0,5, 1, 5, 10, 20, 30, 100 mg/mL olacak şekilde CM $\beta$ -gluM16 ilave edilmiştir.
- Örneklerin her birinin üzerine hazırlanmış olduğumuz DPPH+DMSO çözeltisinden 1 mL ilave edilerek tüpler ışık görmemesi için folyolanmış ve vortekslenmiştir.
- Vortekslendikten sonra 20°C, 40 dk sıcak su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonunda örnekler 517 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır (Resim 3.1).

CM $\beta$ -gluM16'nın DPPH radikalini süpürücü aktivitesi % cinsinden aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

$$\% \text{ Süpürücü Aktivite} = [1 - (A_{\text{örnek}} - A_{\text{kör}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100 \quad (3.1)$$



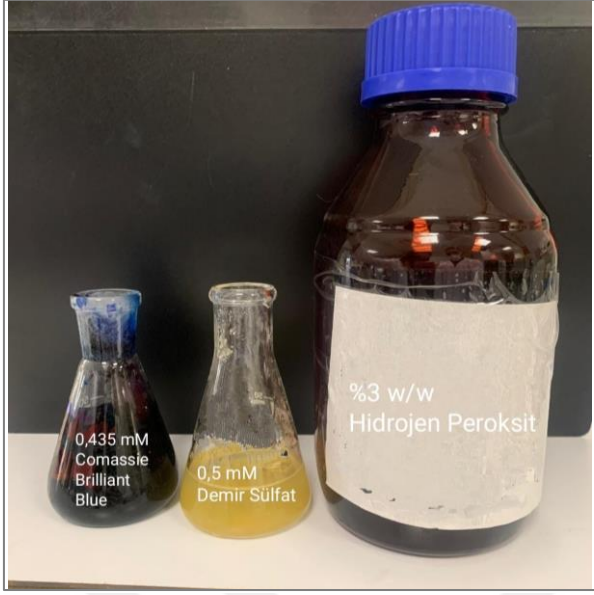
Resim 3.1. Farklı derişimlerde (mg/mL) CMβ-gluM16'nın DPPH süpürücü aktivitesi

### Hidroksil radikali süpürücü aktivitesinin belirlenmesi

1 mL PBS ile süspanse edilen son derişimi 0,2, 0,5, 1, 5, 10, 20, 30, 100 mg/mL olan CMβ-gluM16'nın üzerine 1 mL 0,435 mM comassie brilliant blue (Sigma), 2 mL 0,5 mM FeSO<sub>4</sub> (Merck), 1,5 mL %3 w/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma) ilave edilmiş ve 37°C de 1 saat inkübe edilmiştir. Örnekler 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj (Nüve) edilerek 624 nm de absorbansları ölçülmüştür (Lei ve diğerleri, 2015). Deneyde kullanılan kimyasallar Resim 3.2'de verilmiştir.

Hidroksil radikalinin % giderimi aşağıdaki denklemlle hesaplanmıştır;

$$\% \text{ Hidroksil Radikali Süpürücü Aktivite} = [(A_0 - A_1) / (A - A_1)] \times 100 \quad (3.2)$$



Resim 3.2. Kullanılan kimyasallar

### Süperoksit anyonu süpürücü aktivitesi

- 0,2, 0,5, 1, 5, 10, 20, 30, 100 mg/mL derişimlerinde hazırlanan CM $\beta$ -gluM16 örnekleri ependorflara aktarılmıştır.
- Her bir derişimden 1 mL örnek spektrofotometre küvetlerine alınmış ve ardından 3 mM 0,2 mL pyragallol (Sigma) çözeltisi eklenmiştir.
- Karışımın absorbans değeri 325 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Epoch, BioTech) ölçülmüş ve yüzde süperoksit anyonu radikalini süpürücü aktivitesine göre tespit edilmiştir (Huang ve diğerleri, 2013).

$$\% \text{ Süperoksit anyonu radikalinin süpürücü aktivitesi} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100 \quad (3.3)$$

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

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

### **3.2.6. CM $\beta$ -gluM16'nın antibiyofilm aktivitesinin belirlenmesi**

Antibiyofilm aktivitesinin belirlenmesinde test bakterileri olarak biyofilm yapma yeteneği daha önceki çalışmalar ile (Sarıkaya, Aslim ve Yüksekdağ, 2017); (Bikric ve diğerleri, 2022b).belirlenen biyofilm yapma yeteneğine sahip *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212

kullanılmıştır. Bu çalışmada CM $\beta$ -glukanın antibiyofilm aktiviteleri (Sandasi, Leonard ve Viljoen, 2010) ve (Chaieb, Kouidhi, Jrah, Mahdouani ve Bakhrouf, 2011) yöntemleri modifiye edilerek tespit edilmiştir.

CM $\beta$ -gluM16 son derişim 0,2, 0,5, 1, 5, 10, 20, 30 ve 100 mg/mL olacak şekilde 96 kuyulu plaklara 20  $\mu$ L aktarılmıştır. Bunların üzerlerine, optik yoğunlukları McFarland 0,5'e ayarlanan patojen bakteri kültürlerinden 180  $\mu$ L ilave edilmiştir. Örnekler, 24 saat statik bir ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Biyofilm oluşumunu hesaplayabilmek için, kuyulardaki planktonik hücre fraksiyonu yeni bir plak içerisine aktarılıp, mikropkala okuyucuda 570 nm'de ölçüm yapılmıştır.

Antibiyofilm inhibisyonunun yüzde oranını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\% \text{Biyofilm İnhibisyonu} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100 \quad (3.4)$$

### 3.2.7. CM $\beta$ -gluM16'nın antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi

CM $\beta$ -glukanın patojen bakterilere karşı (*Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212) antimikrobiyal aktiviteleri kuyu difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir (Reinheimer, Demkow ve Candiotti, 1990).

Test bakterileri Nutrient sıvı besi ortamında aktifleştirilerek McFarland 0,5'e ayarlanmış ve steril petri kabı üzerine 100  $\mu$ L aktarılmıştır. Bu işlemten sonra, daha önceden hazırlanıp 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiş ve yaklaşık olarak 50°C'ye kadar soğutulmuş olan Nutrient katı besiyerinden her petri kabına 20 mL ilave edilip, besi ortamı ve petri kabı zeminine inoküle edilen test bakterilerinin homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. Homojenlik sağlandıktan sonra petri kabı içerisindeki Nutrient katı besiyerinin donması için 2 saat buzdolabında bekletilmiştir. Donan katı besiyeri üzerinde 7 mm çapındaki steril çubukla kuyular açılarak kuyuların tabanları steril agarla tekrar sıvanmıştır. Daha sonra plaklarda açılan kuyulara; *P. kudriavzevii* M16 suşuna ait, maya süspansiyonlarından (probiyotik) 200  $\mu$ L, kültür filtratından (postbiyotik) 200  $\mu$ L, farklı derişimlerde CM $\beta$ -gluM16' dan (parabiyotik) 200  $\mu$ L ayrı ayrı ilave edilerek 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

### 3.2.8. Sitotoksosite

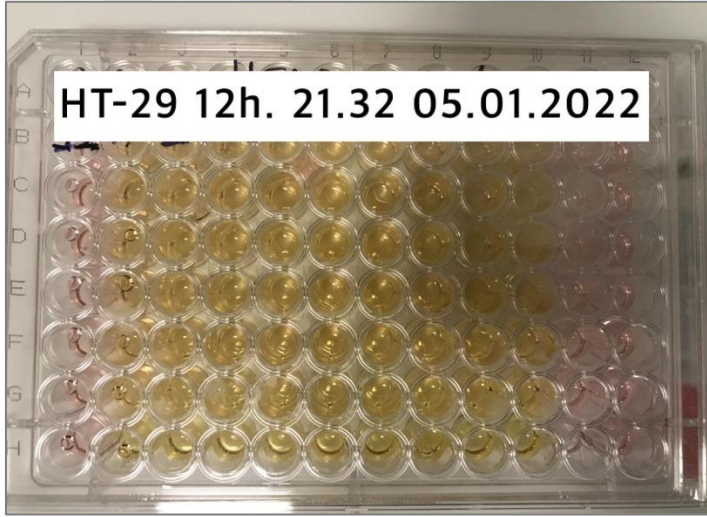
Çalışmada CMβ-gluM16'nın sitotoksitesisi, oldukça yaygın ve hücre proliferasyonu, canlılığı ve sitotoksitate ölçümü için kullanılan, kantitatif kolorometrik bir yöntem olan MTT (3-(4,5-Dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) ile belirlenmiştir. MTT yönteminin temeli, canlı hücrelerin tetrazolium tuzu olan MTT kimyasalını formazan kristallerine dönüştürmesine dayanmaktadır. MTT, canlı hücrelerin mitokondrilerinde mitokondriyal dehidrojenaz enzimleri sayesinde MTT tuzunu parçalar ve formazan kristallere dönüştürür. Oluşan bu formazan kristalleri dimetilsülfoksit (DMSO) veya izopropanol (2-propanol) kullanılarak çözüldüğünde ortaya mor renkli bir çözelti çıkar ve spektrofotometrik ölçüm yapılır. MTT sadece canlı olan hücrelerin mitokondrisinde bulunan enzimler sayesinde parçalanabileceği için elde edilen absorbans değerleri doğrultusunda canlılık oranı hesabı yapılmaktadır (Freimoser, Jakob, Aebi ve Tuor, 1999)

CMβ-gluM16'nın sitotoksitesisinin belirlenmesinde HT-29 insan kolorektal adenokarsinom ve L929 fibroblast hücre hatları kullanılmıştır. Çalışmada *Pichia kudriavzevii* M16 probiyotik maya suşunun hücre duvarından ekstrakte edilen ve çözünürlüğünü arttırmak için karboksimetilasyon kimyasal işlemi uygulanan polisakkarit yapılı beta-glukan (CMβ-gluM16 adlı biyopolimer), 12, 18, 24 ve 36 saat insan kolon kanseri hücre hattı (HT-29) ve sağlıklı hücreler üzerinde etkisini görmek amacıyla L929 fibroblast hücre hattı ile ayrı ayrı muamele edilerek MTT testi ile hücre canlılığı belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak hiçbir uygulama yapılmamış HT-29/L929 hücreleri ve DMEM besiyeri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, uygulama yapılan grupların HT-29 kanser /L929 sağlıklı hücreleri üzerine etkileri % canlılık olarak hesaplanmıştır. 12 saat inkübasyon sonucu MTT uygulanan HT-29 hücreleri ve 18 saat inkübasyon sonucu DMSO uygulanan HT-29 hücreleri Resim 3.3 ve 3.4'de verilmiştir.

Suda çözünür bir biyopolimer olan CMβ-gluM16'nın hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan MTT testi için, HT-29 ve L929 hücreleri  $1 \times 10^4$  hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu plaklara ekilerek hücrelerin yapışması beklenmiştir. Daha sonra 12,5-25-50-100-200-400-500 µg/mL derişimlerde CMβ-gluM16, her iki hücre hattına ayrı, uygun şekilde hazırlanan DMEM besiyeri ile karıştırılarak HT-29/L929 hücrelerine 200 µL hacimle uygulanmış ve 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 12, 18, 24 ve 36 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol grubu olarak hiçbir madde uygulaması yapılmamış HT-29/L929

hücreleri kullanılmıştır. İnkübasyon sonrasında MTT ile hücre canlılığı belirleme yöntemi Mosmann, (1983) Mosmann, (1983) metodunda bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. 20 µL MTT solüsyonu (5 mg/mL, PBS içinde) HT-29/L929 hücrelerini barındıran kuyulara koyularak 4 saat boyunca etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kuyulardaki MTT solüsyonu boşaltılarak hücrelerin üzerine 200 µL DMSO eklenmiş ve 30 dakika 37°C, %5CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübatörde bekletilmiştir. 570 nm dalgaboyunda ELISA mikropilaka okuyucuda (Epoch, BioTech) optikal yoğunluk, kolorimetrik olarak ölçülmüş ve % canlılık aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Choi ve diğerleri, 2006).

$$\% \text{ Canlılık} = (\text{Absorbans}_{\text{Örnek}} / \text{Absorbans}_{\text{Kontrol}}) \times 100 \quad (3.5)$$



Resim 3.3. 12 saat inkübasyon sonucu MTT uygulanan HT-29 hücreleri



Resim 3.4. 18 saat inkübasyon sonucu DMSO uygulanan HT-29 hücreleri

### 3.2.9. CMβ-gluM16'nın epitel hücrelere yapışmaki rolü

Çalışmada bakterilerin tutunduğu hücre sayısının yüzdesi (adezyon) (Jacobsen ve diğerleri, 1999) tarafından kullanılan metot modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Probiyotik *L. plantarum* LP1 suşunun ve farklı derişimlerde (50, 200 ve 500 mg/mL) CMβ-gluM16 ile hazırlanan sinbiyotik (CMβ-gluM16+*L. plantarum* LP1) uygulamaların HT-29 kolorektal adenokarsinoma hücre hattında epitel hücrelere adezyon yetenekleri belirlenmiştir.

- Hücreler, flasklarda %10 fetal bovin serumu, %1 L-Glutamin (Merck), %1 antibiyotik (penisilin/streptomisin) ve %40 MCDB-201 içeren DMEM (Invitrogen) besi ortamı içerisinde 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde (Panasonic) geliştirilmiştir.
- Flasklarda %80-90 yayılma gösteren hücreler Tripsin/EDTA ile kaldırılarak sayılmıştır (Hadjiakhoondi, 2014).
- HT-29 hücreleri, DMEM besiyeri ile 4 mL olmak üzere 1x10<sup>5</sup> hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyulu mikropklara aktarılmıştır.
- Hücreler, gün aşırı değiştirilen besiyerinde %80 yoğunluğa ulaştığında çalışmaya alınmıştır. Adezyon deneyinden 24 saat önce, kuyulardan hücre besiyeri atılarak yerine, antibiyotik içermeyen 4 mL DMEM besiyeri eklenmiştir.
- 24 saat sonunda 2 kez 3 mL soğuk PBS (pH 7,4) ile hücreler yıkanmış ve sonra hücrelere 2 mL DMEM besiyeri (serum ve antibiyotik içermeyen) eklenerek 37°C'de 30 dk. inkübasyona bırakılmıştır.
- Yoğunluğu McFarland 10'a ayarlanmış 1 mL *L. plantarum* LP1 (probiyotik) ve 1 mL DMEM besiyeri (serum ve antibiyotik içermeyen) hücrelere uygulanmıştır.
- Sinbiyotik uygulama (farklı derişimlerde CMβ-gluM16+*L. plantarum* LP1) ise şu şekilde hazırlanmıştır: Yoğunluğu McFarland 10'a ayarlanmış bakteri süspansiyonundan 1 mL alınmış ve 15 dk 3000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Dibe çöken pellet üzerine 1 mL farklı derişimlerdeki CMβ-gluM16 ilave edilerek karıştırılmıştır. 1 mL sinbiyotik ve 1 mL DMEM besiyeri (serum ve antibiyotik içermeyen) hücrelere uygulanmıştır.
- Hücreler, 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 3 saat inkübasyona bırakılmış, soğuk PBS ile 3 kez yıkama yapılarak her bir kuyucuğa 3 mL metanol eklenerek oda sıcaklığında 10 dk. inkübasyona bırakılmıştır.
- Metanol uzaklaştırılarak sabitlenen hücreler üzerine %40'luk Giemsa boyasından 3 mL eklenmiş ve 20 dk. oda sıcaklığında bekletilerek boyanmıştır.

- %96'lık etanol ile kuyular yıkanmış ve fazla boya uzaklaştırılmıştır. Mikroskopta (Leica, Germany) 25 mm'lik yuvarlak lamellerde incelenerek, hücrelerin sayımı yapılmıştır.
- Adezyon indeksi ve adezyon yüzdesi aşağıda verilen formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

Adezyon Yüzdesi; (Bakteri tutunmuş epitel hücre sayısı/toplam hücre sayısı) x 100 (Otero MC, 2007).

Adezyon indeksi (ADI); 100 hücreye tutunan bakteri sayısı olarak hesaplanmıştır.

“ADI>2500 ise güçlü adezyon,  
ADI; 2500 ile 500 arasında ise iyi adezyon,  
ADI; 500 ile 100 arasında ise zayıf adezyon ve  
ADI<100 ise adezyon yok” şeklinde yorumlanmıştır (Ortega-Toro ve diğerleri, 2016) (Taverniti ve Guglielmetti, 2011).

### 3.2.10. CMβ-gluM16'nın sitokin seviyelerinin belirlenmesi

CMβ-gluM16'nın immünmodülatör etkilerini belirlemek amacıyla sitokin seviyelerinin belirlenmiştir. İlgili sitokinlerin (IL-1β, IL-6, IL-10 ve TNF-α) seviyeleri BTLAB, ELISA kiti kullanılarak belirlenmiştir (Resim 3.6). İnsan interlökin 1 Beta (IL-1β), Human IL-6, Human IL-10 ve Human TNF-α kitleri enzim bağlantılı bir immünosorbent tahlilidir (ELISA).Her kite ait standart grafikleri Şekil 3.2, 3.3, 3.4 ve 3.5'de verilmiştir.

#### Kitin çalışma prensibi

Kitte bulunan plaka, insan IL-1β/IL-6/IL-10/TNF-α antikoruna ile önceden kaplanmıştır. Numunenin eklenmesi ile, numunede bulunan IL-1β/IL-6/IL-10/TNF-α sitokini, kuyucuklarda kaplanmış antikorlara bağlanır. Ardından biyotinlenmiş insan IL-1β/IL-6/IL-10/TNF-α antikoruna eklenerek numunedeki IL-1β/IL-6/IL-10/TNF-α'ya bağlanması sağlanır. Daha sonra kit içerisinde yer alan yıkama solüsyonu ile streptavidin-HRP uzaklaştırılır. Ardından substrat solüsyonu eklenmiş ve insan IL-1β/IL-6/IL-10/TNF-α miktarıyla orantılı olarak renk gelişimi gözlenir. Reaksiyon, kit içerisinde bulunan asidik durdurma solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırılır ve 450 nm'de absorbans ölçülür.

CM $\beta$ -gluM16, 7 farklı derişimlerde (12,5-25-50-100-200-400-500 pg/mL) distile su içerisinde çözölüp 0,45  $\mu$ m por çaplı filtreden geçirilerek steril edilmiştir. 24-48 saat inkübasyondan sonra sitokin seviyeleri ELISA kit (Resim 3.5) yöntemi ile 450 nm'de mikropłaka okuyucuda belirlenmiştir.

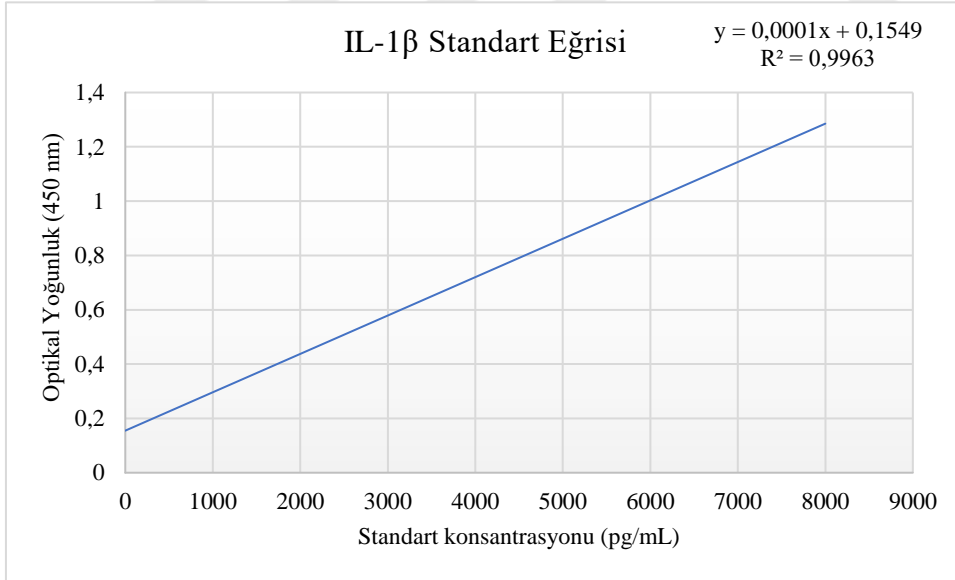


Resim 3.5. ELISA kiti içeriği

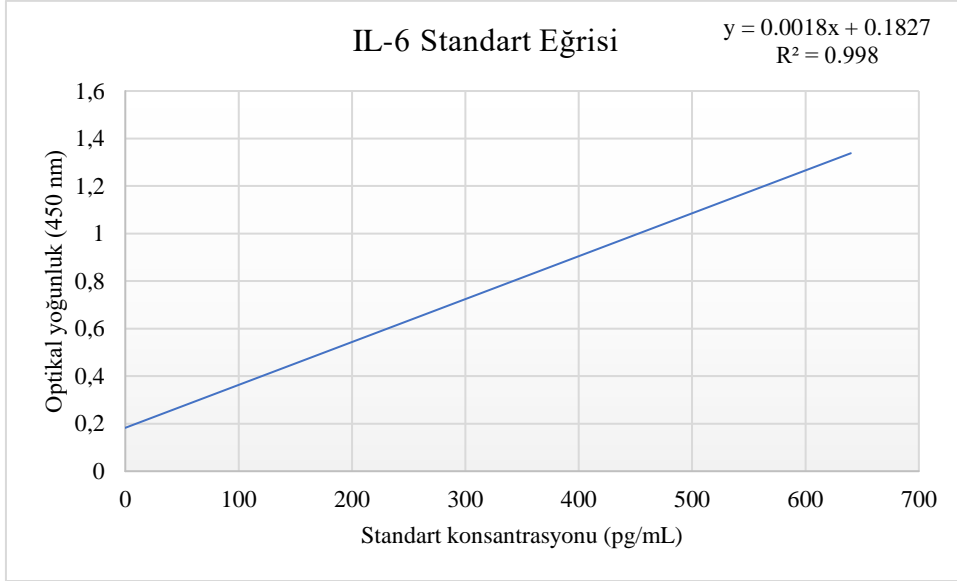
Çalışmada, tüm reaktifler, standart solüsyonlar ve numuneler kitte belirtilen prosedüre göre hazırlanmıştır (oda sıcaklığı). Standart kuyuya 50  $\mu$ L standart solüsyonu eklenmiştir. Örnek kuyularına önceden farklı derişimlerde hazırlanan CM $\beta$ -gluM16'dan 40  $\mu$ L eklenmiş ve ardından 10  $\mu$ L anti- IL-1 $\beta$ /IL-6/IL-10/TNF- $\alpha$  antikoru eklenmiştir. Numune kuyularına ve standart kuyulara 50  $\mu$ L Streptavidin-HRP eklenerek iyice karıştırılmıştır. Plaka bir kapatıcı ile örtülerek 37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir. 60 dakika inkübasyon sonunda plate yıkama tamponu ile 5 kez yıkanmıştır. Her bir kuyucuğa 50  $\mu$ L substrat solüsyonu A ve ardından her kuyuya 50  $\mu$ L substrat solüsyonu B eklenmiştir. Karanlıkta 37°C'de 10 dakika boyunca yeni bir kapatıcı ile kaplanmış plate inkübe edilmiştir. Her kuyucuğa 50  $\mu$ L stop solüsyonu eklenmiş ve mavi rengin hemen sarıya dönüştüğü gözlenmiştir. Durdurma solüsyonunu da ekledikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropłaka okuyucu kullanarak hemen her kuyunun optik yoğunluğunu (OD değeri) belirlenmiştir.



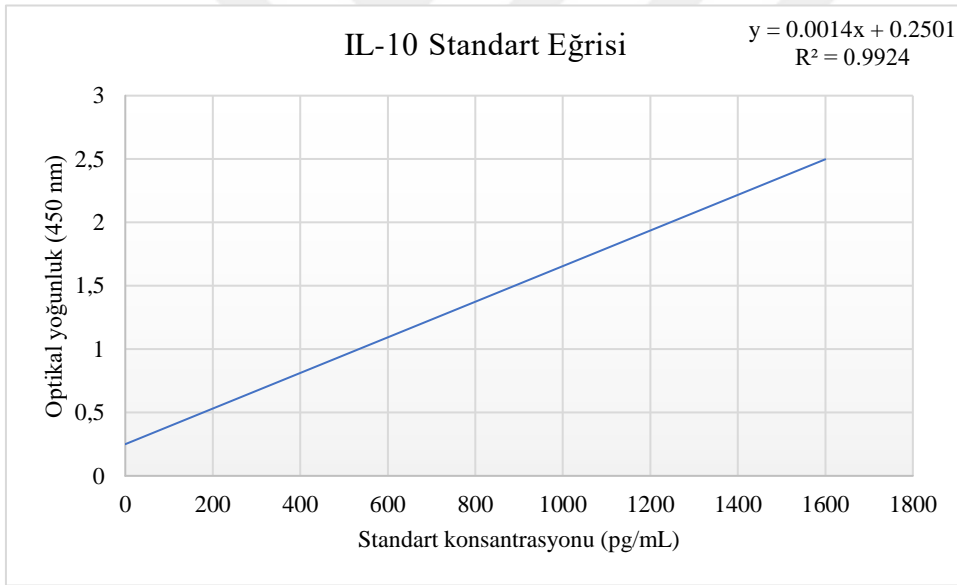
Resim 3.6. Sitokin seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan ELISA kitleri (1: IL-1 $\beta$ , 2: IL-6, 3: IL-10, 4: TNF- $\alpha$ )



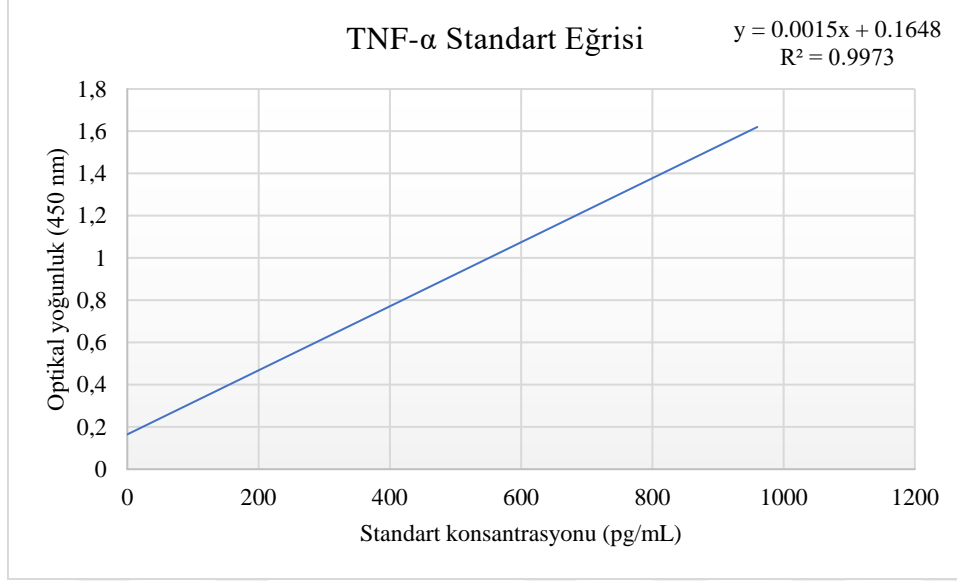
Şekil 3.2. IL-1 $\beta$  standart grafiği



Şekil 3.3. IL-6 standart grafiği



Şekil 3.4. IL-10 standart grafiği



Şekil 3.5. TNF- $\alpha$  standart grafiği

### 3.2.11. İstatistiksel analizler

Tüm çalışmalar, her çalışma için paralel sayısı değişkenlik göstermekle birlikte genel olarak iki paralelli ve üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen veriler bu tekrarların ortalaması  $\pm$  standart sapma (SD) şeklinde verilmiştir. Çalışmalarda kullanılan istatistiksel analizlerde SPSS Inc. Software (16.0 Versiyonu; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kullanılmıştır. İstatistiksel analiz yapılan çalışmalar;

1. Antioksidan aktivite belirlemede yapılan DPPH radikal süpürücü aktivite- Hidroksil radikali süpürücü aktivite- Süperoksit anyonu süpürücü aktivite metotlarında varyanslar eşit dağıldığı için tek yönlü ANOVA testi ardından derişimler arasında anlamlı bir fark olup olmadığını görmek için Tukey testi uygulanmıştır.
2. DPPH radikal süpürücü aktivite- Hidroksil radikali süpürücü aktivite-süperoksit anyonu süpürücü aktivitesi arasında korelasyon belirleme için Pearson korelasyon testi uygulanmıştır.
3. Antibiyofilm aktivite belirleme deneyi için varyanslar eşit dağıldığı için tek yönlü ANOVA testi ardından derişimler arasında anlamlı bir fark olup olmadığını görmek için Tukey testi uygulanmıştır.
4. MTT deneyinde hücre hatları-uygulama saatleri arasındaki ilişkiyi belirlemede ANOVA sonrası Tukey testi uygulanmıştır.

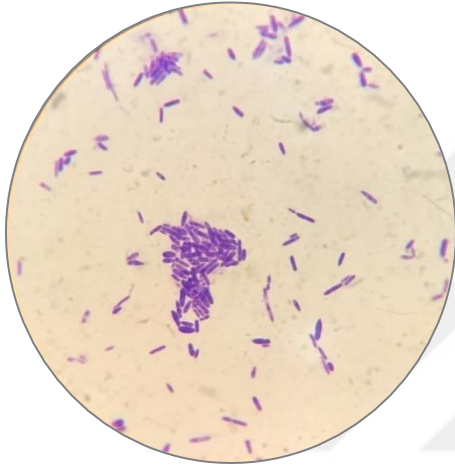
5. *L. plantarum* LP1 probiyotiğinin epitel hücrelere yapışma yeteneğini CM $\beta$ -gluM16 biyopolimerinin (sinbiyotik) arttırıp arttırmadığını bulmak amacıyla yapılan adezyon deneyinde L-929 hücre hattına probiyotik ve sinbiyotiğin çeşitli derişimleri (50, 200, 500 mg/mL) uygulanmış sonrasında adezyon yüzdesi ve adezyon indeksi (ADI) hesaplanmıştır. Yapılan sinbiyotik-probiyotik uygulamalarının arasında ve sinbiyotik uygulamalarının dozlarının kendi aralarında anlamlı bir farka sahip olup olmadığını belirlemek için Tukey testi uygulanmıştır.
6. ELISA deneylerinde interlökin- hücre hattı- uygulama süreleri arasında anlamlı bir fark olup olmadığına bakmak için Tukey testi uygulanmıştır. Ayrıca her bir interlökine uygulanan CM $\beta$ -gluM16 dozları arasında anlamlı bir fark olup olmadığına bakmak için de ANOVA sonrasında Tukey testi uygulanmıştır.



## 4. BULGULAR

### 4.1. $\beta$ -glukanın Ekstraksiyonu

Çalışmada beta glukan ekstraksiyonu için kullanılan *Pichia kudriavzevii* M16 suşunun ışık mikroskop görüntüsü Resim 4.1’de verilmiştir. *Pichia kudriavzevii* M16 mayasının hücre duvarından ekstrakte edilen  $\beta$ -glukan ( $\beta$ -gluM16) Resim 4.2’de ve örneğin liyofilize edildikten sonraki hali ise Resim 4.3’te verilmiştir.



Resim 4.1. *Pichia kudriavzevii* M16 maya suşunun ışık mikroskobu görüntüsü (100X)



Resim 4.2. *Pichia kudriavzevii* M16 mayasının hücre duvarından ekstrakte edilen  $\beta$ -gluM16



Resim 4.3. Liyofilize  $\beta$ -gluM16

## 4.2. $\beta$ -glukanın Karboksimetilasyonu

*Pichia kudriavzevii* M16 maya suşunun hücre duvarından ekstrakte edilen  $\beta$ -glukan ( $\beta$ -gluM16)'nın kimyasal bir modifikasyon yöntemi (karboksimetilasyon) ile çözünürlüğünü artırılmış ve karboksimetilasyon işlemi sonrası elde edilen liyofilizce CM $\beta$ -gluM16 biyopolimerinin liyofilize hali Resim 4.4'te verilmiştir.



Resim 4.4. Liyofilize CM $\beta$ -gluM16 örneği

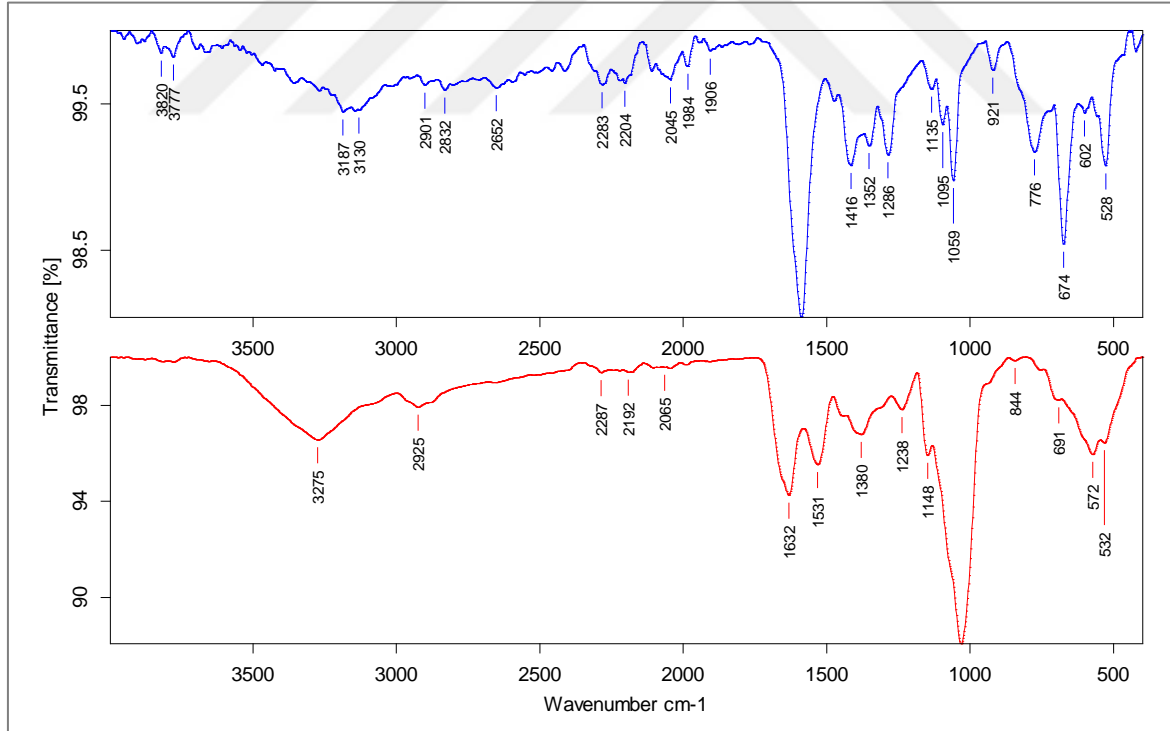
## 4.3. CM $\beta$ -gluM16'nın Karakterizasyonları

### 4.3.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)

Fourier transform kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi, polisakaritlerin yapısal analizinin belirlenmesinde güçlü bir yöntemdir. Yöntem, glukanların içerdiği glikozidik bağ

pozisyonlarına ve konfigürasyona duyarlıdır. Polisakkaritlerin yapısal analizinde iki bölge oldukça önemlidir. Bunlar şeker bölgesi ( $950-1.200\text{ cm}^{-1}$ ) ve anomerik bölge ( $750-950\text{ cm}^{-1}$ ) olarak adlandırılır.

$\beta$ -gluM16 biyopolimerinin FT-IR analizi sonucunda (Şekil 4.1) elde ettiğimiz pikler  $532, 572, 691, 844, 1000, 1148, 1238, 1380, 1531, 1632, 2065, 2192, 2287, 2925, 3275\text{ cm}^{-1}$ 'dir. CM $\beta$ -gluM16 biyopolimerinin FT-IR analizi sonucunda elde edilen pikler ise;  $528, 602, 674, 776, 921, 1059, 1095, 1135, 1286, 1352, 1416, 1500, 1906, 1984, 2045, 2204, 2283, 2652, 2832, 2901, 3130, 3187, 3777, 3820\text{ cm}^{-1}$ 'dir.  $1059-1095-1286\text{ cm}^{-1}$  bantları polisakkarit varlığını kanıtlamaktadır. (1,3)-(1,6)- $\beta$ -D-glukanlarına spesifik bantlara yakın değerlerde alınan pikler de dallanma derecesini göstermektedir. Aynı şekilde karboksimetilasyona uğramış glukan örneklerine spesifik bantlara ( $1600, 1421, 1328, 1047\text{ cm}^{-1}$ ) yakın alınan değerler ( $1416-1352-1059-1500-1352-1416-1059\text{ cm}^{-1}$ ) biyopolimere uygulanan karboksimetilasyon işlemini kanıtlar niteliktedir.



Şekil 4.1.  $\beta$ -gluM16 ve CM $\beta$ -gluM16'nın FT-IR spektrumları (mavi renk CM $\beta$ -gluM16, kırmızı renk  $\beta$ -gluM16'yı temsil etmektedir)

### 4.3.2. SEC

Tez çalışmasında elde edilen CM $\beta$ -gluM16 biyopolimerinin SEC analizi ile grafikten elde edilen  $\log M=33,58-5,974X^1 + 0,4563X^2 - 0,01291X^3$  kalibrasyon doğrusu ( $R^2= 0,9998$ ) ile moleküler ağırlığı belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Elde edilen sonuçların polidispers polimerler için  $M_n < M_w < M_z$  kuralına uyduğu belirlenmiştir. Yüksek Pd değeri daha geniş moleküler ağırlığı dağılımı ifade etmektedir. CM $\beta$ -gluM16'nın moleküler ağırlığı 232,013 kDa olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. CM $\beta$ -gluM16'nın boyut dışlama kromatografi sonuçları

CM $\beta$ -gluM16	
Mp (kDa) (En yüksek pike ait molekül ağırlığı)	93,881
Mn (kDa) (Sayıca ortalama moleküler ağırlığı)	148,858
Mw (kDa) (Ağırlıkça ortalama moleküler ağırlığı)	232,013
Mz (kDa) (Z ortalama moleküler ağırlığı)	406,931
Pd (Polidispersite indeksi)	1,5586
Rt (Alıkonma zamanı)	12,64

## 4.4. CM $\beta$ -gluM16'nın Biyolojik Aktiviteleri

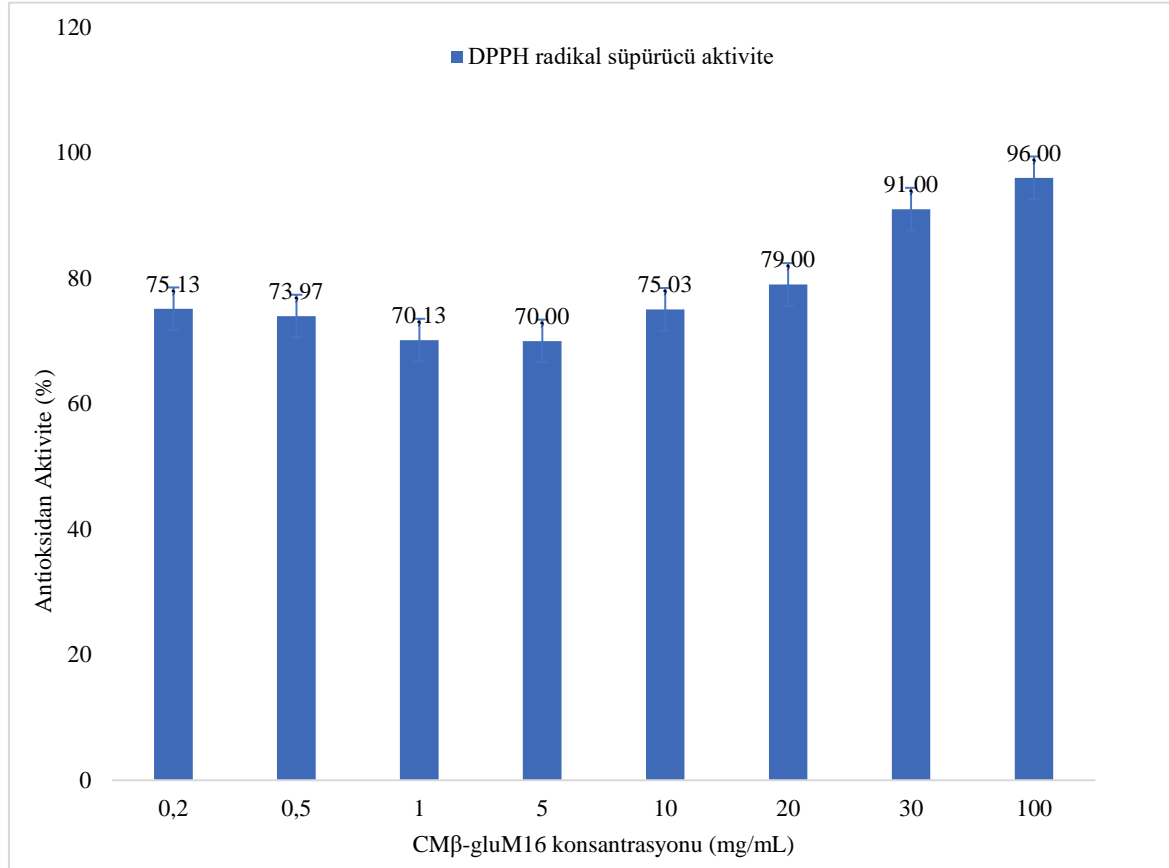
### 4.4.1. Antioksidan aktivite

Karboksimetillenmiş  $\beta$ -gluM16'nın (CM $\beta$ -gluM16) farklı derişimlerde (0,2-0,5-1-5-10-20-30 ve 100 mg/mL) antioksidan aktivitesi üç farklı yöntemle tespit edilmiş ve sonuçlar Şekil 4.1'de verilmiştir.

#### 2,2-difenil-1-pikrilhidraz (DPPH) radikal süpürücü aktivite

DPPH radikal süpürme aktivitesinin en yüksek 100 mg/mL CM $\beta$ -gluM16 derişiminde (%96), en düşük aktivitenin ise 1 mg/mL ve 5 mg/mL derişiminde (%70) olduğu belirlenmiştir. 0,2 mg/mL (%75,13) derişimden 5 mg/mL'lik (%70) konsantrasyona kadar antioksidan aktivitede kademeli bir azalış olduğu ve aktivitenin 10 mg/mL'lik (%75,03) konsantrasyondan 100 mg/mL'lik (%96) derişime doğru ise kademeli bir biçimde artmaya başladığı bulunmuştur (Çizelge 4.1). Elde edilen sonuçlar CM $\beta$ -gluM16'nın DPPH radikal süpürücü aktivitesinin olduğunu göstermiştir. DPPH radikal süpürme aktivitesi belirlenen

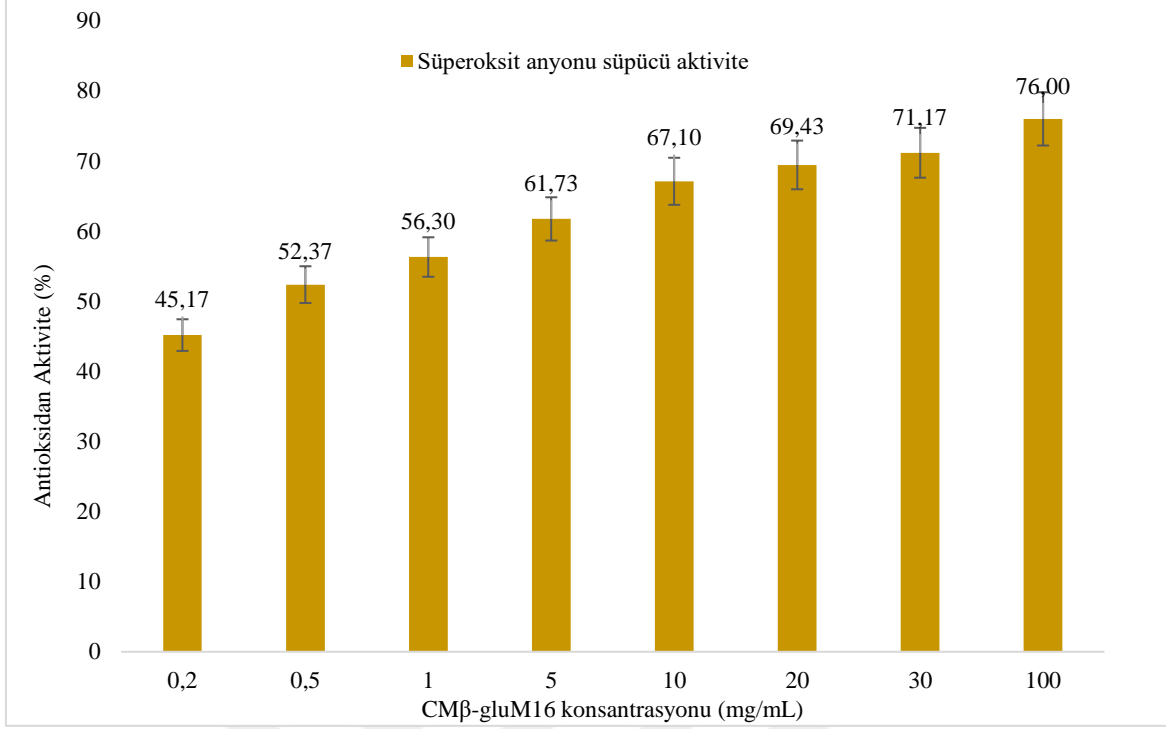
CM $\beta$ -gluM16 biyopolimerinin uygulanan dozları arasında istatistiksel açıdan bir anlamlılık olup olmadığını kanıtlamak için Tukey testi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlarda  $p=0,05$  seviyesinde 1-5 mg/mL ve 0,2-10 mg/mL dozları arasında anlamlı bir fark bulunmazken, diğer tüm dozlar arası anlamlı fark olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.2. CM $\beta$ -gluM16'nın farklı derişimlerde DPPH radikal süpürücü aktivitesi

#### Süperoksit anyonu süpürücü aktivitesi

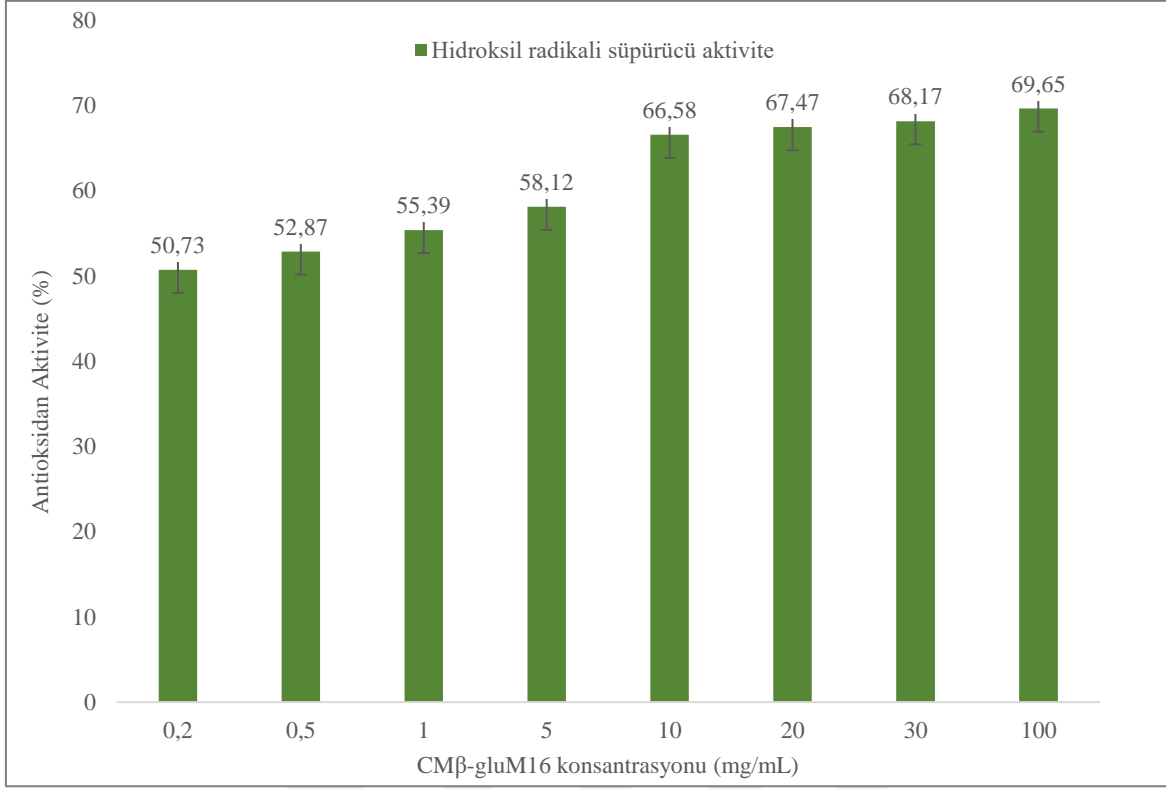
CM $\beta$ -gluM16'nın süperoksit anyonu süpürücü aktivitesi farklı derişimlerde (0,2-0,5-1,5, 10, 20, 30 ve 100 mg/mL) belirlenmiş ve artan derişimlerde süperoksit anyonu süpürücü aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. (Çizelge 4.1, Şekil 4.2). 100 mg/mL derişiminde süpürücü aktivite %76 olarak tespit edilirken ve 0,2 mg/mL derişimde %45,17 süpürücü aktivite belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar CM $\beta$ -gluM16'nın süperoksit anyonu süpürme aktivitesinin olduğunu göstermiştir. Süperoksit anyonu süpürücü aktivitesi belirlenen CM $\beta$ -gluM16 biyopolimerinin uygulanan dozları arasında istatistiksel açıdan bir anlamlılık olup olmadığını kanıtlamak için Tukey testi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlarda uygulanan tüm dozlar arasında  $p<0,05$  seviyesinde anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.3. CMβ-gluM16'nın süperoksit anyonu süpürücü aktivitesi (%)

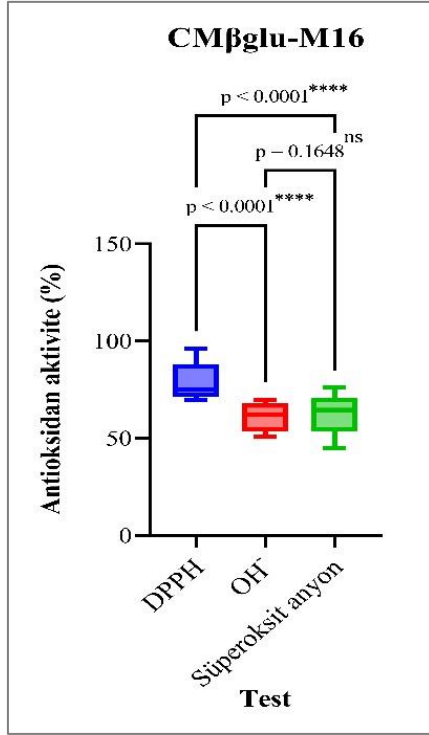
#### Hidroksil radikali süpürücü aktivitesi

Hidroksil radikal süpürücü aktivite deneyinde, CMβ-gluM16 aktivitesinin, 100 mg/mL derişimine (%69,65) ulaşana dek kademeli bir artış olduğu bulunmuştur (Şekil 4.3). Sonuçlar, CMβ-gluM16'nin hidroksil radikali süpürme aktivitesinin olduğunu göstermiştir. Hidroksil radikali süpürücü aktivitesi belirlenen CMβ-gluM16 biyopolimerinin uygulanan dozları arasında istatistiksel açıdan bir anlamlılık olup olmadığını kanıtlamak için Tukey testi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlarda uygulanan tüm dozlar arasında  $p < 0,05$  seviyesinde anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.4. CMβ-gluM16'nın hidroksil radikali süpürücü aktivitesi (%)

Antioksidan aktivitenin belirlendiği üç metot (DPPH radikal süpürücü aktivite-hidroksil radikali süpürme aktivitesi-süperoksit anyonu süpürücü aktivitesi) arasında korelasyon olup olmadığını belirlemek amacıyla, Pearson korelasyon testi uygulanmış olup DPPH radikal süpürücü aktivite- hidroksil radikali süpürücü aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmüştür ( $r=0,712$  ve  $r=0,701$ ,  $p<0,0001$ ). Hidroksil radikali süpürücü aktivitesi ve süperoksit anyon temizleme aktivitesi arasında ise istatistiksel olarak güçlü bir ilişki bulunmuştur ( $r=0,974$ ,  $p<0,01$ ). DPPH radikal süpürücü aktivite- hidroksil radikal süpürme aktivitesi arasında ve DPPH radikal süpürücü aktivite- süperoksit anyonu süpürücü aktivitesi arasında anlamlı bir fark bulunurken ( $p<0,0001$ ,  $p<0,0001$ ), hidroksil radikali süpürücü aktivitesi- süperoksit anyonu süpürücü aktivitesi arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p=0,1648$ ) Şekil 4.4'te verilmiştir.



\*\*\*\*:  $p < 0,0001$

ns (non-significant): istatistiksel olarak anlamlı değil

Şekil 4.5. CMβ-gluM16'nın antioksidan testlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

#### 4.5. Antibiyofilm Etkinin Belirlenmesi

CMβ-gluM16, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeruginosa* 29212 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'ün oluşturduğu biyofilmi %57 ile %80 arasında engellenmiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.5). CMβ-gluM16'nın en yüksek biyofilm inhibisyonu *E. coli* ATCC 11229 bakterisinde %80, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'te %67 ve *P. aeruginosa* 29212 da ise %71 engellediği bulunmuştur.

Çizelge 4.2. Biyofilm inhibisyon sonuçları (%)

CMβ-gluM16 derişimi (mg/mL)	<i>E. coli</i> ATCC 11229	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 29212	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
0,2	77±0 <sup>a</sup>	61±1	65±2
0,5	79±0	71±4	61±7 <sup>b</sup>
1	80±0 <sup>a</sup>	71±3	57±4 <sup>b</sup>
5	79±2	71±1 <sup>b</sup>	66±3 <sup>b</sup>
10	79±1	71±1	67±2 <sup>b</sup>
20	79±3	71±3 <sup>b</sup>	66±3
30	79±2	71±4 <sup>b</sup>	66±2 <sup>b</sup>
100	78±3 <sup>a</sup>	70±1 <sup>b</sup>	66±1

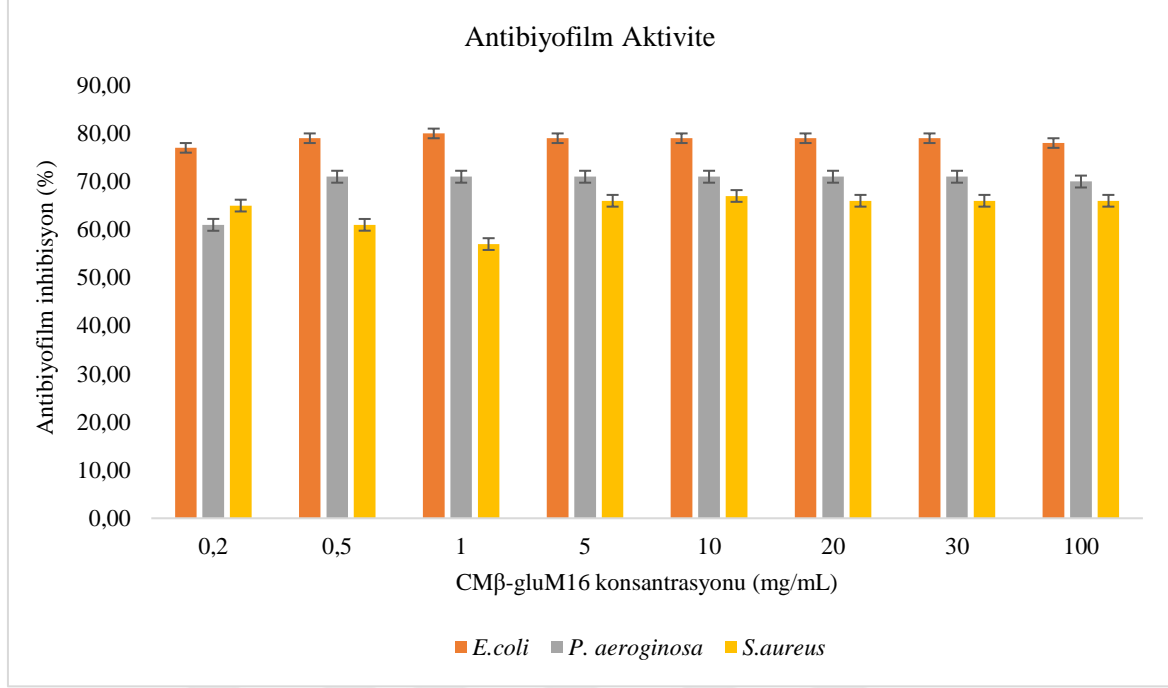
a: Dozlar arasında anlamlı bir fark var ( $p < 0,05$ )

b: Dozlar arasında anlamlı bir fark yok ( $p > 0,05$ )

Her üç biyofilm oluşturan bakteri suşunda farklı derişimlerde CM $\beta$ -gluM16'nın biyofilm inhibisyonu değerlendirildiğinde;

- CM $\beta$ -gluM16'nın 1 mg/mL'lik derişimin *E. coli* ATCC 11229 bakterisinin oluşturuğu biyofilmi en yüksek oranda (%80) inhibe ettiği, 0,2 mg/mL'lik derişiminde ise en düşük oranda (%77) inhibe ettiği bulunmuştur.
- CM $\beta$ -gluM16'nın 0,5, 1, 5, 10, 20, 30 mg/mL'lik derişimlerinin *P. aeruginosa* ATCC 29212 bakterisinin oluşturuğu biyofilmi en yüksek oranda (%71) inhibe ettiği, 0,2 mg/mL'lik derişiminde ise en düşük oranda (%61) inhibe ettiği bulunmuştur.
- CM $\beta$ -gluM16'nın 10 mg/mL'lik derişiminde *S. aureus* ATCC 25923 bakterisinin oluşturuğu biyofilmi %67 oranında inhibe ederken 1 mg/mL'lik derişimde inhibisyon oranı %57 olarak tespit edilmiştir.

Antibiyofilm aktivitesi belirlenen CM $\beta$ -gluM16'nın her bir bakteri için uygulanan dozlar arası anlamlı bir fark olup olmadığını tespit etmek amacıyla Tukey testi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda *E. coli* ATCC 11229 bakterisine uygulanan CM $\beta$ -gluM16'nın 0,2-1-100 mg/mL dozları arasında  $p=0,05$  seviyesinde anlamlı fark görülürken, diğer dozlar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. *S. aureus* ATCC 25923 bakterisine uygulanan CM $\beta$ -gluM16'nın 5-20-30-100 mg/mL dozları arasında  $p=0,05$  seviyesinde anlamlı fark görülmezken, diğer dozlar arasında anlamlı fark olduğu görülmüştür. *P. aeruginosa* ATCC 29212 bakterisine uygulanan CM $\beta$ -gluM16'nın 0,2 ve 100 mg/mL dozları hariç hiçbir dozunda anlamlı fark görülmemiştir.



Şekil 4.6. CMβ-gluM16'nın biyofilm inhibisyonu (%)

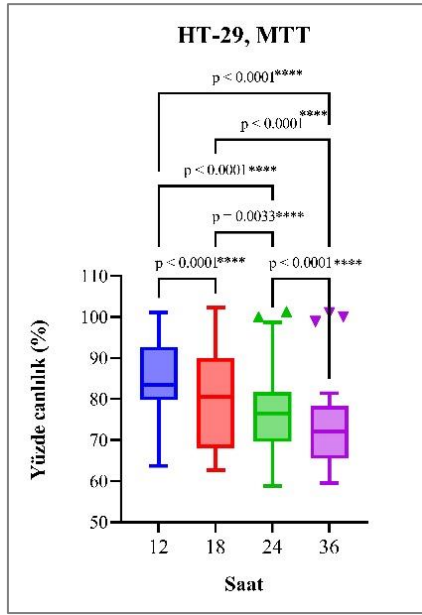
#### 4.6. Sitotoksosite

##### 4.6.1. CMβ-gluM16'nın HT-29 insan kolorektal adenokarsinoma hücre hattında 3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) testi ile antiproliferatif etkinin belirlenmesi

Çalışmada, *P. kudriavzevii* M16 maya suşunun hücre duvarından ekstrakte edilip ardından karboksimetilasyon uygulanan β- glukan biyopolimeri (CMβ-gluM16) ile 12, 18, 24 ve 36 saat süre muamele edilen HT-29 insan kolorektal adenokarsinom hücrelerinde MTT testi ile hücre canlılığı belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak hiçbir uygulama yapılmamış HT-29 hücreleri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, uygulama yapılan grupların HT-29 üzerine etkileri % canlılık olarak hesaplanmış ve antiproliferatif etki değerlendirilmiştir. 12, 18, 24, 36 saat boyunca CMβ-gluM16 uygulamaları sonucu, artan derişim ve muamele sürelerinde hücre canlılığın azaldığı tespit edilmiştir. Bu durum kullanmış olduğumuz biyopolimerin kanser hücresi üzerindeki antiproliferatif etkisini kanıtlamaktadır.

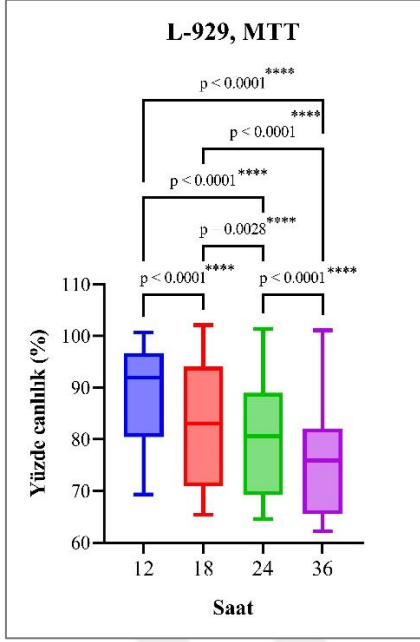
Beta glukan biyopolimerinin antiproliferatif etkisi değerlendirildiğinde, uygulama süresinin artışına bağlı olarak antiproliferatif etkinin arttığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.3). CMβ-gluM16'nın uygulama süreleri incelendiğinde tüm uygulamaların artan süreye bağlı olarak kanser hücresine karşı antiproliferatif etkide artışa yol açtığı tespit edilmiştir. Çalışma

sonucuna göre en yüksek antiproliferatif etki CM $\beta$ -gluM16'nın 36 saatlik uygulamasında 500  $\mu$ g/mL derişimde belirlenmiş olup (%40 ölüm), en düşük antiproliferatif etki ise CM $\beta$ -gluM16'nın 12 saatlik uygulamasının 12,5  $\mu$ g/mL derişiminde görülmüştür (%6 ölüm). CM $\beta$ -gluM16'nın HT-29 hücre hattı üzerinde 12-18, 12-24, 12-36 uygulama saatleri arasında  $p < 0,0001$ ; 18-24 uygulama saatleri arasında  $p = 0,0033$ ; 18-36 ve 24-36 uygulama saatleri arasında  $p < 0,0001$  seviyelerinde fark bulunmuştur (Şekil 4.6).



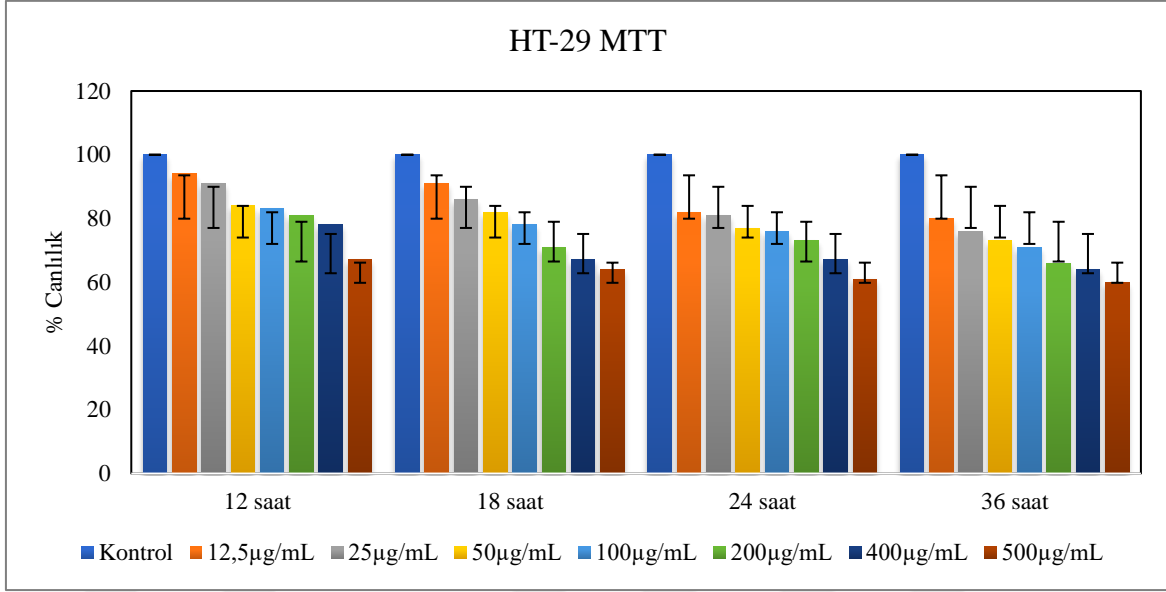
Şekil 4.7. HT-29 MTT testi uygulama saatlerinin istatistiksel değerlendirilmesi

CM $\beta$ -gluM16'nın L-929 hücre hattı üzerinde ise 12-18, 12-24, 12-36 uygulama saatleri arasında  $p < 0,0001$ ; 18-24 uygulama saatleri arasında  $p = 0,0028$ ; 18,36 ve 24-36 uygulama saatleri arasında ise  $p < 0,0001$  seviyelerinde fark bulunmuştur (Şekil 4.7).



Şekil 4.8. L-929 MTT testi uygulama saatlerinin istatistiksel değerlendirilmesi

HT-29 insan kolorektal adenokarsinom hücrelerinin CM $\beta$ -gluM16 biyopolimeri ile muamelesi dört farklı saatte değerlendirilmiş olup ilk olarak 12 saat muamele sonucunda hücre canlılığı en yüksek dozda (100  $\mu$ g/mL) %67'ye düşmüştür. Bu durum hücrelerde kontrol grubuna (hiçbir uygulama yapılmamış HT-29 hücreleri) göre yaklaşık %33 oranda ölüm meydana geldiğini göstermektedir. Benzer şekilde 18 saatin sonunda canlılık %64'e; 24 saat sonunda canlılık %61'e ve son olarak 36 saatlik uygulama sonucunda da canlılık %60'a kadar düşmüştür. Bu da sırasıyla %36, %39 ve %40 hücre ölümü meydana geldiğini göstermektedir. Bu durum hücrelerin biyopolimer ile muamele süreleri ve dozları arttıkça antiproliferatif etkinin de arttığını gösterir niteliktedir (Şekil 4.8).



Şekil 4.9. CMβ-gluM16'nın farklı derişimlerde HT29 hücre hattı üzerinde % canlılık değerleri

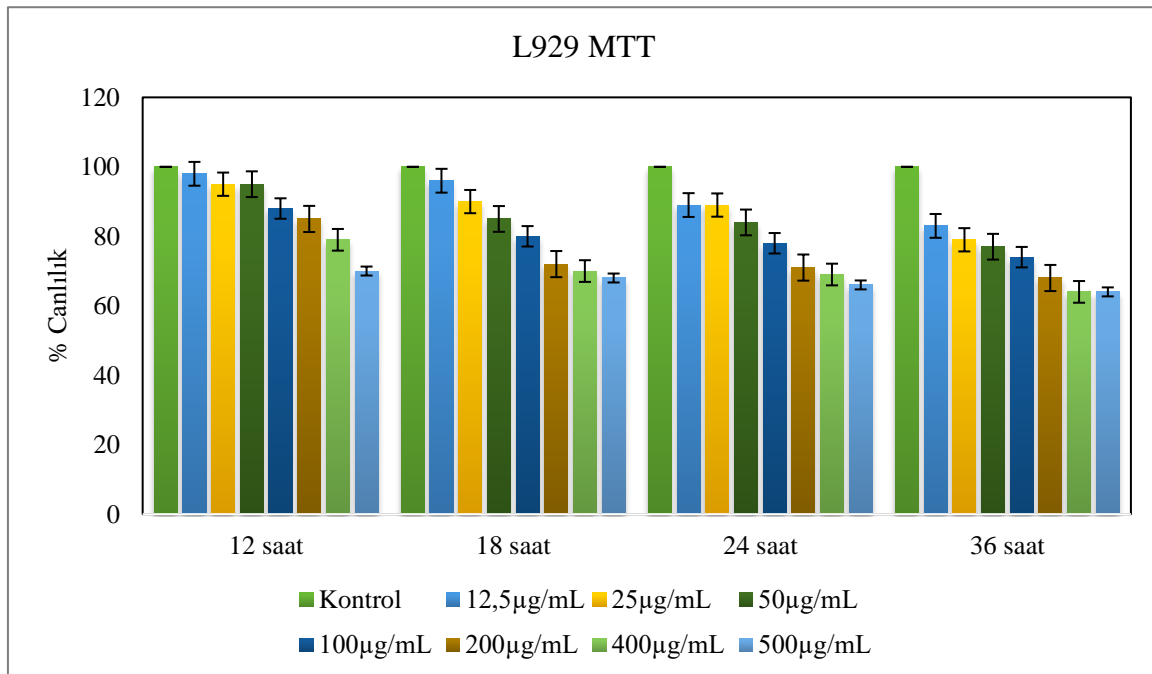
Çizelge 4.3. CMβ-gluM16'nın HT29 hücre hatında antiproliferatif etkilerinin MTT testi sonuçları (% canlılık)

Süre							
12 saat		18 saat		24 saat		36 saat	
Derişim (µg/mL)	Canlılık (%)	Derişim (µg/mL)	Canlılık (%)	Derişim (µg/mL)	Canlılık (%)	Derişim (µg/mL)	Canlılık (%)
Kontrol	100±1	Kontrol	100±2	Kontrol	100±1	Kontrol	100±1
12,5	94±1	12,5	91±1	12,5	82±1	12,5	80±1
25	91±1	25	86±3	25	81±1	25	76±2
50	84±2	50	82±2	50	77±2	50	73±3
100	83±1,6	100	78±3	100	76±3	100	71±2
200	81±2	200	71±3	200	73±3	200	66±1
400	78±3	400	67±1	400	67±3	400	64±3
500	67±3	500	64±1	500	61±2	500	60±1

#### 4.6.2. CM $\beta$ -gluM16'nın L929 Fibroblast Hücre Hattında MTT Testi ile Canlılığının Ölçülmesi

Çalışmada, *P. kudriavzevii* M16 maya suşunun hücre duvarından ekstrakte edilip ardından karboksimetilasyon uygulanan beta glukan biyopolimeri (CM $\beta$ -gluM16) ile 12, 18, 24, 36 saat muamele edilen L929 sağlıklı fibroblast hücrelerinde MTT testi ile hücre canlılığı belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak hiçbir uygulama yapılmamış L929 sağlıklı fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, uygulama yapılan grupların L929 hücreleri üzerine etkilerinin proliferatif olarak değerlendirmesi amacıyla % canlılıkları hesaplanmıştır (Çizelge 4.4).

Beta glukan biyopolimerinin proliferatif etkisi değerlendirildiğinde, uygulama süresinin artışına bağlı olarak proliferatif etkinin azaldığı tespit edilmiştir. Tüm uygulamalar incelendiğinde CM $\beta$ -gluM16'nın L929 hücrelerinde %2-36 arasında değişen düşük oranlarda sağlıklı hücre ölümüne neden olduğu belirlenmiştir. Bu oranın toksisite açısından dikkate değer olmadığı görülmüş olup, CM $\beta$ -gluM16'nın tüm derişim ve sürelerdeki uygulamalarının biyogüvenli olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.10. CM $\beta$ -gluM16'nın farklı derişimlerde L929 hücre hattı üzerinde % canlılık değerleri

Çizelge 4.4. CMß-gluM16'nin L929 hücre hatında proliferatif etkilerinin MTT testi sonuçları (% canlılık)

12 saat		18 saat		24 saat		36 saat	
Kontrol	100±1	Kontrol	100±2	Kontrol	100±1	Kontrol	100±1
12,5 (µg/mL)	98±1	12,5 (µg/mL)	96±1	12,5 (µg/mL)	89±1	12,5 (µg/mL)	83±1
25	95±1	25	90±1	25	89±2	25	79±3
50	95±1	50	85±1	50	84±2	50	77±1
100	88±2	100	80±2	100	78±1	100	74±2
200	85±1	200	72±2	200	71±3	200	68±3
400	79±0	400	70±3	400	69±1	400	64±1
500	70±1	500	68±3	500	66±1	500	64±2

#### 4.7. Adezyon

Çalışmada, *L. plantarum* LP1 (probiyotik) ve sinbiyotik (CM $\beta$ -gluM16+*L. plantarum* LP1) uygulamalarının HT-29 kolon hücre hattına adezyon yetenekleri tespit edilmiştir.

Uygulama grupları;

- Kontrol,
- *L. plantarum* LP1 (probiyotik),
- 50 mg/mL CM $\beta$ -gluM16+*L. plantarum* LP1 (sinbiyotik)
- 200 mg/mL CM $\beta$ -gluM16+*L. plantarum* LP1 (sinbiyotik)
- 500 mg/mL CM $\beta$ -gluM16+*L. plantarum* LP1 (sinbiyotik) tir.

Belirtilen uygulamaların adezyon yetenekleri Leica (Germany) mikroskop ile (100X oranda büyütme) belirlenmiştir (Şekil 4.10). Ardından 40X objektifiyle görüntüler alınarak sayım yapılmış, adezyon yüzdesi ile adezyon indeksi hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.7’de verilmiştir. Çalışmada kullanılan probiyotik bakterinin ve farklı sinbiyotik uygulamaların adezyon yüzdesi (%) ve adezyon indeksi (ADI) Çizelge 4.5’te gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Probiyotik ve sinbiyotik uygulamaların adezyon yüzde ve indeks değerleri

Uygulamalar	Adezyon (%) <sup>a</sup>	Adi <sup>b</sup>
Sinbiyotik 50 mg/mL CM $\beta$ -gluM16+ <i>L. plantarum</i> LP1	85	883
Sinbiyotik 200 mg/mL CM- $\beta$ gluM16+ <i>L. plantarum</i> LP1	89	1140
Sinbiyotik 500 mg/mL CM $\beta$ -gluM16+ <i>L. plantarum</i> LP1	92	1180
Probiyotik (Canlı Bakteri) <i>L. plantarum</i> LP1	83	566

<sup>a</sup>: Bakteri tutunan hücre sayısının yüzdesi

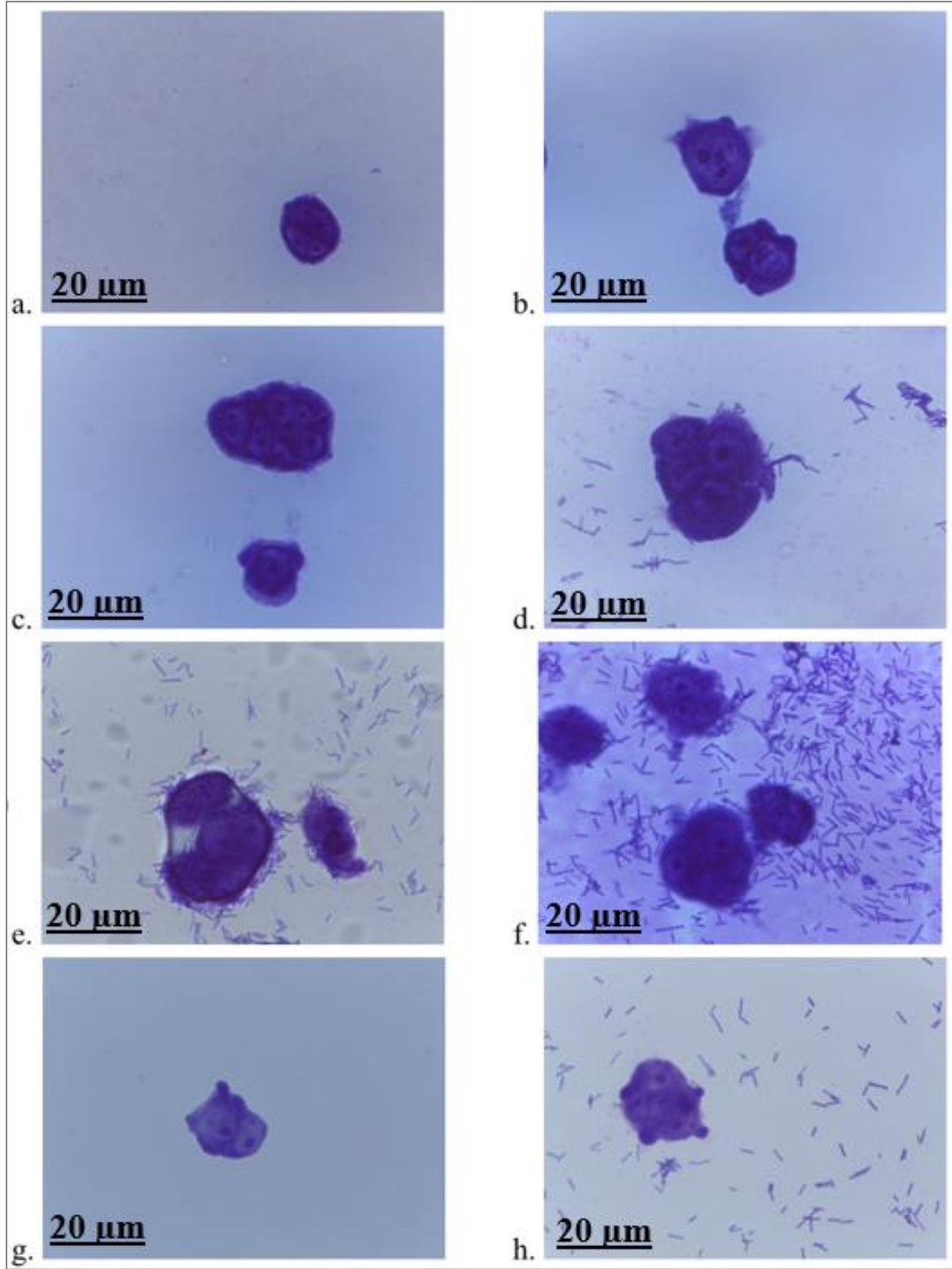
<sup>b</sup>: 100 hücreye tutunan bakteri sayısı

HT-29 hücrelerine *L. plantarum* LP1 probiyotiği ve farklı dozlarda CM $\beta$ -gluM16 içeren *L. plantarum* LP1 (sinbiyotik) eklenmiştir. Hücrelere probiyotiğin uygulanması ile adezyon yüzdesi %83, ADI değeri 566, 50 mg/mL CM $\beta$ -gluM16 içeren sinbiyotiğin uygulamasında adezyon yüzdesi %85, ADI değeri 883, 200 mg/mL CM $\beta$ -gluM16 içeren sinbiyotiğin uygulanmasında ise adezyon yüzdesi %89 olarak hesaplanırken, ADI değeri 1140 olarak

hesaplanmıştır. 500 mg/mL CMβ-gluM16 içeren sinbiyotiğin uygulanmasında ise adezyon yüzdesi %92 olarak hesaplanırken, ADI değeri 1180 olarak hesaplanmıştır.

Bu sonuçlar neticesinde, farklı dozlarda (50, 200, 500 mg/mL) CMβ-gluM16 ile *L. plantarum* LP1 suşunun kombinasyonları sonucu hazırlanan sinbiyotik uygulamaların, tek başına *L. plantarum* LP1 suşuna göre daha yüksek adezyon yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu durum, CMβ-gluM16'nın *L. plantarum* LP1 suşunun adezyon yeteneğini arttırdığını göstermektedir. İncelenen suşun hücrelere yüksek oranda adezyon yeteneğine sahip olduğu, CMβ-gluM16'nın da bakterinin adezyon yeteneğini önemli ölçüde artırdığı görülmüştür. Formüle göre adezyon indeksi (ADI) “ADI>2500 ise güçlü adezyon, ADI; 2500 ile 500 arasında ise iyi adezyon, ADI; 500 ile 100 arasında ise zayıf adezyon ve ADI<100 ise adezyon yok” şeklinde değerlendirilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre, HT-29 hücrelerine uygulamaların hepsinin ADI değerleri 566 ile 1180 arasında belirlendiği için uygulamalar “iyi adezyon” olarak değerlendirilmiştir.

Bu sonuçları Resim 4.5'de sunulan ışık mikroskobu (Leica, Germany) görüntüleri de destekler niteliktedir. *L. plantarum* LP1 suşu, tek başına HT-29 hücrelerine uygulandığında da iyi adezyon yeteneği göstermiş ancak 500 mg/mL CMβ-gluM16'nın adezyon yeteneğini arttırdığı gözlenmiştir.

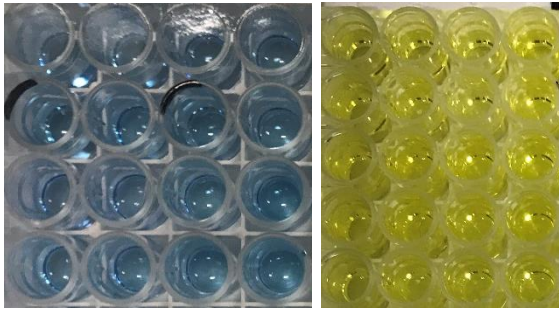


Şekil 4.11. a: 50 mg/mL CM $\beta$ -gluM16, b: 200 mg/mL CM $\beta$ -gluM16, c: 500 mg/mL CM $\beta$ -gluM16, d: 50 mg/mL CM $\beta$ -gluM16+*L. plantarum* LP1, e: 200 mg/mL CM $\beta$ -gluM16+*L. plantarum* LP1, f: 500 mg/mL CM $\beta$ -gluM16+*L. plantarum* LP1, g: Kontrol (HT-29 hücresi ve besiyeri DMEM), h: HT-29 hücresi+*L. plantarum* LP1

#### 4.8. CM $\beta$ -gluM16'nın IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 ve TNF- $\alpha$ Kitleri ile Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi

##### 4.8.1. CM $\beta$ -gluM16'nın immünmodölatör etkisinin belirlenmesi için, HT-29 ve L929 hücrelerinden salınan IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 ve TNF- $\alpha$ sitokin seviyelerine etkisi araştırılmıştır.

Çalışmada HT-29 ve L929 hücrelerinde IL-1 $\beta$  sitokin seviyeleri ölçülmüştür. CM $\beta$ -gluM16 12,5-25-50-100-200-400-500 pg/mL dozunda eklenmiştir. Kontrol grubu olarak biyopolimer ile muamele edilmemiş hücreler kullanılmıştır. Uygulamada kullanılan ELİSA kitinin çalışma prensibi, streptavidin ve biyotin arasındaki kuvvetli bağlanma özelliğine dayanmaktadır. Bu yöntemde primer antikora bağlanan, biyotin ile işaretlenmiş ikinci antikor kullanılmaktadır. Horse radish peroksidaz işaretli olan streptavidin, biyotininle işaretli ikinci antikora bağlanır. Kromojen/substrat solüsyonu olarak tetrametilbenzidin kullanılır ve dokudaki antijen/antikor/enzim kompleksi etrafında mavi renk reaksiyonu oluşur. Durdurma solüsyonunun eklenmesiyle mavi rengin sarıya dönüştüğü gözlenir. Ortama salınan IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 ve TNF- $\alpha$  miktarına bağlı olarak sarı rengin tonu da değişim göstermektedir (Resim 4.8). Deneyler 3 tekrarlı yürütülmüş olup sitokin seviyeleri belirlenen kitlerin standart grafikleri oluşturulmuş, sonuçlar standartlara göre değerlendirilmiş, ardından SPSS Inc Software (16.0 versiyon; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kullanılarak tek yönlü ANOVA testi uygulanmıştır. Bu istatistik ile hücre hatları arasındaki farklar ve uygulama saatleri arasındaki farkların anlamlı olup olmadığı değerlendirilmiştir.

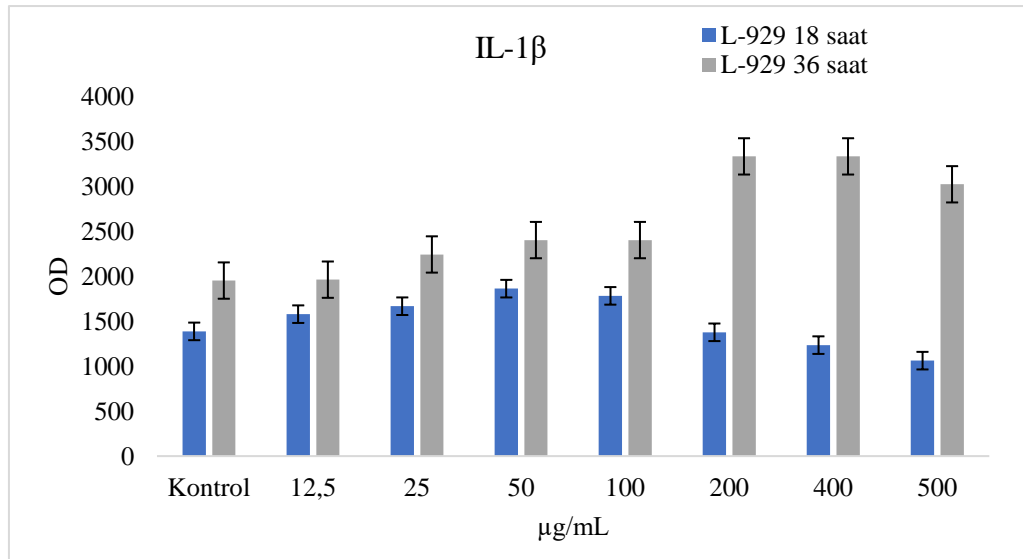


Resim 4.5. ELISA kiti durdurma solüsyonu uygulaması sonucu oluşan renk değişimi (soldaki resim uygulama öncesi, sağdaki resim uygulama sonrası)

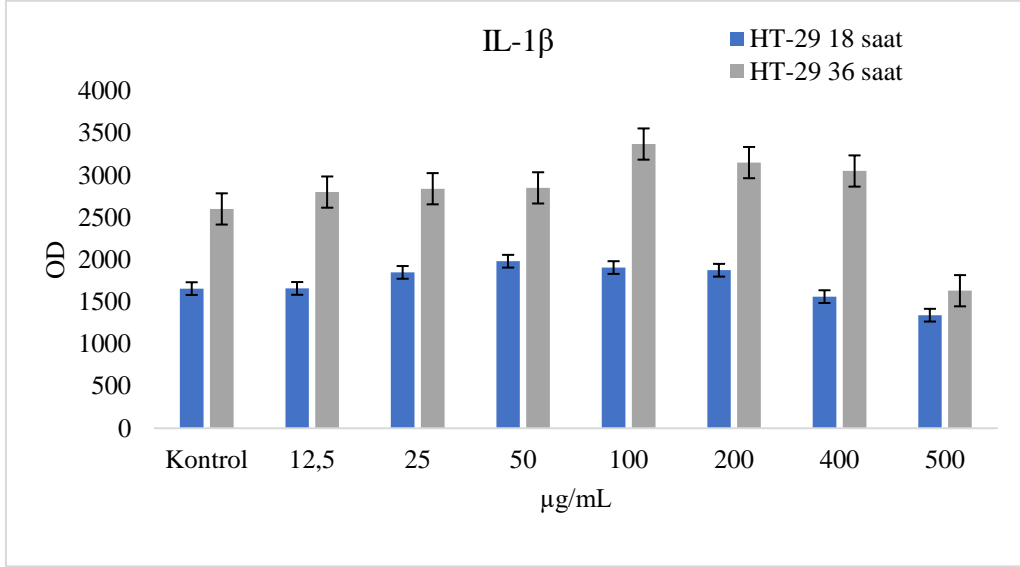
#### 4.8.2. IL-1 $\beta$

Kit standartından elde edilen formül ile CM $\beta$ -gluM16'nın OD değerleri hesaplanarak sonuçlara ait grafikler Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de verilmiştir. IL-1 $\beta$  pro-inflamatuvar sitokini, L929 sağlıklı fibroblast hücre hattında CM $\beta$ -gluM16 ile 18 saat muamele sonucunda 12,5-100  $\mu$ g/mL derişimde kontrol grubuna göre inflamasyonda artış, 100  $\mu$ g/mL derişimden itibaren ise azalış gözlenmiştir. IL-1 $\beta$  pro-inflamatuvar sitokini HT-29 kolorektal adenokarsinom hücre hattında CM $\beta$ -gluM16 ile 18 saat muamele sonucunda kontrole göre 12,5-100  $\mu$ g/mL derişimde inflamasyonda artış, 100  $\mu$ g/mL derişimden itibaren ise azalış gözlenmiştir. L929 sağlıklı fibroblast hücre hattında CM $\beta$ -gluM16 ile 36 saat muamele sonucunda 12-5-200  $\mu$ g/mL derişimde elde edilen sitokin seviyesi, IL-1 $\beta$  standart grafiğinden elde edilen denkleme göre hesaplanmış olup kontrol grubuna göre inflamasyonda artış, 200  $\mu$ g/mL derişimden itibaren ise azalış gözlenmiştir.

IL-1 $\beta$  pro-inflamatuvar sitokini, HT-29 kolorektal adenokarsinom hücre hattında CM $\beta$ -gluM16 ile 18 saat muamele sonucunda 12,5-100  $\mu$ g/mL derişimde kontrol grubuna göre inflamasyonda artış, 100  $\mu$ g/mL konsantrasyondan itibaren ise azalış gözlenmiştir. 36 saat muamele sonucunda da benzer şekilde 12-5-100  $\mu$ g/mL derişimde kontrol grubuna göre inflamasyonda artış, 100  $\mu$ g/mL derişimden itibaren ise azalış gözlenmiştir.

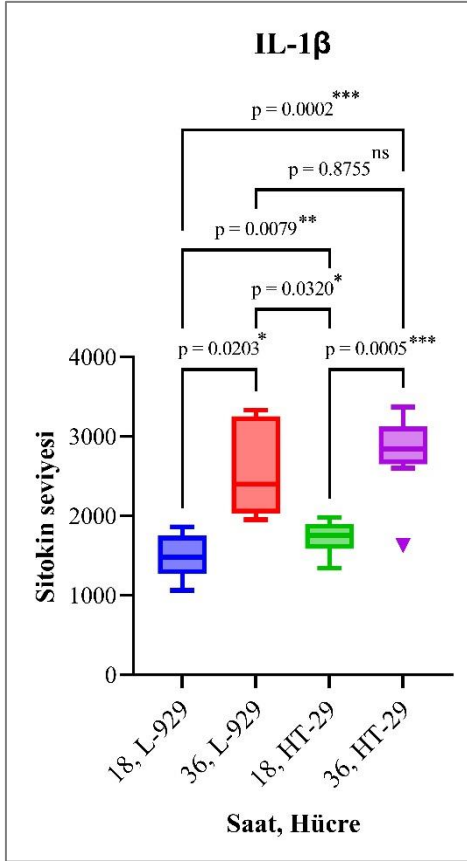


Şekil 4.12. L929 hücre hattında 18 ve 36 saat uygulamada IL-1 $\beta$  sitokin seviyesi



Şekil 4.13. HT-29 hücre hattında 18 ve 36 saat uygulamada IL-1 $\beta$  sitokin seviyesi

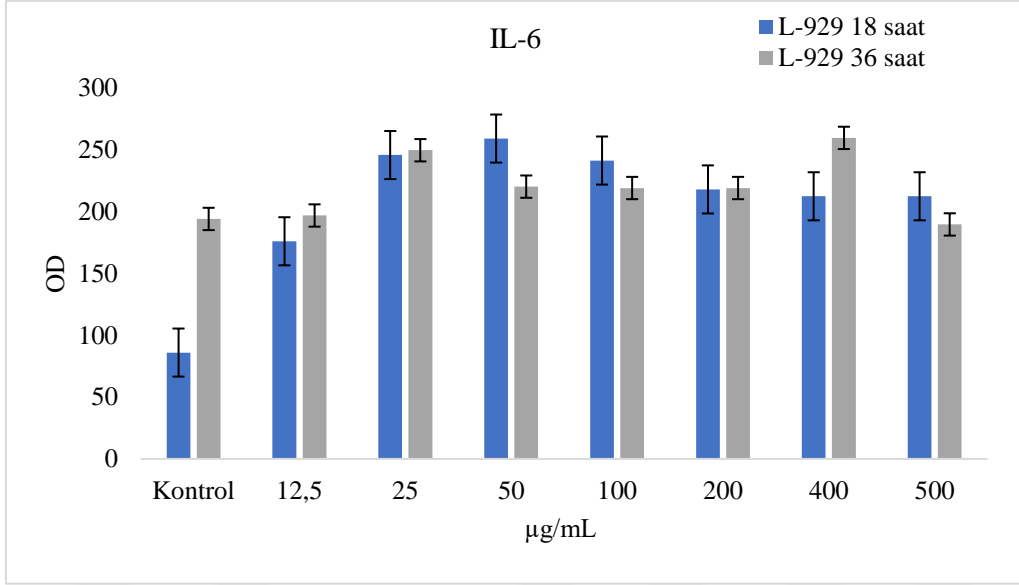
CM $\beta$ -gluM16 biyopolimerinin IL-1 $\beta$  sitokin seviyesi üzerine etkisi istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.13'te verilmiştir. IL-1 $\beta$  için hem L-929 hem de HT-29 hücre hattında 18 ve 36 saat uygulama süreleri arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p=0,0203$  ve  $p=0,0005$ ). L-929 hücre hattının 18 saat uygulaması ile HT-29 hücre hattının 18 saat uygulamasının arasında anlamlı fark bulunurken ( $p=0,0079$ ) 36 saat uygulama süreleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p=0,8755$ ).



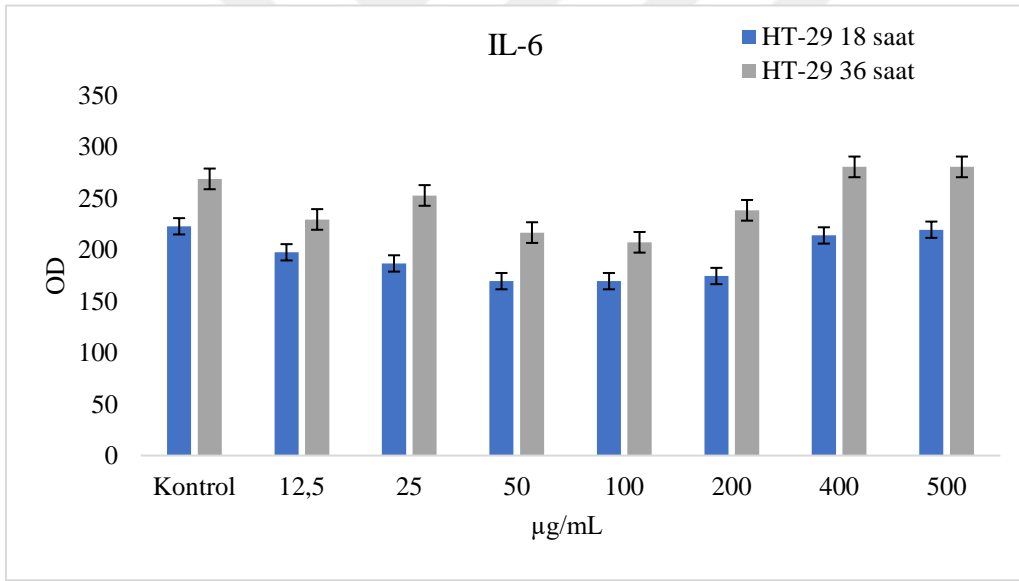
Şekil 4.14. CM $\beta$ -gluM16 biyopolimerinin IL-1 $\beta$  sitokin seviyeleri üzerine etkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi (ns (non-significant): istatistiksel olarak anlamlı bir fark yok)

#### 4.8.3. IL-6

Kit standartından elde edilen formül ile CM $\beta$ -gluM16'nın OD değerleri hesaplanarak sonuçlara ait grafikler Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te verilmiştir. IL-6 pro-inflamatuvar sitokini, L929 sağlıklı fibroblast hücre hattında CM $\beta$ -gluM16 ile 18 saat muamele sonucunda 50  $\mu$ g/mL-500  $\mu$ g/mL dozları arasında azalış göstermiştir. HT-29 hücre hattında ise 12,5-200 arasında azalma varken devamında artış gözlenmiştir. Her iki hücre hattında da 36 saat uygulamalarında dozlar arası tutarlılık görülmemiştir.

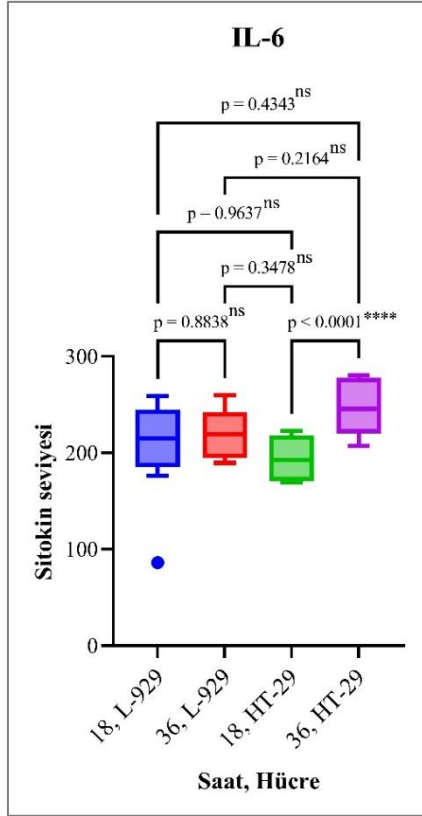


Şekil 4.15. L929 hücre hattında 18 ve 36 saat uygulamada IL-6 sitokin seviyesi



Şekil 4.16. HT-29 hücre hattında 18 ve 36 saat uygulamada IL-6 sitokin seviyesi

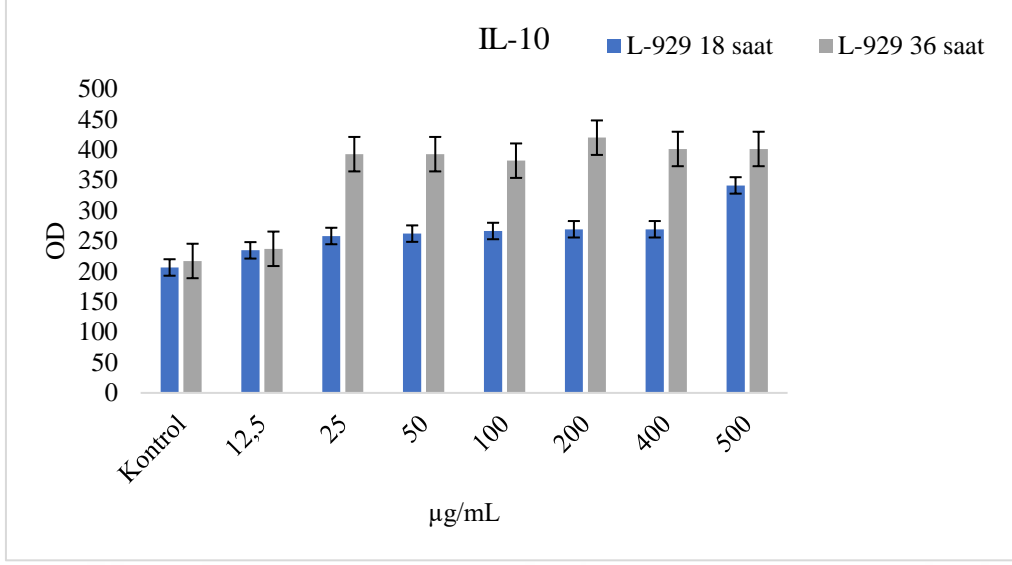
CM $\beta$ -gluM16 biyopolimerinin IL-6 sitokin seviyesi üzerine etkisi istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.16'da verilmiştir. IL-6 sitokini için L-929 hücre hattının 18 ve 36 saat uygulama süreleri arasında anlamlı fark bulunmazken ( $p=0,8838$ ) HT-29'da anlamlı fark bulunmuştur ( $p<0,0001$ ). L-929 ve HT-29'un 18 ve 36 saat uygulama süreleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır ( $p=0,9637$  ve  $p=0,2164$ ).



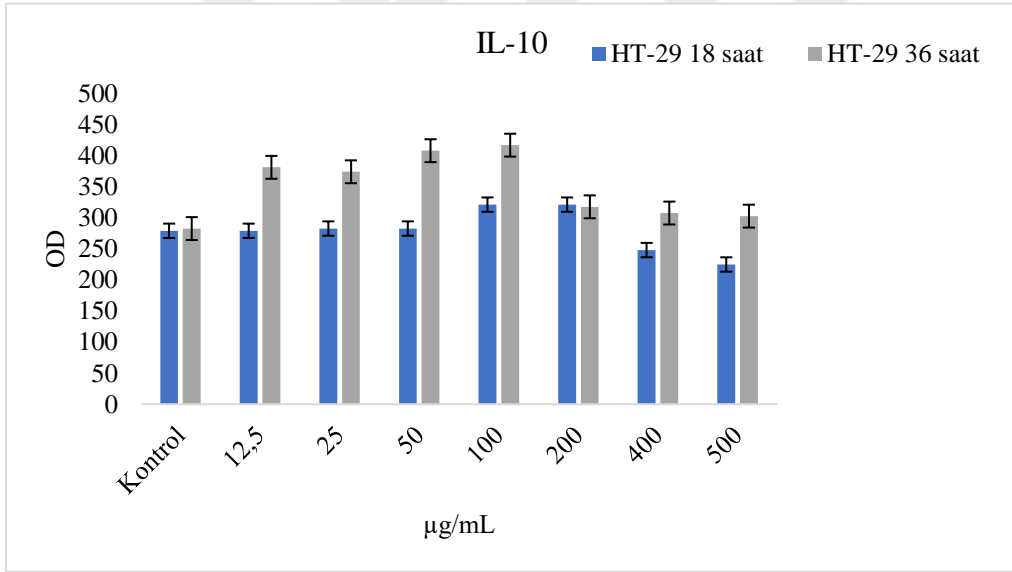
Şekil 4.17. CMβ-gluM16 biyopolimerinin IL-6 sitokin seviyeleri üzerine etkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi (ns (non-significant): istatistiksel olarak anlamlı bir fark yok)

#### 4.8.4. IL-10

Kit standartından elde edilen formül ile CMβ-gluM16'nın OD değerleri hesaplanarak sonuçlara ait grafikler Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'de verilmiştir. IL-10 anti-inflamatuar sitokini, L929 sağlıklı fibroblast hücre hattında CMβ-gluM16 ile 18 saat muamele sonucunda uygulanan tüm dozlarda artış gözlenirken; 36 saat uygulamasında 12,5-200 µg/mL dozlarında anti-inflamatuar etki gözlenmiştir. 200 µg/mL dozundan sonra ise düşüşe rastlanmıştır. IL-10 anti-inflamatuar sitokini, HT-29 hücre hattında CMβ-gluM16 ile 18 saat muamele sonucunda 12,5-200 µg/mL dozlarında artış gözlenirken; 200 µg/mL dozundan sonra anti-inflamatuar etkide düşüş gözlenmiştir. 36 saat uygulamasının sonuçlarında ise 12,5-100 µg/mL dozları arasında anti-inflamatuar etkide artış; sonraki dozlarda ise azalma olduğu bulunmuştur.

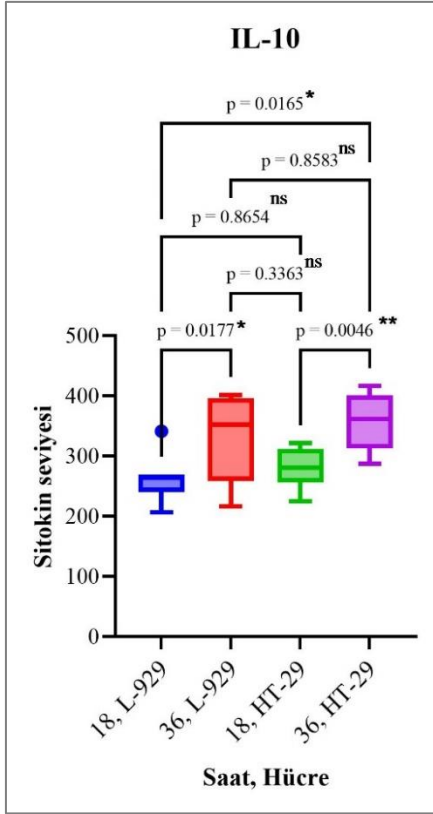


Şekil 4.18. L929 hücre hattında 18 ve 36 saat uygulamada IL-10 sitokin seviyesi



Şekil 4.19. HT-29 hücre hattında 18 ve 36 saat uygulamada IL-10 sitokin seviyesi

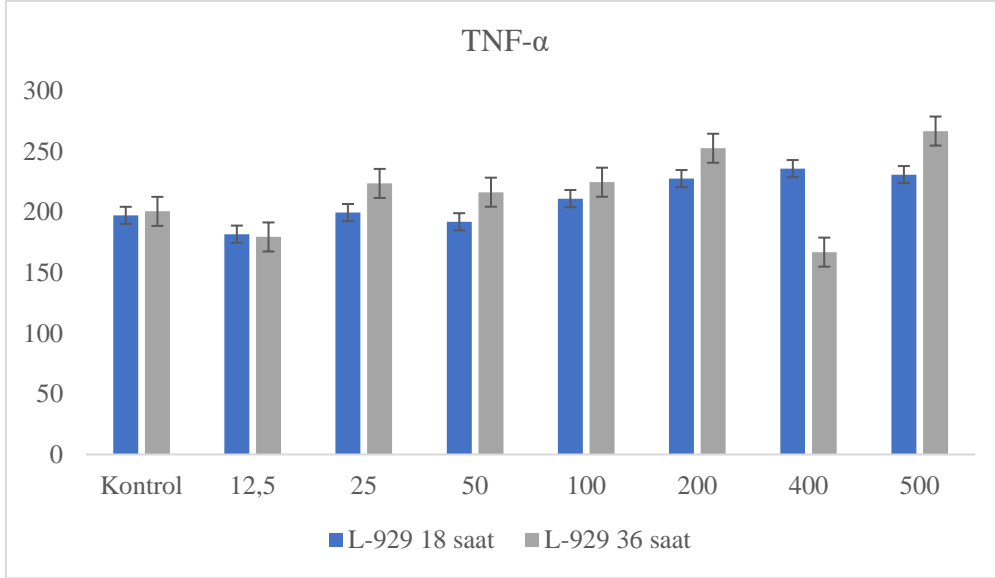
CM $\beta$ -gluM16 biyopolimerinin IL-10 sitokin seviyesi üzerine etkisi istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.19'da verilmiştir. IL-10 sitokini için hem de HT-29 hücre hattında 18 ve 36 saat uygulama süreleri arasında anlamlı bir fark bulunurken ( $p=0,0170$  ve  $p=0,0046$ ) L-929 ve HT-29'un 18 ve 36 saat uygulama süreleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır ( $p=0,8654$  ve  $p=0,8583$ ).



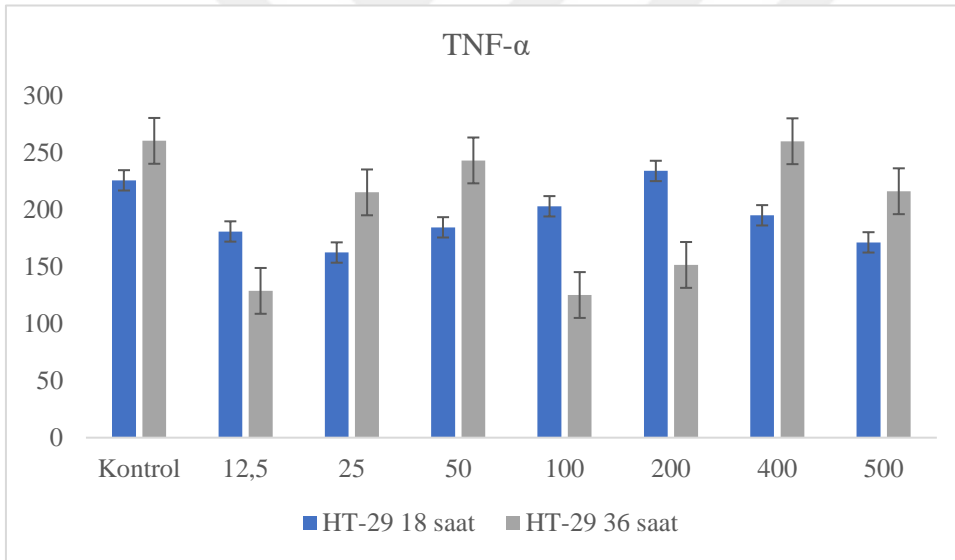
Şekil 4.20. CM $\beta$ -gluM16 biyopolimerinin IL-6 sitokin seviyeleri üzerine etkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi (ns (non-significant): istatistiksel olarak anlamlı bir fark yok)

#### 4.8.5. TNF- $\alpha$

Kit standartından elde edilen formül ile CM $\beta$ -gluM16'nın OD değerleri hesaplanarak sonuçlara ait grafikler Şekil 4.20 ve Şekil 4.21'de verilmiştir. TNF- $\alpha$  inflamatuvar sitokini, L929 sağlıklı fibroblast hücre hattında CM $\beta$ -gluM16 ile 18 saat muamele sonucunda 12,5-200  $\mu$ g/mL dozları arasında azalmış, 200-500  $\mu$ g/mL arasında ise artmıştır. 36 saat uygulamasında 12,5-100  $\mu$ g/mL dozlarında azalmış, 100-500  $\mu$ g/mL dozları arasında ise artmıştır. TNF- $\alpha$  inflamatuvar sitokini, HT-29 hücre hattında CM $\beta$ -gluM16 ile 18 saat muamele sonucunda tüm dozlarda azalmış; 36 saat uygulamasında ise 12,5-200  $\mu$ g/mL dozları arasında azalmış 400 ve 500  $\mu$ g/mL dozunda ise yeniden artmıştır.

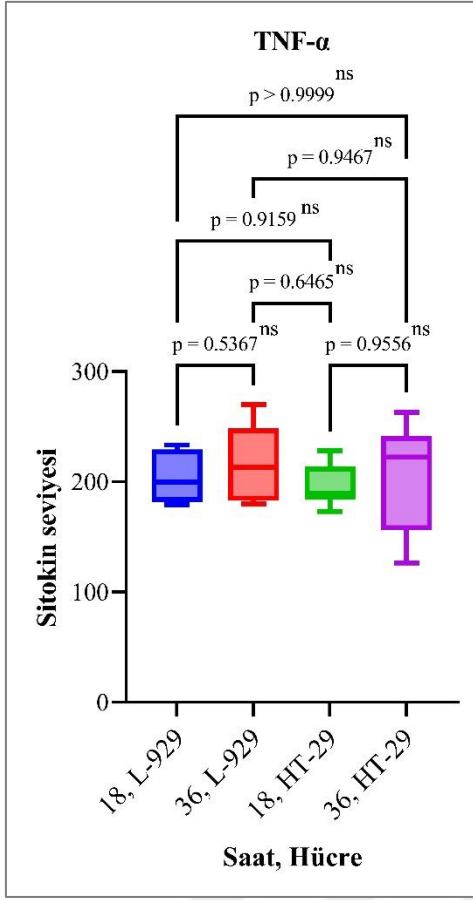


Şekil 4.21. L929 hücre hattında 18 ve 36 saat uygulamada TNF- $\alpha$  sitokin seviyesi



Şekil 4.22. HT-29 hücre hattında 18 ve 36 saat uygulamada TNF- $\alpha$  sitokin seviyesi

CM $\beta$ -gluM16 biyopolimerinin IL-10 sitokin seviyesi üzerine etkisi istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.22'de verilmiştir. TNF- $\alpha$  sitokini için hücre hatları ve uygulama saatleri arasında hiçbir anlamlı farka rastlanmamıştır.



Şekil 4.23. CM $\beta$ -gluM16 biyopolimerinin TNF- $\alpha$  sitokin seviyeleri üzerine etkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi (ns (non-significant): istatistiksel olarak anlamlı bir fark yok)



## 5. TARTIŞMA

Probiyotiklerin konakçı sağlığı üzerinde olumlu etkileri olan canlı mikroorganizmalar olduğu bilinmektedir. Birçok faydasının yanı sıra, son yıllarda probiyotiklerin kullanımı ile ilgili bazı dezavantajlar doğmuştur. Bu dezavantajlardan biri işlenme ve depolanma açısından endüstriyel alanda zorluk yaratması diğeri ise yaşlı, bağışıklığı oldukça düşük, gastrointestinal mukozası anormal bariyere sahip kişiler gibi risk altındaki bireylerde canlı mikroorganizma kullanımının güvenli olmadığıdır. Bu dezavantajlar sonucunda paraprobiyotik ve postbiyotik gibi canlı olmayan takviyelere olan ilgi artmıştır. Paraprobiyotikleri “bireyin sağlığı üzerinde olumlu etkilere sahip olan inaktive mikrobiyal hücreler” olarak tanımlamak mümkündür. Paraprobiyotiklerin sahip oldukları immünmodülatör, anti-inflamatuvar, anti-oksidan ve anti-proliferatif etkileri, onları oldukça kullanıma uygun ajanlar haline getirerek fonksiyonel gıda ve nutrasötik sektöründe oldukça önem kazanmalarına sebep olmuştur (Siciliano, Reale, Fiorella Mazzeo, ve diğeri, 2021b).

Paraprobiyotiklerin konakçı sağlığı üzerindeki etki mekanizmasının probiyotiklerin mekanizmasına benzer şekilde hücre yüzeyinde yer alan peptidoglikan, teikoik asit, polisakkarit, yüzey proteinleri vb. gibi moleküllerin konak-paraprobiyotik arasındaki etkilere aracılık ettiği bilinmektedir. Paraprobiyotiklerin literatürde yer alan bir diğer avantajı ise antibiyotik ve antifungallarla birlikte uygulanması sonucu herhangi bir biyoaktivite kaybı gözlenmemesidir (de Almada, Almada, Martinez ve Sant’Ana, 2016). Paraprobiyotik içeren gıdaların lojistik koşullarından daha az etkilenmesi sebebiyle daha uzun raf ömrü olduğu da yine probiyotiklere kıyasla kullanım avantajını arttırmaktadır. Probiyotik bir mayanın hücre duvarının fiziksel ve kimyasal işlemler ile parçalanması sonucu elde edilen beta glukan biyopolimerinin avantajlı kullanım alanlarına sahip bir paraprobiyotik adayı olabileceği düşünülmüştür. Bu sebeple bu tez çalışmasında probiyotik *Pichia kudriavzevii* M16 maya suşunun hücre duvarından ekstrakte edilen beta glukan biyopolimerinin biyolojik aktivitelerini belirlemek amacıyla çalışmalar yapılmıştır.

Mayaların hücre duvarlarında bulunan  $\beta(1,3)$  ve  $\beta(1,6)$  bağlı  $\beta$ -glukanlar, birçok biyoaktiviteye sahiptir. Çeşitli kaynaklardan elde edilen mayalar ve onların hücre duvarından ekstrakte edilen  $\beta$ -glukanlar üzerine çalışmaların yapılması sahip oldukları biyoaktivitelerin belirlenmesi için önem teşkil etmektedir. Mayaların hücre duvarından  $\beta$ -

glukan ekstrakte etmekte kullanılan birçok farklı metot bulunmaktadır (Liu ve diğeri, 2008); (Magnani ve diğeri, 2009); (Jaehrig, Rohn, Kroh, Fleischer ve Kurz, 2007). Ekstraksiyonun ilk aşaması, hücre duvarının zayıflatılması ve parçalanmasını sağlayan otoliz aşamasıdır. Bu amaç için, yüksek sıcaklıkta sodyum veya potasyum hidroksit kullanılabilir. Hücre duvarındaki bir diğer bileşik olan mannoproteinlerin,  $\beta$ -glukandan ayrıştırılması aşamasında ise sodyum fosfat tamponu ve cam boncuklar kullanılarak yüksek ısı ve basınçta otoklav işlemi uygulanarak yapılmaktadır. Bu uygulama sonucu moleküller arası bağlar zayıflar, mannoproteinler uzaklaştırılır sonra kalan  $\beta$ -glukanlar şişer. Ardından sonikasyon işlemi ile hücre duvarı daha da zayıflatılır. Kalan lipidlerin uzaklaştırılması, proteinlerin daha kolay parçalanması için önem teşkil etmektedir. Reflüks cihazında izopropil alkol organik çözücüsü ile 2 saat boyunca muamele edilerek lipitler uzaklaştırılır.  $\beta$ -glukanların içerdikleri protein miktarları fonksiyonel özellikleri üzerinde etkili olduğundan uzaklaştırılması gereklidir ve proteinlerin uzaklaştırılmasında kullanılan en yaygın metot enzim metodudur. Bu amaçla örneklerden proteinlerin arındırılmasında protomex enzimi 55°C sıcaklıkta ve 7,5 pH'de 5 saat muamelesi kullanılır (Liu ve diğeri, 2008).

Ekstraksiyonu tamamlanan biyopolimerin biyoaktivitesini belirlemek için yapılacak testlerde maddenin çözünürlüğü büyük önem taşımaktadır. Tam olarak çözünmeyen maddenin biyoaktivite testlerinin doğru sonuç vermesi beklenemez. Bu sebeple elde etmiş olduğumuz biyopolimere karboksimetilasyon uygulanarak çözünür hale getirilmiştir. Bitki ve mantarların hücre duvarından ekstrakte edilen doğal polisakkaritler, toksik olmamaları, yan etkilerinin az olması, antioksidant, immünomodülatör, antikoagülant, antitümör, antiinflamatuar, antibakteriyel, antiviral özellikleri sebebiyle gıda ve farmasötik endüstrilerinde hammadde olarak yaygın bir kullanıma sahiptir. Fakat bazı polisakkaritlerin çözünmeyen formları bu endüstrilerde kullanıma uygun değildir. Bu sebeple kullanım alanları kısıtlanmaktadır. Bu sorunu aşmak amacıyla fiziksel, biyolojik ve kimyasal modifikasyonlar uygulanabilmektedir. Kimyasal modifikasyonlar doğal polisakkaritlerin suda çözünmeme sorununu aşmada kullanılan en yaygın yöntemlerden biridir. Kimyasal modifikasyonlar karboksimetilasyon, sülfatlama, fosforilasyon, asetilasyon, selenizasyon, alkilasyon gibi birçok yöntem içermekle birlikte bu tez çalışmasında karboksimetilasyon metodu kullanılmıştır (Z. Li ve diğeri, 2022). Karboksimetilasyon, polisakkaritin yapı zincirine karboksimetil grupların katılmasıdır. Karboksimetilasyon reaksiyonu, alkol grupları ile karboksimetil gruplarının eterleştiği Williamson eter sentezine dayanan bir

metottur (Chakka ve Zhou, 2020). D-glukanların yapısında meydana getirilecek olan kimyasal modifikasyonların çözünlüklerini artırması, biyolojik aktivitelerini de (antioksidan, antikoagulan, antitumor, antiviral aktivite gibi) arttırdığı bildirilmektedir (Francini Yumi Kagimura, da Cunha, Barbosa, Dekker ve Malfatti, 2014).

Birçok biyoaktiviteye sahip karbohidrat biyopolimerleri olan glukanlar, mikroorganizmalar (bakteri, mantar, alg ve bitkiler) tarafından üretilebilen bir polisakkarit grubudur. Kimyasal türevlendirme adını verilen karboksimetilasyon, sülfonasyon, fosforilasyon, asetilasyon gibi birçok modifikasyon ile glukanların çözünlüğü artırılarak biyolojik aktiviteleri artırılabilir (Synytsya ve diğerleri, 2009b). Ortaya çıkan bu çeşitlilik, D-glukan biyopolimerlerinin gıda, ilaç, biyomedikal, farmasötik ve kozmetik sektörlerinde antitumoral, antiviral, anti-inflamatuvar, immünregüle edici ajanlar gibi birçok potansiyel kullanım alanını arttırabilmektedir. (Fan ve diğerleri, 2012) yapmış oldukları çalışmalarda, elde ettikleri polisakkaritlerin antioksidan aktivitelerine bakmış olup, aynı polisakkaritlere karboksimetilasyon uyguladıktan sonra antioksidan aktivitelerinde ciddi artışlar olduğunu kanıtlamışlardır.

Doğal kaynaklardan izole edilen polisakkaritler suda çözünmezler. Fonksiyonel grupların (karboksimetil, sülfat ve fosfat) eklenmesi, onları çözünür hale getirir ve biyolojik aktivitelerini değiştirir. Literatürde bugüne kadar, karboksimetil polisakkaritlerin (CM-polisakkaritler) antioksidan yetenekleri hakkında oldukça fazla bilgi bulunmaktadır. Yenilebilir bir mantar olan *Entoloma lividoalbum*'dan elde edilen ve suda çözünür olan  $\beta$ -(1,3-1,6) -D-glukan oldukça güçlü bir antioksidandır (Machová, Čížová ve Bystrický, 2014). Benzer şekilde, arpadan elde edilen  $\beta$ -(1,3-1,4) -D-glukan da hidroksil radikaline (OH-) karşı güçlü antioksidan aktivite sergilemiştir (Kofuji ve diğerleri, 2012). CM-polisakkaritler, çeşitli uygulamalarda doğal antioksidanlar olarak kullanım potansiyeline sahiptir. Örneğin, CM-kitosan, gıda endüstrisinde şeftali meyvesinin antioksidan ve koruyucu kaplaması olarak kullanılmıştır (Elbarbary ve Mostafa, 2014). Ayrıca, kitosana uygulanan karboksimetilasyon sonucunda safra asitlerini bağlama yeteneğinin de arttığı görülmüştür. Bu özellik CM-kitosanın ilaç endüstrisinde kullanım potansiyelini arttırdığı rapor edilmiştir (Zhao, Huang, Hu, Mao ve Mei, 2011). Kagimura ve diğerleri (2015), yapmış oldukları bir çalışmada, *Lasiodiplodia theobromae* adlı bir bitki patojeni tarafından üretilen ekzoselüler (1-6)- $\beta$ -D-glukanın (LAS) karbosimetilasyonunu gerçekleştirerek (CMLAS) ardından LAS ve CMLAS'ın antioksidan aktivitelerini karşılaştırmışlardır. Sonuçlara göre, CMLAS

örneğin LAS örneğine göre daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği görülmüştür (Francini Y. Kagimura ve diğerleri, 2015a). Yapılan çalışma sonucu karboksimetilasyon işleminin biyopolimerin çözünürlüğünü artırarak antioksidan etkisini artırdığı, DPPH-radikal süpürücü ve ABTS-radikal katyon gidermede daha yüksek oranda süpürme aktivitesi gösterdiği ortaya koyulmuştur. Karboksimetillenmiş biyopolimerlerin biyomedikal ve ticari uygulamalara katkıda bulunarak biyolojik aktivite arttırmak amaçlı uygulanabilecek bir mekanizma olduğu da raporlanmıştır (Machová ve diğerleri, 2014) yapmış oldukları bir çalışmada *Saccharomyces cerevisiae*'dan  $\beta$ -glukan, dekstrandan  $\alpha$ -glukan elde etmiş ve  $\alpha$ ,  $\beta$  mannanların karboksimetil türevlerinin, önceki hallerine kıyasla reaktif hidroksil radikallerine (-OH) karşı daha güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır. Karboksimetilasyon işleminin reaktif hidroksil radikalleri eliminasyonunu arttırarak polisakkaritlerin antioksidan aktivitelerinin karboksimetilasyon dereceleriyle doğru orantılı olduğu da ortaya koyulmuştur. Sun ve ark. (2011), kitosan adlı  $\beta$ -(1-4) glukozidik bağlı D-glukozamin monomerlerinden meydana gelen polisakkaritin sudaki çözünürlüğünü arttırmak amacıyla polimer zincirlerine farklı fonksiyonel gruplar ekleyerek kimyasal türevlendirme gerçekleştirmişlerdir. Gerçekleştirdikleri karboksimetilasyon sonucunda elde ettikleri numune ile gerçekleştirmiş oldukları antioksidan deneyleri sonucunda farklı ikame gruplarının farklı antioksidan etkinlik gösterdiğini saptamışlardır (T. Xu ve diğerleri, 2011). Xu ve ark., (2018) *Ganoderma lucidum* polisakkaritini karboksimetilleyerek (C-GLP) elde edilen polisakkaritin antioksidan aktivitelerine bakılarak özellikle hidroksil radikalini süpürücü etkisi ve hidrojen peroksiti temizleme etkisinin arttığını gözlemleyerek gıda endüstrisi ve farmasötik sektöründe kullanılabilecek bir antioksidan ajan olduğu kanıtlamıştır (Cao, Xu, Liu, Huang ve Gu, 2018).

Bu tez çalışmasında, yapılan literatür taramalarında suda çözünür formdaki polimerlerin biyolojik aktivitelerinin yüksek çıktığı göz önünde bulundurularak, *Pichia kudriavzevii* M16 maya suşunun hücre duvarından elde edilen  $\beta$ -gluM16 biyopolimeri karboksimetilasyon kimyasal modifikasyonu uygulaması ile suda çözünür forma getirilmiştir. Daha sonra antioksidan, antibiyofil, antimikrobiyal, sitotoksikite, epitel hücrelere yapışma yeteneği, sitokin seviyelerinin ölçülmesi gerçekleştirilmiştir.

$\beta$ -glukanın moleküler yapısı ve biyo-fonksiyonları arasında bir ilişki mevcuttur. Bu ilişkinin anlaşılması ve analizi,  $\beta$ -glukanın gıda ve ilaç gibi endüstrilerde uygulanması için oldukça önem taşımaktadır (Du, Meenu, Liu ve Xu, 2019).  $\beta$ -glukanların fonksiyonları; kaynakları,

moleküler ağırlıkları ve yapısal özellikleri ile doğrudan bağlantılıdır. Moleküler ağırlık ve konformasyonel özellikler  $\beta$ -glukanın ekstraksiyon ve modifikasyon yönteminden etkilenmektedir.  $\beta$ -glukan üzerinde yapılan fiziksel ve kimyasal modifikasyonlar ile konformasyon ve birincil yapılarını etkileyerek onları morfolojik, reolojik, fonksiyonel özelliklere sahip formlara dönüştürmek mümkündür (Kaur, Sharma, Ji, Xu ve Agyei, 2020). Farklı kaynaklardan elde edilen  $\beta$ -glukanlar, glikozidik bağlar, dallanma dereceleri, moleküler ağırlık ve çözünürlük gibi birçok özellik bakımından farklılık göstermektedir. Tahıl kaynaklı  $\beta$ -glukanlar, ağırlıklı olarak herhangi bir  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6) bağı olmaksızın  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3) ve  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) glikozidik bağların karışımlarıdır, mayalardan elde edilen  $\beta$ -glukanlar 30 kalıntı düz zincire sahip lineer  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) omurgaların karışımlarıdır ve bunlara  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6) bağlantıları yoluyla bağlı uzun dallar bağlanır. Fungal  $\beta$ -glukanlar,  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6) aracılığıyla bağlanan kısa dallı zincirlere sahip düz  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) glukandan yapılmıştır. Bakteriye  $\beta$ -glukanlar (*Agribacterium bio-baris* gibi) düz ve dallanmamış  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3)-D-glukan omurgalarına sahipken, deniz yosunu  $\beta$ -glukanlar (kahverengi yosun, *Luminaria*'da bulunanlar gibi) tür bağımlıdır ve düz zincir  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) kalıntıları içerebilir veya yüksek düzeylerde  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6) dalları ile düz zincir omurgasını içerebilir. Sahip oldukları dallanma derecelerine, moleküler ağırlıklarına, yapısal özelliklerine göre de farklı biyolojik fonksiyonlar göstermektedirler (Kaur ve diğerleri, 2020). Bunun ardındaki mekanizmaların anlaşılabilmesi için  $\beta$ -glukanların yapısal analizi oldukça önemlidir (Han, Baruah, Cox, Vanrompay ve Bossier, 2020). Bu çalışmada hem ham beta glukanın hem de karboksimetilasyon yapılan beta glukanın karakterizasyonunda molekül ağırlıkları SEC (büyüklükçe ayırma kromatografisi) analizi ile, glukoz monomerleri arasındaki bağ yapısı NMR (nükleer manyetik rezonans) analizi ile ve yapısındaki fonksiyonel gruplar ise Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) ile ortaya koyulmuştur.

FT-IR spektroskopisinin biyopolimerlerdeki yapısal değişikliklerin izlenmesinde yararlı bir araç olduğu gösterilmiştir (Kačuráková ve Wilson, 2001). Glukanlara uygulanan karboksimetilasyon, yaklaşık 1600 ve 1421  $\text{cm}^{-1}$ 'de glukanın IR spektrumlarına hakim olan karboksilat anyonlarını moleküle sokmaktadır. FT-IR spektroskopisi uygulanan maya glukanlarında ise 1530  $\text{cm}^{-1}$ 'e kadar bant genişlemesi görülebilmektedir. Bunun nedenin bazı aromatik bileşenler (glukozamin ve N-asetil-d-glukozamin gibi) olabileceği bildirilmiştir (Šandula ve diğerleri, 1999).  $\beta$ -(1,3) ve/veya (1,6)-bağlı-d-glukanlar için karakteristik bantlar 1160, 1078, 1041 ve 889  $\text{cm}^{-1}$  olarak bilinmektedir (Šandula ve diğerleri, 1999).

Fourier transform kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi, biyopolimerin yapısal değişikliklerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.  $\beta$ -D-(1,3) ve (1,6) bağlı glukanlar için karakteristik bantlar 1160, 1078, 1041 ve 880  $\text{cm}^{-1}$  olduğu bilinmektedir.  $\alpha$ -D-(1,4) ve (1,6) bağlar için ise karakteristik bantlar yaklaşık olarak 1155, 1023, 930, 850 ve 765  $\text{cm}^{-1}$  olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, 1155/1160, 1023/1041, 1023/1160, 889/930, 765/889  $\text{cm}^{-1}$   $\alpha$  ve  $\beta$  bağlantıların belirlenmesinde kullanılan göstergelerdir. Glukanlar için birçok FT-IR bant frekansı olmakla birlikte; 1161, 1078, 1038, 890, 850, 783 bantları  $\beta$  glukanların tespitinde kullanılmaktadır. 950-1200  $\text{cm}^{-1}$  aralığındaki piklerin polisakkaritlerin varlığını gösterdiği bilinmektedir. 1150-1160  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pikler, glikozidik bağların gerilimini belirtirken  $\beta$ -glukanlar için diğer pikler 990, 1040, 1080, 1100, 1162, 1317, 1376  $\text{cm}^{-1}$  'de bulunabilmektedir (Synytsya ve diğerleri, 2009a)

C-O-C (karakteristik şeker grubu) simetrik gerilme titreşimleri 1075  $\text{cm}^{-1}$ ; asimetrik gerilme titreşimleri 1269 ve 1247  $\text{cm}^{-1}$ 'de görülür (Francini Y. Kagimura ve diğerleri, 2015b). Karboksimetilasyon, yapıldığı moleküle 1600 ve 1421  $\text{cm}^{-1}$ 'de karboksilat anyonlarını sokmaktadır. Maya  $\beta$ -glukanlarında 1530  $\text{cm}^{-1}$ 'e kadar bant genişlemesi gözlenmektedir. 1600, 1421, 1328, 1047 ( $\text{cm}^{-1}$ ) bantları da karboksimetillenmiş glukanlar için spesifik bantlardır (doi: 10.1016/S0144-8617(98)00099-X). Buna ek olarak 890, 1044, 1078, 1160  $\text{cm}^{-1}$  bantlarının mantar (1,3)-(1,6)- $\beta$ -D-glukanları için karakteristik olduğu bilinmektedir (Synytsya ve Novak, 2014).

Bu tez çalışmasında elde edilen biyopolimerin (CM $\beta$ -gluM16) fonksiyonel gruplarının belirlenmesi amacıyla FT-IR analizi yaptırılmıştır. Analiz sonucunda elde ettiğimiz pikler doğrultusunda 1059-1095-1286  $\text{cm}^{-1}$  bantlarının polisakkarit varlığını kanıtladığı görülmüştür. (1,3)-(1,6)- $\beta$ -D-glukanlarına spesifik bantlara yakın değerlerde alınan pikler de dallanma derecesini göstermektedir. Aynı şekilde karboksimetilasyona uğramış glukan örneklerine spesifik bantlara (1600, 1421, 1328, 1047  $\text{cm}^{-1}$ ) yakın alınan değerler (1416-1352-1059-1500-1352-1416-1059 $\text{cm}^{-1}$ ) biyopolimere uygulanan karboksimetilasyon işlemini kanıtlar niteliktedir. Mayaların farklı türlerinden elde edilen  $\beta$ -glukanlarda yapılan FT-IR analizlerinden elde edilen sonuçlar çalışmamıza benzerlik göstermektedir (Amer ve diğerleri, 2021); (Galichet, Sockalingum, Belarbi ve Manfait, 2001);(Karslıoğlu ve diğerleri, 2021).

Polisakkaritlerin molekül ağırlığı ile biyoaktivitesi arasında bağlantı olduğu bildirilmektedir (Li ve diğerleri, 2016). Hücre zarından kolayca geçebildiklerinden düşük moleküler ağırlıklı polisakkaritlerin biyolojik aktivitelerinin daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (S. Li ve diğerleri, 2016).  $\beta$ -glukanın yüksek moleküler ağırlığı ( $M_w$ ) onun hipokolesterolemik ve hipoglisemik özelliklerini etkilemektedir (Ege, Zeynep ve Köseoğlu, 2021).  $\beta$ -glukanın moleküler ağırlığını belirlemede farklı yöntemle kullanılmakla birlikte bu tez çalışmasında boyut dışlama kromatografisi (SEC) kullanılmıştır.  $\beta$ -glukanın kimyasal modifikasyonu,  $M_w$ 'de düşüşe sebep olarak çözünürlükte artış sağlamaktadır. Gıda endüstrisinde düşük  $M_w$ 'ye sahip  $\beta$ -glukanın kullanım için daha uygun olduğu bildirilmiştir (Du ve diğerleri, 2019). Bu tez çalışmasında *P. kudriavzevii* M16 suşundan ekstrakte edilen  $\beta$ -glukanın moleküler ağırlığının  $M_w=232,013$  kDa olduğu bulunmuştur. Literatür taramaları sonucunda *P. kudriavzevii* türünden elde edilen  $\beta$ -glukanın moleküler ağırlıklarının belirlenmesine ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır. *Saccharomyces cerevisiae* mayasından ekstrakte edilen  $\beta$ -glukanın moleküler ağırlığının incelendiği bir çalışmada, SEC analizi ile dekstran standardı kullanılmış ve  $\beta$ -glukanın moleküler ağırlıkları 279,000-175,000 kDa aralığında bulunmuştur (Khan ve diğerleri, 2016). Sandula ve diğerleri (1999) tarafından yapılan bir çalışmada karboksimetillenmiş glukan polimerinin moleküler ağırlığı 220 kDa olarak bulunmuştur (Şandula ve diğerleri, 1999). Yulaftan ekstrakte edilen  $\beta$ -glukanın moleküler ağırlığının SEC analizi ile 68,000-130,000 kDa olarak bulunmuştur (Yun, Lee, Mi ve Hyeon, 2006). Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar, araştırmacıların sonuçları ile benzer bulunmuştur.

Serbest radikaller, diğer moleküllerle olan kimyasal reaksiyonlara karşı kararsız ve aktif eşlenmemiş elektronlara sahip atomlar, moleküller veya iyonlardır. Serbest radikallerin vücutta birikimi hücrelerde stres yaratarak oksidatif hasara dolayısıyla doku hasarı ve organlarda fonksiyon kaybına sebep olmaktadır. Ayrıca hücresel oksidatif hasarın; yaşlanma, artrit, karsinogenez, amfizem, siroz ve ateroskleroz gibi patolojik ve biyolojik süreçlerle ilişkili olduğu bilinmektedir (Lin ve Yen, 1999). Serbest radikallerin gideriminde rol alan bileşiklere ise antioksidanlar adı verilmektedir. Butile hidroksianisol (BHA) ve Butile hidroksitoluen (BHT) gibi çok yaygın kullanım alanına sahip sentetik antioksidanların istenmeyen bazı toksisite ve toksisitenin sebep olduğu kanserojen etkileri olduğundan dolayı, gıda ve ilaç endüstrilerinde sentetik antioksidanlara alternatif olarak toksik olmayan doğal antioksidanlar aranmaktadır (J. H. Li, Miao, Wu, Chen ve Zhang, 2014). Mikroorganizmaların hücre duvarında yaygın bulunan polisakkaritlerin serbest radikallerin

gideriminde önemli bir rol aldığı ve organizmayı oksidatif stresten koruduğu bildirilmiş ve beta glukanın kaynağına göre antioksidan aktivitesinin farklılık gösterdiği rapor edilmiştir (Yihai Wang, Xiang, Wang, Tang ve He, 2013).

Doğal antioksidanların sentetik antioksidanlara göre daha tercih edilir hale gelmesinin sebebi güvenilir olması ve istenmeyen yan etkilere sahip olmamasıdır. Antioksidanlar ve özellikle de doğal kaynaklardan elde edilen antioksidan etkili moleküller, canlı organizmaları reaktif oksijen türlerinin (ROS) saldırısından dolayısıyla hücreleri de oksidatif stresten koruyabildikleri ve bu şekilde çeşitli dejeneratif hastalık riskini azaltabildikleri için büyük ilgi görmektedir (Jaehrig ve diğerleri, 2007). Yüksek oranda antioksidan aktiviteye sahip polisakkaritlerin çoğunun aynı zamanda anti-aging, immün regülasyon ve anti-tümör etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Z. Wang ve diğerleri, 2020). Probiyotik mikroorganizmalardan çeşitli ekstraksiyon yöntemleri ile izole edilen ekzopolisakkaritler; süperoksit anyon ve hidrojen peroksitin parçalanması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) azaltılması ve metal şelatlama aktiviteleri göstererek ortamda antioksidan etki göstermektedirler. Antioksidan aktivite gösteren ekzopolisakkaritler gıda takviyesi veya doğrudan ilaç olarak kullanıma sunulmaktadır (Angelin ve Kavitha, 2020).

Beta glukun serbest radikal süpürücü aktivitesi ile antioksidan etki göstererek hücrelerdeki doğal metabolizma sonucu oluşan hasarı en aza indirmektedir. Serbest radikalleri söndürücü etkisi ile hareket edebilen moleküllerden hidrojen aktarmaktadır. Bu sayede oksidatif stresi baskılayarak antioksidan aktivite göstermektedir (Kofuji ve diğerleri, 2012).

Biyolojik aktivite belirleme çalışmalarında antioksidan aktivite, çok önemli bir parametredir.  $\beta$ -glukanların antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde birçok farklı yöntem kullanılmakla (Lei ve diğerleri, 2015); birlikte bu tez çalışmasında  $\text{CM}\beta\text{-gluM16}$ 'nın antioksidan aktivitesinin belirlenmesinde DPPH, süperoksit anyon ve hidroksil radikalini süpürme yetenekleri kullanılmıştır. Maya hücre duvarından izole edilen  $\beta$ -glukanlar suda çözünmeyen fraksiyon içerebilmektedir ve çözünmeyen glukanlar istenmeyen granülom oluşumuna neden olmaktadır (Francini Yumi Kagimura ve diğerleri, 2014). Bu tez çalışmasında, *P. kudriavzevii* M16 suşundan ekstrakte edilen  $\beta$ -glukanın yapılan denemelerde suda yeterince çözülmediği tespit edildiğinden çözünür özelliğe sahip olabilmesi içinde karboksimetilasyon işlemine tabii tutularak biyolojik aktiviteleri belirlenmiştir.

DPPH, *in vivo* ortamda çoğalmayan, antioksidan aktivite tayininde kullanılan hızlı, kolay, ucuz ve yapay bir serbest radikal bileşiktir. DPPH, tipik bir koyu mor renk ve 520 nm’de maksimum absorpsiyon ile karakterize edilen, kararlı halde bulunan bir organik nitrojen radikalidir. *in vitro* antioksidan aktivite tayininde DPPH radikalini süpürme yeteneği bir referans noktası haline gelmiştir. Bir hidrojen/elektron donörü (serbest radikal yakalayıcı antioksidan) varlığında absorpsiyon yoğunluğu azalarak elektron sayısına göre radikal solüsyonun rengi değişmektedir (Locatelli ve diğerleri, 2009). Tez çalışmasında, CM $\beta$ -gluM16 biyopolimerinin DPPH süpürme aktivitesi farklı derişimlerde (0,2-0,5-1-5-10-20-30-100 mg/mL) %75,13, %73,97, %70,13, %70,00, %75,03, %79,00, %91,00, %96,00 (sırasıyla) olarak bulunmuştur. Pozitif kontrol olarak askorbik asit ile kıyaslanmıştır. Diğer araştırmalara benzer şekilde CM $\beta$ -gluM16’nın DPPH radikalini giderme aktivitesi askorbik asitten (kontrol) düşük çıkmıştır. Yapılan literatür taramalarında maya hücre duvarından ekstrakte edilen beta glukanın DPPH radikalini giderme aktivitesi ile ilgili yalnızca iki çalışmaya rastlanılmıştır. (Dengiz, 2021) tarafından yapılan bir çalışmada, probiyotik bir maya suşu olan *Pichia kudriavzevii* M13 mayasının hücre duvarından  $\beta$ -glukan ekstrakte edilmiş ( $\beta$ -gluM13) ve farklı derişimlerde (0,2-0,5-1-5-10-20-50 mg/mL) DPPH giderici etkisine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlarda  $\beta$ -gluM13 biyopolimerinin %43-59 aralığında DPPH radikalini giderme etkisi olduğu görülmüştür.  $\beta$ -gluM13’ün en yüksek DPPH giderme etkisinin 5 mg/mL dozda %59 olduğu gözlenirken, bu tez çalışmasında kullanılan CM $\beta$ -gluM16 biyopolimerinin ise 5 mg/mL’de DPPH radikali giderme etkisi %70 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada kullanılan biyopolimerin etkisinin daha iyi çıkma sebebinin elde edilen beta glukana biyopolimerinin sudaki çözünürlüğünü arttırmak için yapılan karboksimetilasyon metodu olduğu düşünülmüştür (Avramia ve Amariei, 2021); (Khan ve diğerleri, 2016). *Saccharomyces cerevisiae*’den ekstrakte ettikleri  $\beta$ -glukan’ın antioksidan aktivitesini belirlemek amacıyla DPPH metodu uygulamıştır. Yapılan çalışma sonucu 5-10-20-30 ve 50 kGy dozlarında DPPH süpürme aktivitesi %17,34-45,79 aralığında bulunmuştur. *Poria cocos*’tan  $\beta$ -D-(1-3)-glukan elde edilen ve ardından karboksimetilasyon uygulanan karboksimetillenmiş beta glukana (CMP)’nin DPPH radikali süpürücü aktivitesinin 1,6 mg/mL derişimde %30,94 olduğu rapor edilmiştir (Bai ve diğerleri, 2019). Bir araştırmada, *Ganoderma lucidum* mantarından elde edilen  $\beta$ -glukanın DPPH süpürme oranı %40,3 olarak belirlenmiştir (Alzorqi, Ketabchi, Sudheer ve Manickam, 2016). *Dictyophora indusiata*’dan elde edilen 1 mg/mL’lik  $\beta$ -glukanın DPPH radikalini süpürme aktivitesi %50,27 olarak raporlanmıştır (Fan ve diğerleri, 2012). Bizim çalışmamızda elde etmiş olduğumuz CM $\beta$ -gluM16’nın 1 mg/mL’lik derişiminin DPPH süpürme oranı ise %70

olarak bulunmuştur. Çalışmamızda, maya glukaları ve karboksimetilasyon uygulanmış  $\beta$ -glukanlarla yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında CM $\beta$ -gluM16'nın DPPH radikali giderme etkisinin, dolayısıyla da antioksidatif etkisinin daha yüksek bir düzeyde olduğu görülmektedir. Bunun sebebinin, DPPH serbest radikalinin yapısındaki eşlenmemiş elektron çiftini CM $\beta$ -gluM16'nın yapısından elektron veya bir hidrojen atomu alarak eşlemesi ve kendini nötralize etmesinden (Liang ve Kitts, 2014) kaynaklandığı düşünülmektedir. Ek olarak, beta glukana uygulanan karboksimetilasyon modifikasyonu sonucu polisakkaritin yapısına eklenen grupların, hidrojen bağının daha zayıf ayrışma enerjisine yol açtığı ve bu yüzden polisakkarit türevlerinin hidrojen verme yeteneğini arttığı (D'Alessio, Di Donato, Piccoli ve Russo, 2001) düşünülmektedir.

Vücutta oksidatif strese sebep olan reaktif oksijen türleri arasında, hidroksil radikali (OH $\cdot$ ), en reaktif kimyasaldır ve makromoleküller üzerinde çok ciddi hasara yol açmaktadır. Karboksimetilasyon kimyasal modifikasyonuna uğramış polisakkaritlerin, hidroksil radikale karşı oldukça güçlü antioksidatif etkisi olduğu bildirilmektedir (Machová ve diğerleri, 2014). Bu tez çalışmasında karboksimetillenmiş bir polisakkarit olan CM $\beta$ -gluM16'nın hidroksil radikalini süpürücü aktivitesi tespit edilmiştir.  $\beta$ -glukanın hidroksil radikali süpürme aktivitesinin farklı  $\beta$ -glukan kaynakları (arpa, yulaf ve maya) arasında farklılık gösterdiğini bulmuştur. Özellikle arpadan ekstrakte edilen  $\beta$ -glukanın, en güçlü hidroksil radikali süpürme aktivitesini gösterdiğini, buna kıyasla siyah maya (*Aureobasidium pullulans* 'tan ekstrakte edilen) veya yulaf  $\beta$ -glukanlarının hidroksil radikali süpürme aktivitesinin düşük olduğunu bildirmişlerdir. %0,1 w/v  $\beta$ -glukanın ortamdaki hidroksil radikallerinin yaklaşık %60'ını temizlerken süpürme aktivitesinin  $\beta$ -glukan dozu ile doğru orantıda arttığı gözlenmiştir (Kofuji ve diğerleri, 2012). Botryosphaeran mantarından ekstrakte edilen  $\beta$ -glukanın hidroksil radikal süpürücü aktivitesinin 3 g/L dozunun %90,6 seviyede hidroksil radikalini süpürürken 3 g/L dozdaki ticari  $\beta$ -glukanın ise yaklaşık %14 süpürme aktivitesi olduğu bulunmuştur (Giese ve diğerleri, 2015). Galinari, Almeida-Lima, Macedo, Mantovani ve Rocha, (2018), yapmış oldukları çalışmada, probiyotik bir maya suşu olan *Kluyveromyces marxianus*'un hücre duvarından çeşitli yöntemlerle mannan ekstrakte ederek antioksidan özellikleri belirlenmiştir. Tüm  $\alpha$ -D-mannan fraksiyonlarının, doza bağlı bir şekilde hidroksil süpürme aktivitesi göstermekle birlikte en yüksek aktivitenin 2 mg/mL derişimde %57,86 olduğu raporlanmıştır.  $\beta$ -glukanların serbest radikalleri süpürme aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, Botryosphaeriaceae familyasına ait bir fungus olan *Botryosphaeria rhodina* tarafından

üretilen bir  $\beta$ -glukan'ın hidroksil radikaline karşı %90,6; süperoksit anyonuna karşı %37, hidrojen peroksit ve nitrik oksit radikaline karşı %90 süpürücü aktivite sergilediği dolayısıyla etkili antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Giese ve diğerleri, 2015). Bu tez çalışmasında, CM $\beta$ -gluM16 biyopolimerinin hidroksil radikal süpürücü etki farklı dozlarında %50,73 ile %69,65 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Çalışmamızda, maya glukanları ve karboksimetilasyon uygulanmış beta glukanlarla yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında (*Botryosphaeria rhodina* tarafından üretilen bir  $\beta$ -glukan hariç) CM $\beta$ -gluM16'nın hidroksil radikal süpürücü aktivitenin, dolayısıyla da antioksidatif etkisinin daha yüksek bir düzeyde olduğu görülmüştür.  $\beta$ -glukanın hidroksil radikal süpürme aktivitesi, bağlantı tipi, dallanma derecesi, moleküler ağırlık ve konformasyon dahil olmak üzere molekülün birincil yapısından etkilenmektedir (Kofuji ve diğerleri, 2012); (Machová ve diğerleri, 2014). CM $\beta$ glu-M16 üzerindeki karboksimetil gruplarının varlığının, hidroksil radikal süpürücü aktivite metodundaki Fenton reaktifi (demir (II) sülfat ve hidrojen peroksit arasında gerçekleşen reaksiyon) tarafından üretilen reaktif hidroksil radikallerinin ortadan kaldırılmasını belirgin şekilde arttırmıştır. Hidroksil radikallerinin hücreler üzerinde yaratmış olduğu olumsuz etki göz önüne alındığında, özellikle doğal ve yenilenebilir kaynaklardan bu zararlı molekülleri temizleme yeteneğine sahip bileşiklerin belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu doğrultuda, *Pichia kudriavzevii* mayasından elde edilen doğal bir bileşik olan CM $\beta$ glu-M16 biyopolimerinin hidroksil radikallerine karşı umut verici aktivite gösterdiği düşünülmüştür.

Süperoksit radikali ( $O_2\cdot$ ) hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin ( $O_2$ ) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşan bir bileşiktir. Reaktif oksijen türleri arasında, süperoksit anyonu, biyolojik makromoleküllerle reaksiyona girme potansiyeline sahip olan ve böylece doku hasarını indükleyen aktif bir serbest radikaldir (Çelik, 2018); (Scheibmeir ve diğerleri, 2005). Yapılan literatür taramalarında maya hücre duvarından ekstrakte edilen beta glukanın süperoksit radikal süpürücü aktivitesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. *Paenibacillus polymyxa* adlı bakteriden elde edilen, beta glukan bakımından zengin ekzopolisakkaritlerin antioksidan aktivitelerinin süperoksit anyon radikal süpürme aktivitesi ile tespit edildiği bir çalışmada süperoksit anyon radikal süpürme aktivitesi 0,1 mg/mL EPS'de %24,25 bulunurken, 1 mg/mL'lik EPS de %53,06'ya yükselmiştir (Hong ve Jung, 2014). Benzer şekilde bu tez çalışmasında kullanılan CM $\beta$ -gluM16'nın farklı dozlarının hepsi farklı oranlarda süperoksit radikal süpürücü aktivite göstermiştir. CM $\beta$ -gluM16'nın 0,2 mg/mL derişiminde süperoksit anyon giderme oranı

%45,17 iken doz artışına bağlı olarak en yüksek aktivite 100 mg/mL derişimde %76 olarak bulunmuştur. 0,2 mg/mL'de %45,17 süperoksit temizleme oranı varken 1 mg/mL derişimde bu yetenek %56,30'a çıkmıştır. Çalışmaların bizim çalışmamız ile uyumlu olduğu görülmektedir. Botryosphaeran mantarından ekstrakte edilen  $\beta$ -glukanın süperoksit radikalini süpürme aktivitesine bakılmış, 3 g/L'lik  $\beta$ -glukanın %14, ticari beta glukanın ise daha yüksek temizleme yeteneği gösterdiği (%37) bildirilmiştir (Giese ve diğerleri, 2015). Gram pozitif *Paenibacillus polymyxa* bakterisinden elde edilen farklı moleküler ağırlığa sahip iki  $\beta$ -glukanın (P-SD1 ve P-SD2) antioksidan aktiviteleri test edilmiştir. P-SD1 ve P-SD2 derişimleri 0,1 mg/mL'den 1 mg/mL'ye arttırıldığında, süperoksit anyon temizleme aktivitelerinin sırasıyla %24,25'ten %53,06'ya ve %30,46'dan %87,34'e yükseldiği bulunmuştur (Hong ve Jung, 2014).  $\beta$ -D-glukanların serbest radikaller üzerindeki antioksidan ajan olarak kullanımına yönelik etki mekanizması henüz tam olarak anlaşılammakla birlikte  $\beta$ -(1-3),(1,6)-D-glukanların, serbest radikal süpürücü olarak hareket edebilen moleküllerin anomerik hidrojeninin aktivitesi ile ilişkili olduğu düşünölmektedir (Hong ve Jung, 2014).  $\beta$ -D-glukanların gibi ekzopolisakkaritlerin kesin antioksidan mekanizmalarının aydınlatılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Biyofilmler, bakteriler tarafından üretilen ekstrasellölar matris tarafından oluşturulan yüzeylere bağlanan bakteri topluluklarıdır (Hooshdar, Kermanshahi, Ghadam ve Khosravi-Darani, 2020). Biyofilm oluşturan patojenik bakteriler, onları gidermede kullanılacak olan antibiyotikler, dezenfektanlar ve kimyasallar gibi dış etkenlere oldukça dirençlidir. Biyofilm oluşumu tıp alanında kalp kapakçıkları, kalp pilleri, rahim içi cihazlar, kataterler, kontakt lensler olmak üzere birçok tıbbi implantlarda yaygın olarak gözlenirken endüstri alanında boru hatlarında da oldukça yıkıcı rollere sahiptir (Kannappan ve diğerleri, 2017); (Lenhart ve diğerleri, 2014). Biyofilmlerin biyokirlilik, korozyon, içme suyu kalitesini bozma gibi birçok olumsuz etkisi mevcuttur. Mevcut antibiyotiklerin toksisitesi, doğal anti-biyofilm ajanların keşfedilmesine olan ilgiyi arttırmıştır. Doğal ürünlerin anti-biyofilm etkileri, polimer matris oluşumunun inhibe edilmesi, hücre yapışmasının ve bağlanmasının baskılanması, ekstrasellölar matriks oluşumunun kesilmesi ve virölans faktörlerinin üretimini azalması, bunların sonucunda da quorum sensing (yeterli çoğunluğu algılama duyusu) ağı ve biyofilm gelişiminin engellenmesi aşamalarını içeren bir mekanizmaya sahiptir (Elisabeth ve Elisabeth, 2022). Uygun koşullar sağlandığında patojenik özellikte olan tüm bakterilerin biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. Biyofilm

oluşumu tıp, endüstri gibi birçok alan için istenmeyen, endişe veren bir durum olduğundan biyofilm inhibe edici, önleyici çeşitli kaynaklardan yeni biyofilm intihibitörlerine olan ilgi artmıştır (Srinivasan ve diğerleri, 2021). Antibiyofilm molekülleri, çeşitli bileşikler ve doğal kaynaklardan izole edilmektedir (Elisabeth ve Elisabeth, 2022).

Biyopolimerlerin, patojenik bakteriler tarafından oluşturulan biyofilm tabakasını inhibe etme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (Jagani, Chelikani ve Kim, 2009); (Kanmani ve diğerleri, 2011). Bu yaklaşımlardan yola çıkarak yapılan literatür taramaları sonucunda beta glukanlar ile ilgili bir çalışmaya rastlanırken ve karboksimetil beta glukanlarla yapılan herhangi bir antibiyofilm çalışmasına rastlanmamıştır. Biyopolimerlerin, patojenik bakteriler tarafından oluşturulan biyofilm tabakasını inhibe etme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (Kim, Oh ve Kim, 2009; Kanmani ve diğerleri, 2011). Bu yaklaşımlardan yola çıkarak yapılan literatür taramaları sonucunda beta glukanlar ile ilgili bir çalışmaya rastlanırken ve karboksimetil beta glukanlarla yapılan herhangi bir antibiyofilm çalışmasına rastlanmamıştır. (Anjugam ve diğerleri, 2018) tarafından yapılan bir çalışmada, *Portunus pelagicus*  $\beta$ -1,3 glukan bağlayıcı protein bazlı çinko oksit nanopartiküllerinin (Pp- $\beta$ -GBP-ZnONP) antibiyofilm aktivitesine bakılmıştır. Fakat bu çalışmada antibiyofilm yeteneği bizim çalışmamızdan farklı olarak CLSM (konfokal lazer tarama mikroskobu) ile gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışmasında bir biyopolimer olan CM $\beta$ -gluM16'nın *E. coli* ATCC 11229, *S. aureus* ATCC 25923 ve *P. aeruginosa* 29212 test bakterilerine karşı antibiyofilm etkisinin 0,2 mg/mL derişimde %65-77, 0,5 mg/mL derişimde %61-79, 1 mg/mL derişimde %57-80, 5 mg/mL derişimde %66-79, 10 mg/mL derişimde %67-79, 20 mg/mL ve 30 mg/mL derişimde %66-79 ve 100 mg/mL derişimde %66-78 arasında olduğu tespit edilmiştir. Biyofilm yapma yeteneğine sahip üç patojen bakteride farklı derişimlerde CM $\beta$ -gluM16'nın biyofilm inhibisyon etkileri değerlendirildiğinde, CM $\beta$ -gluM16 biyopolimerinin *E. coli* bakterisi üzerindeki biyofilm inhibisyon etkisinin 0,2 mg/mL derişimde en düşük olduğu saptanırken, en yüksek inhibisyon etkisinin 1 mg/mL derişimde %80 olduğu belirlenmiştir. *P. aeruginosa* bakterisi için biyofilm inhibisyon yüzdesinin 0,2 mg/mL derişimde %61 olduğu bulunurken denenen diğer 7 derişimde %71 olarak tespit edilmiştir. *S. aureus* bakterisi üzerindeki ise antibiyofilm etkinin 1 mg/mL derişimde en düşük inhibisyona (%57) sahip olduğu gözlenirken, 10 mg/mL derişimde en yüksek (%67) inhibisyona sahip olduğu belirlenmiştir. Sayem ve ark. (2011), yapmış oldukları çalışmada, *Bacillus licheniformis* SP1 ve SP3 suşlarından elde edilen filtratların *Escherichia coli* PHL-628 üzerinde biyofilm oluşumunu %50-65 oranında inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Bir

polisakkarit olan lauroyl glukozun, *P. aeruginosa* ve *P. aerofaciens* tarafından oluşturulan biyofilm tabakalarını sırasıyla %51 ve %57 oranda inhibe ettiği, *C. albicans* ve *C. lipolytica* biyofilmlerini de sırasıyla %45 ve %65 oranda inhibe ettiği raporlanmıştır (Dusane ve diğerleri, 2008). (Rani, Anandharaj ve David Ravindran, 2018) saflaştırılmış EPS'nin antibiyofilm aktivitesini, gıda kaynaklı *E. coli* MTCC 2622, *Listeria monocytogenes* MTCC 657, *S. aureus* MTCC 3160 ve *Enterococcus faecalis* MTCC 439 patojenleri kullanarak gösterdikleri çalışmada, antibiyofilm aktivitesinin derişime bağılı olduğunu ve 4 mg/mL derişiminde *L. monocytogenes* MTCC 657'de (%56) maksimum inhibitör etkinin olduğunu göstermişlerdir. Farklı EPS örneklerinin üç patojenik suşu (*S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*) karşı biyofilm inhibisyonunun belirlendiğı bir çalışma da farklı dozların (1-2 mg/mL) biyofilmleri önlediğı bildirilmiştir. Biyofilm oluşumunun, test edilen tüm örnekler için 1 mg/mL'nin üzerinde sabit kaldığı, en yüksek inhibisyonun ise *Leuconostoc citreum*-BMS suşuna ait, 2 mg/mL derişime sahip EPS'nin *E. coli* (%61,5), *E. faecalis* (%53,4) ve *S. aureus* (%76,95)'a karşı olduğu bildirilmiştir. *Leuconostoc citreum*-BMS'den elde edilen EPS örneğı ise, 1 mg/mL'de *S. aureus* patojenine karşı en yüksek (%86,9) antibiyofilm aktivite göstermiştir (Abid ve diğerleri, 2019).). Bu tez çalışmasında CM $\beta$ -gluM16'nın antibiyofilm etkileri, literatürdeki diğer çalışmalar ile kıyaslandığında *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakterisi üzerindeki etkinin diğerlerine kıyasla daha yüksek olduğu gözlenirken, *S. aureus* bakterisi üzerinde antibiyofilm etkisinin diğer çalışmalara oranla daha düşük olduğu görülmüştür.

Biyofilm formasyonunu inhibe etmenin yolu olarak biyofilm oluşturan bakterilerin adezyonunu önleme, biyofilm oluşturan bakterilerin hayatta kalmasını inhibe etme ve biyofilm formasyonunu mekanik olarak bozmak gibi mekanizmalar öne sürülmüştür (Rendueles, Kaplan ve Ghigo, 2013). Polisakkaritler için ise biyofilm oluşumundaki bakteri kolonizasyonunu değiştirebildiğı, gen ekspresyonunu düzenleyebildiğı ve polimerler arasındaki etkileşimi inhibe edebildiğı bildirilmiştir (Rendueles, Kaplan ve Ghigo, 2013). Bu tez çalışmasında elde edilen CM $\beta$ -gluM16 biyopolimeri biyofilm oluşturma yeteneğinde olan patojen bakteri suşları ile uygun koşullarda inkübe edilmiş dolayısıyla oluşmuş bir biyofilm tabakasına değil, biyofilm oluşum aşamasında ortama dahil edilmiştir. Bu sebeple CM $\beta$ -gluM16'nın biyofilm oluşmasını önleme mekanizması patojenlerin biyofilm üretme aşamasındaki adezyon yeteneğini azaltmasından kaynaklanıyor olabileceğı düşünülmüştür.

CM $\beta$ -gluM16, 8 farklı derişimlerde (0,2-0,5-1-5-10-20-30-100 mg/mL) disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. Yapılan deneyde üç farklı kuyu açılmış olup kuyulardan birine CM $\beta$ -gluM16, birine  $\beta$ -gluM16'nın kaynağı olan *Pichia kudriavzevii* probiyotik mayası, diğerine ise mayanın kültür filtratı konulmuştur. Mayanın antimikrobiyal aktivitesi olmakla birlikte CM $\beta$ -gluM16'nın dozlarında antimikrobiyal bir etkinlik gözlenmemiştir. Bunun nedeninin CM $\beta$ -gluM16'nın polisakkarit yapıda olmasından ve yapısında bulunan şekerlerin, ortamdaki test patojen bakterileri tarafından karbon kaynağı olarak tercih edilebilmesinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Kahverengi alg olan *Sargassum* sp. den ekstrakte edilen  $\beta$ -glukanın (laminaran) Gram negatif (*Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*) ve Gram pozitif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) bakterilere karşı bakteriyostatik etki gösterdiği bildirilmiştir (Chamidah, Hardoko ve Prihanto, 2017). Monks ve diğerleri (2002), uygulanan ekstrakt konsantrasyonu ne kadar fazla ise, salınan antibakteriyel bileşiklerin sayısının o kadar fazla olduğu dolayısıyla bileşiğin kendi mekanizmasıyla bakteri hücrelerinin içine penetrasyonunun daha kolay olduğunu ve inhibisyon çapının da o kadar arttığını ifade etmişlerdir (Monks ve diğerleri, 2002).

Bu çalışmada, elde edilen doğal polisakkaritin gelecekte gıda, ilaç, kozmetik gibi sektörlerde kullanımının önünü açmak amacıyla sitotoksisite özelliklerini belirlemek hedeflenmiştir. CM $\beta$ -gluM16 biyopolimerinin L929 sağlıklı fibroblast hücreleri üzerinde farklı derişimlerde ve sürelerde sitotoksisitesi belirlenirken, HT-29 insan kolorektal adenokarsinoma hücreleri üzerinde ise anti-proliferatif etkileri tespit edilmiştir.

Kolon kanseri, sahip olduğu yüksek insidans ve mortalite sebebiyle en yaygın malign tümörlerden biri halindedir. Kemoterapi, kanser tedavisi için en yaygın kullanılan terapötik yöntemlerden biri olmakla birlikte şu anda kemoterapide kullanılan çoğu antikanser ilaç, normal hücreler üzerinde toksik etkiye sahiptir. İstenmeyen bu durum, hemopoetik baskılama ve immünotoksisite gibi çoklu organ toksisitesine neden olmaktadır (Ewens, Mihich ve Ehrke, 2005). Bu sebeple kanser tedavisinde kullanılacak antikanser ajanların belirlenmesine yönelik çalışmalar hızla devam etmektedir. Doğal kaynaklardan elde edilen geniş bir biyolojik aktivite yelpazesine sahip olan, özellikle anti-tümör, anti-proliferatif etkili polisakkaritler bu sayede daha da önem kazanmıştır (Ooi ve Liu, 2000). Polisakkaritlerin immün regülatör etkisi esas olarak iki yol içermektedir. Bunlardan biri, gastrointestinal mikroorganizmaların büyümesini teşvik etmek, bağırsak florasının oluşumunu düzenlemek

ve ekzojen patojenlerin bağışıklığını arttırmaktır. Diğer yol ise polisakkaritin doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinin fagositoz yeteneğini geliştirebilmesi, humoral bağışıklık aktivitesini yükseltebilmesi ve lenfositleri duyarlı hale getirebilmesidir (X. Gao ve diğerleri, 2021).

$\beta$ -glukanın önemli antiproliferatif/antikanser aktivitesi bugüne kadar birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir  $\beta$ -glukanların antitümör aktivitelerinin moleküler ağırlıkları ve sudaki çözünürlükleri ile doğrudan bağlantılı olduğu bilinmektedir. Genellikle suda çözünür formdaki  $\beta$ -glukanın daha yüksek antikanser aktiviteye sahip bir immünomodülatör olduğu kanıtlanmıştır (Choromanska ve diğerleri, 2015). Hücre yüzeyi reseptörleri tarafından tanınmasının ardından, doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinde sinyal iletimini aktive etmesi ve bağışıklık hücrelerinin fagositoz, antijen sunum hızı, ROS üretimi ve sitokin/kemokin salgılanması gibi faaliyetlerini arttırmasına yol açtığı bilinmektedir (R. Chen ve diğerleri, 2021). Bu sebeple, bu tez çalışmasında doğal bir kaynaktan (probiyotik maya) elde edilen polisakkarit yapıdaki doğal biyolojik modülatör olan beta glukan çözünürlüğünü arttırarak kullanılmış ve potansiyel bir terapötik ajan olarak kullanımının önünü açmak amacıyla çeşitli testler uygulanmıştır.

Yapılan sitotoksosite çalışmaları sonucunda CM $\beta$ -gluM16 uygulamalarının, HT-29 hücreleri üzerinde doza ve muamele sürelerine bağlı olarak %6-40 arasında değişen hücre ölümüne neden olduğu belirlenmiştir. Uygulanan 7 farklı derişimdeki (12,5-25-50-100-200-400-500  $\mu$ g/mL) CM $\beta$ -gluM16'nın 12, 18, 24 ve 36 saat uygulamalarında hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir. Elde ettiğimiz hücre canlılığı sonuçları, CM $\beta$ -gluM16'nın bahsi geçen HT-29 hücreleri üzerindeki doza bağlı inhibisyon etkilerini göstermektedir. Düşük doz ve muamele sürelerinde daha zayıf anti-proliferatif etki gözlenirken yüksek doz ve muamele sürelerinin sonunda daha yüksek anti-proliferatif etki gözlenmiştir. 500  $\mu$ g/mL CM $\beta$ -gluM16 dozunun 36 saat uygulamasında %40 hücre ölümü görülürken, 12,5  $\mu$ g/mL CM $\beta$ -gluM16 dozunun 12 saat uygulamasında %6 hücre ölümü görülmüştür. CM $\beta$ -gluM16 için, hücre canlılığının minimum olduğu, anti-proliferatif etkinin en iyi gözlemlenebileceği ideal dozun 500  $\mu$ g/mL, ideal muamele süresinin ise 36 saat olduğu tespit edilmiştir. Di ve diğerleri (2018), laktik asit bakterilerinden elde ettikleri EPS'nin HT-29 hücre hattı üzerindeki anti-proliferasyon aktivitesini kanıtlamak amacıyla yaptıkları bir çalışmada, hücre canlılığının 500  $\mu$ g/mL derişimde en yüksek inhibisyonu (%30) gösterdiğini rapor etmişlerdir. (Queiroz ve diğerleri, 2015) tarafından yapılan bir çalışmada, fungal kaynaklı ekzoselüler  $\beta$ -glukanların antiproliferatif etkileri MCF-7 meme kanseri hücre hattında MTT testi ile belirlenmiştir.

Elde edilen  $\beta$ -glukanların antiproliferatif etkisi zamana ve doza bağılı olarak değişmekle birlikte yüksek konsantrasyonlarda ( $>100 \mu\text{g/mL}$ ) bir plato gözlenmiştir. 100, 250, 500, 750 ve 1000  $\mu\text{g/mL}$  derişimde canlı hücre yüzdesinde bir değişim görülmezken (%59) 1500  $\mu\text{g/mL}$  derişimde 48 saatlik uygulama sonucunda kanserli hücrelerin yalnızca %22'sinin canlı kaldığı (%78 hücre ölümü) görülmüştür. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.942075> yapılan başka bir çalışmada ise maya kaynaklı  $\beta$ -1,3 glukanın rahim ağzı kanseri hücre hattı olan HeLa üzerinde antiproliferatif etkileri MTT testi ile değerlendirilmiştir. 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g/mL}$  derişimlerde  $\beta$ -glukan ile 24 saat muamele edilen HeLa hücrelerinin canlılığında önemli ölçüde düşüş gözlenmiştir. 50  $\mu\text{g/mL}$  dozdaki yaklaşık %85'e varan hücre canlılığının 200  $\mu\text{g/mL}$  dozunda %30'a kadar düştüğü gözlenmiştir. Bu durum, maya  $\beta$ -glukanının HeLa hücreleri üzerinde belirtilen dozlarda %70'e varan hücre ölümüne sebep olduğunu göstermektedir. Literatürdeki çalışmalar, hücrelere uygulanan yüksek derişim ve süredeki CM $\beta$ -gluM16 biyopolimerinin anti-proliferatif etkisini doğrular niteliktedir.

Çalışmamızda bazı kısıtlılıkları mevcuttur. 500  $\mu\text{g/mL}$  CM $\beta$ -gluM16'nın etkisi sadece HT-29 kanser hücreleri üzerinde test edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan CM $\beta$ -gluM16'nın diğer kanser hücre hatları üzerinde de etkileri olup olmadığı açık değildir. Güvenliğini değerlendirmek için CM $\beta$ -gluM16'nın toksisitesini normal, sağlıklı insan kolon hücreleri üzerinde çalışmak ve *in vivo* olarak test etmek gerekmektedir. Bu yönde yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. İdeal olarak görülen 500  $\mu\text{g/mL}$  derişimi nispeten yüksektir ve toksik etki yaratabilir. Bunu belirlemek amacıyla ise normal bir hücre hattı olan sağlıklı L929 fibroblast hücreleri ile çalışılmıştır.

Sağlıklı hücreler üzerinde toksik etki göstermezken tümörlü hücrelerin çoğalmasını seçici olarak inhibe eden bileşiklerin bulunması, bilim camiasında oldukça kritik bir öneme sahiptir. Filamentli mantarlardan ve özellikle de mayalardan elde edilen polisakkaritler, bu açıdan iyi derecede antiproliferatif özelliklere sahip moleküller olarak tanımlanmıştır (Borbély ve diğerleri, 2019). L-929 hücre hattı üzerinde yapılan sitotoksikite çalışmaları sonucunda, CM $\beta$ -gluM16 uygulamalarının 12. saat sonunda yapılan ölçümlere göre doza bağılı olarak %3-24, 18. saat sonunda yapılan ölçümlere göre %2-28, 24. saat sonunda yapılan ölçümlere göre %10-28, 36. saat sonunda yapılan ölçümlere göre ise %11-31 arasında değişen düşük oranlarda hücre ölümüne neden olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda, uygulamaların sitotoksik etkileri ISO 10993-5 standartlarına göre değerlendirilmiştir. ISO 10993-5 standartlarına göre sitotoksikite değerleri; hücre ölümü  $\geq$

%50 ise yüksek derecede sitotoksik etki, %50-21 aralığında ise orta derecede sitotoksik etki, %20-11 ise düşük derecede sitotoksik etki ve  $\leq$ %10 ise sitotoksik olmayan etki olarak değerlendirilir. Bu standartlar göz önüne alınarak ölüm oranının  $\leq$  %10 olması ve sitotoksik etkiye sahip olmaması adına kullanıma uygun dozların 12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'nin 12, 18 ve 24 saat uygulamaları olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda, yüksek derişim ve sürelerde dahi maddemizin %69 ve üzerinde hücre canlılığını koruduğu görülmüştür. Düşük derecede toksik etkiye sahip olan dozların ise 12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'nin tüm saatleri ve 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'nin 12, 18, 24 saat uygulamaları olduğu görülmüştür. Belirlenen bu süre ve dozda kullanıldığı takdirde CM $\beta$ -gluM16 biyopolimerinin toksisite açısından yüzde ölümlerinin dikkate değer olmadığı görülmüş olup, uygulamalarının biyogüvenli olarak kullanılabilceği saptanmıştır. *L. plantarum* suşundan elde edilen EPS'nin L6 sağlıklı fibroblast hücreleri üzerinde 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  derişimde uygulamasının %35 hücre ölümüne sebep olduğu bildirilmiştir (Dilna ve diğerleri 2015). (Y. Li ve diğerleri, 2018) yapılan bir çalışmada,  $\beta$ -glukanın C2C12 miyoblast kas hücrelerinde proliferasyonu belirlenmiştir. Yapılan MTT testi sonucu uygulanan  $\beta$ -glukanın 24 saat sonunda C2C12 kas hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olmadığı, aksine hücre çoğalmasını olumlu yönde etkilediği görülmüştür. Literatürdeki çalışmalar göz önüne alındığında, hücrelere uygulanan yüksek derişim ve süredeki CM $\beta$ -gluM16'nın düşük sitotoksisite etkisi bulgularımızı doğrulamaktadır.

Probiyotiklerin bağırsak mukozasına yapışması, enteropatojenlere karşı koruyucu bir role sahiptir. Bağırsak epiteline bakteriyel yapışma, ilk olarak hidrofobik etkileşimler olarak spesifik olmayan fiziksel bağlanma ve ardından belirli hücre duvarı bileşenleri tarafından yönlendirilebilmektedir. Bağırsak yüzeylerine bakteri yapışması, başlangıçta hidrofobik etkileşimler olarak spesifik olmayan fiziksel bağlanma ve ardından spesifik hücre duvarı bileşenleri tarafından ikinci bir yapışma aşaması ile yönlendirilebilir (Haddaji ve diğerleri, 2015).Bulgular, gıda bileşenlerinin, diyet liflerinin probiyotik bakterilerin *in vivo* yapışmasını etkilediğini göstermektedir (Celebioglu ve Svensson, 2018). Bu sebeple karbohidrat yapılı biyopolimer bir diyet lifi olan beta glukanın probiyotik bakterinin bağırsağa yapışma yeteneğini artırma üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla bu tez çalışmasında CM $\beta$ -gluM16'nın adezyon yeteneği belirlenmiştir.

Konağa yapışma (adezyon) yeteneği, immün sistemi düzenleyici etkileri, bağırsak bariyerini ve metabolik fonksiyonları uyarma sonucu geçici bir kolonizasyon ile sonuçlanabilecek

potansiyel probiyotik bakteriler için klasik bir seçim kriteridir. Son yıllarda yapılan çoğu çalışma, bağırsak mikrobiyotasının insan sağlığı üzerindeki önemini kanıtlamaktadır. Bağırsak mikrobiyomundaki disbiyozun inflamatuvar bağırsak hastalıkları, diyabet, obezite, metabolik bozukluklarla ilişkili olduğu bilinmektedir (Musso, Gambino ve Cassader, 2011). Probiyotiklerin bağırsak epitel hücrelerine bağlanması, enteropatojenlere karşı potansiyel bir koruyucu olarak rol oynamalarına sebep olabilir (Monteagudo-Mera, Rastall, Gibson, Charalampopoulos ve Chatzifragkou, 2019).

Laktik asit bakterilerinin (LAB), karbonhidratları fermentasyonu sonucu son ürün olarak laktik asit üreten, Gram pozitif, katalaz negatif, basil veya kok şeklindeki aerotolerant mikroorganizmalardır. Gıda, endüstri gibi birçok sektörde ciddi öneme sahip bir bakteri grubudur. Bu bakteri türünün cinsleri arasında probiyotik özellikte olan suşlar belirlenmiştir). Probiyotiklerin mikrobiyota üzerinde özellikle kolorektal kanser hastalarında tedavi edici özellikte ajanlar olduğu bilinmektedir (Mármol, Sánchez-de-Diego, Dieste, Cerrada ve Yoldi, 2017). Probiyotiklerin sahip oldukları apoptoz indükleyici ve antioksidant özellikler onların kolorektal kanser hastalığını önleyici bir ajan haline getirmektedir (Sah, Vasiljevic, McKechnie ve Donkor, 2014). Bakterilerin probiyotik olarak tanımlanabilmesi ve probiyotik işlevlerini göstermesi için bağırsak hücrelerinde kolonize olması, tutunma yeteneğine sahip olması gerekmektedir. Probiyotiklerin adezyon yeteneklerinin belirlenmesinde HT-29 insan kolorektal adenokarsinom hücre hattı sıklıkla kullanılmaktadır (Duary, Rajput, Batish ve Grover, 2011).

Yapılan bazı *in vitro* çalışmalar sonucunda bakteriyel ekzopolisakkaritlerin, laktik asit bakterilerinin bağırsak epiteline adezyon ve kolonizasyonunu olumlu yönde etkilediğini ortaya koyulmuştur (Fernandez de Palencia ve diğerleri, 2009). (J. Sun, Le, Shi ve Su, 2007); (Monteagudo-Mera ve diğerleri, 2019); (Nishiyama, Sugiyama ve Mukai, 2016).

Górska-Frczek ve ark. (2011), polisakkarit yapıları bileşiklerin bakterilerin mukus tabakasına olan adezyon yeteneğini etkileyebileceği bildirmişlerdir. Bir polisakkarit olan beta glukan bileşiğinin de adezyon yetenekleri üzerinde etkisi olup olmadığına dair literatürde sınırlı sayıda çalışma vardır (Górska-Fraczek ve diğerleri, 2013).

Probiyotik bakterilerin konakçı dokuya yapışması ve patojenlere karşı gösterdiği antagonizma, probiyotik adaylarını seçmede kullanılan oldukça yaygın bir yöntemdir

(Monteagudo-Mera ve diğeri, 2019). Probiyotiklerin bağırsak epiteline yapışma yeteneğini arttırmaya yönelik kullanılabilir potansiyel kombinasyonlar da bu sebeple oldukça önem taşımaktadır. Bu tez çalışmasında probiyotik bir bakteri olduğu bilinen *Lactobacillus plantarum* LP1 suşunun insan kolon hücresine (HT-29) adezyon yeteneği ve bu yeteneğe, ortama CMβ-gluM16 biyopolimerinin farklı derişimlerinin eklenmesiyle elde edilen sinbiyotiğin avantaj sağlayıp sağlamayacağı *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Dolayısıyla probiyotik bakteri ile karboksimetillenmiş beta glukanın sinerjistik etkisinin gözlenmesi amaçlanmıştır. HT-29 hücre hattının seçilme sebebi ise kullanılan *L. plantarum* LP1 probiyotiğinin gastrointestinal dengeden sorumlu bir probiyotik olmasıdır.

Hücre hattına probiyotik uygulaması ile adezyon yüzdesi %83, ADI değeri 566 olarak; 50 mg/mL CMβ-gluM16 içeren sinbiyotiğin uygulamasında adezyon yüzdesi %85, ADI değeri 883 olarak; 200 mg/mL CMβ-gluM16 içeren sinbiyotiğin uygulanmasında ise adezyon yüzdesi %89, ADI değeri 1140 olarak; 500 mg/mL CMβ-gluM16 içeren sinbiyotiğin uygulanmasında ise adezyon yüzdesi %92 olarak hesaplanırken, ADI değeri 1180 olarak hesaplanmıştır. Yapılan adezyon deneyi sonucunda HT-29 hücre hattı üzerinde probiyotiğin adezyon yeteneğinin, ortama sinbiyotik ilavesi sonucu arttığı gözlenmiştir. Probiyotiğin ve sinbiyotiğin farklı dozlarda ilavesi sonucu adezyon yetenekleri “iyi” olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar neticesinde, farklı dozlarda (50, 200, 500 mg/mL) CMβ-gluM16 ile *L. plantarum* LP1 suşunun kombinasyonları sonucu hazırlanan sinbiyotik uygulamaların, tek başına *L. plantarum* LP1 suşuna göre daha yüksek adezyon yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu durum, CMβ-gluM16'nın *L. plantarum* LP1 suşunun adezyon yeteneğini arttırdığını göstermektedir. Sinbiyotik uygulama sonucu, prebiyotiklerin probiyotik gelişimini stimüle edebilmektedir. CMβ-gluM16'nın, *L. plantarum* LP1 probiyotik suşunun gelişimini desteklediği için sinbiyotiğin probiyotiğe kıyasla daha yüksek adezyon yeteneğine sahip olduğu kanısına varılmıştır. Gupta ve Sharma, (2015) yapmış oldukları bir çalışmada, bir laktik asit bakterisi olan *Pediococcus pentosaceus* LB-CC ve *P. pentosaceus* LB-WC suşlarının gelişim esnasında ekzopolisakkarit ürettiklerini belirlemiş ve mide musin salgısına adezyon yeteneklerinin %68 ve %49 olduğunu, bununla birlikte bağırsak epitel hücrelerinin yüzeyine yüksek düzeyde adezyon yeteneği gösterdiğini bildirmişlerdir. *Ligilactobacillus salivarius* bakterisi ve aynı bakteriden elde edilen ekzopolisakkaritin (EPS) sinbiyotik uygulaması ile HT-29 insan kolorektal adenokarsinom hücre hattı üzerinde adezyon yeteneğinin değerlendirildiği bir çalışmada, *L. salivarius* BIS312 probiyotik uygulamasında adezyon yüzdesi ve indeksi (ADI) sırasıyla %93 ve 1883

olarak hesaplanırken *L. salivarius* BIS722 probiyotik uygulamasında %90 ve 1800 olarak hesaplanmıştır. Sinbiyotik uygulamada adezyon yüzdesi *L. salivarius* BIS312+EPS uygulamasında %96, ADI değeri 2100, *L. salivarius* BIS722+EPS uygulamasında adezyon yüzdesi %92 ve ADI değeri 1990 olarak hesaplanmıştır. Probiyotik uygulamalarına kıyasla sinbiyotik uygulamada adezyon yüzde ve indeksinde meydana gelen artış, ortama eklenen EPS'nin probiyotiğin epitel hücrelere yapışma kabiliyetini arttırdığı gösterilmiştir (Bikric ve diğerleri, 2022b). Bu tez çalışmasında sonuçlanan adezyon değişimi de bahsedilen çalışmayla örtüşür niteliktedir.

Beta glukanlar, sağlık açısından kanıtlanmış birçok avantajı olan ve insan vücudu tarafından üretilmeyen, diyet ile alınması gereken karbonhidratlardır. Oral yolla uygulanması gereken beta glukanların, özellikle maya beta glukanlarının diyetle alınmasının immün stimüle edici özelliği olduğu kanıtlanmıştır (Stier, Ebbeskotte ve Gruenwald, 2014). Bu sebeple bu tez çalışmasında elde edilen beta glukan biyopolimerinin (CM $\beta$ -gluM16) sitokin seviyeleri (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 ve TNF- $\alpha$ ) belirlenerek immün regülasyondaki rolünün belirlenmesi hedeflenmiştir.

Beta glukanların immün sistemi regüle edici özellikleri üzerine bugüne kadar birçok çalışma yapılmıştır (Kim, Hong, Kim ve Han, 2011); (Stier, Ebbeskotte ve Gruenwald, 2014); (Murphy, Rezoagli, Major, Rowan ve Laffey, 2020). Fagositoz, interlökin üretimi, antikor üretimi gibi birçok immünolojik etkiye sahip olan bu polimer COVID-19 gibi önemli hastalıklar için hayati önem taşımaktadır. Ikewaki ve diğerleri (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, *Aerobasidium pullulans* mayasından elde edilen  $\beta$ -glukanın, IL-8 üretimini arttırdığı, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  üretimi üzerinde uyarıcı etkisinin olmadığı, IL-6 seviyelerini düşürdüğü rapor edilmiştir. COVID-19 sonucu ortaya çıkan sitokin fırtınasında değerleri yükselen sitokin, IL-6 sitokindir.  $\beta$ -glukanın IL-6 seviyelerini düşürmesi onun sitokin fırtınasını azaltmada rol alabilecek bir ajan olduğunu kanıtlar niteliktedir (Şirinyıldız ve Mavi Bulut, 2022). Beta glukan IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımını baskımlarken; IL-10 gibi anti-inflamatuvar sitokinlerin ise salınımını arttırarak immün denge sağlayabileceği bu sebeple bu biyopolimerin gerek hastalık öncesi direnç gerekse hastalık sürecinde tedavi amacıyla immünoterapi ajanı olarak kullanılma potansiyeli bulunduğu bildirilmektedir (Gezginç ve diğerleri, 2022).

IL-1 $\beta$  pro-inflamatuar bir sitokindir. Johnson ve ark. (2009) *Agaricus blazei*  $\beta$ -glukanının sitokin salınımı üzerindeki etkilerini incelemişlerdir ((Johnson ve diğerleri, 2009). Yapılan deneyler sonucu IL-1 $\beta$  seviyelerinde azalma saptanmıştır. Bu tez çalışmasında da benzer şekilde L929 ve HT-29 hücre hatlarına farklı dozlarda CM $\beta$ -gluM16 uygulanmış ve uygulamalar sonucunda IL-1 $\beta$  seviyelerinde bazı doz ve sürelerde (HT-29 ve L929 hücre hattı, 18 saat uygulaması, 200-400-500  $\mu$ g/mL; HT-29 ve L929 hücre hattı, 36 saat uygulaması, 200-400-500  $\mu$ g/mL) düşüşe rastlanmıştır. IL-10 ise anti-inflamatuar bir sitokindir. Chen ve ark. (2013), yapmış oldukları bir çalışmada, hücreleri *in vitro* olarak 1,3- $\beta$ -glukan ile tedavi etmiş ve IL-10 anti-inflamatuar sitokininin seviyesinin daha önce yapılan diğer çalışmalar ile tutarlı olarak arttığını raporlamıştır ((Y. Chen ve diğerleri, 2013). Bu tez çalışmasında da benzer şekilde L-929 ve HT-29 hücre hatlarına farklı dozlarda CM $\beta$ -gluM16 uygulanmış ve anti-inflamatuar etki gözlenmiştir. IL-6 sitokin seviyelerinin ölçümünde ise uygulanan doz ve sürelerde kontrol grubuna göre azalmalar gözlenmiştir. TNF- $\alpha$ , makrofaj hücreleri veya aktif T hücreleri tarafından salınan proinflamatuar bir sitokindir. İnflamatuar bölgede makrofaj ve polimorfonükleer lökositlerin toplanmasına sebep olan bir ajandır. Young, Ye, Frazer, Shi ve Castranova, (2001), zymosan beta glukanı RAW hücreleri üzerinde, 100  $\mu$ g/mL dozda 7-12,5-40 saat boyunca maruz bırakılarak TNF- $\alpha$ 'nın üretimini arttırdığını görmüşlerdir (Young, Ye, Frazer, Shi ve Castranova, 2001). Bu tez çalışmasında ortama eklenen farklı dozlarda (12,5-500  $\mu$ g/mL) CM $\beta$ -gluM16 ilavesi ile TNF- $\alpha$  sitokin seviyelerindeki değişim tespit edilmiştir. Literatürde daha önce beta glukanın TNF- $\alpha$  üzerinde supresif özelliği olduğu bulunmuştur. *Agrobacterium* sp.'den elde edilen beta glukanın önemli bir proinflamatuar sitokin olan tümör nekroz faktörü alfa (TNF- $\alpha$ ) ekspresyonunu azalttığı belirtilmiştir (Hee JUNG ve diğerleri, 2007). Bu çalışmalar ile benzer olarak bu tez çalışması sonucunda da elde edilen beta glukanın (CM $\beta$ -gluM16) belirli doz ve saatlerde (L929 hücre hattının 18 saat uygulamasında 12,5-200  $\mu$ g/mL, 36 saat uygulamasında 12,5-100  $\mu$ g/mL; HT-29 hücre hattı için 18 saat uygulamasında tüm dozlar, 36 saat uygulamasında ise 12,5-200  $\mu$ g/mL) TNF- $\alpha$  üretimini baskıladığı bulunmuştur.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında yapılan çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde aşağıdaki çıkarımlar ve önerilerde bulunulmuştur;

1. Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan, peynirden izole edilen ve 18SrRNA analizi ile tanımlanmış probiyotik *Pichia kudriavzevii* M16 maya suşunun hücre duvarından  $\beta$ -glukan ekstrakte edilmiştir. Yapılan literatür taramalarında *Pichia kudriavzevii* mayasından beta glukan elde edilmesi ile ilgili sadece ekibimiz tarafından yapılan bir tez çalışması (Dengiz, 2021) dışında başka bir çalışmanın olmaması çalışmamızın özgün yanıdır.
2.  $\beta$ -glukanın suda çözünmeyen bir biyopolimer olması sebebiyle amaçlanan deneylerin sonuçlarını iyileştirmek amacıyla karboksimetilasyon uygulanmış ve  $\beta$ -glukan çözünürlüğü arttırılmıştır.  $\beta$ -glukanın çözünürlüğünün artması, onun birçok sektörde kullanımının önünü açmış olacaktır. Çoğu fungal  $\beta$ -glukan, intravenöz veya intraparenteral olarak uygulandığında immünomodülatör aktiviteler sergilemektedir. Bu durum  $\beta$ -glukanı çok değerli bir doğal biyolojik modülatör haline getirse de çözünmeyen veya zor çözünen  $\beta$ -glukanlar parenteral yollarla uygulandığında granülom oluşumu, inflamasyon, ağrı gibi yan etkiler gösterebilmektedir. Karboksimetilasyon modifikasyonu ile polisakkaritin çözünürlüğünün artırılması bu açıdan da kullanımının önünü açacaktır. Karboksimetilasyon yoluyla türevlendirme, bahsi geçen biyopolimerin artan çözünürlüğe, azalan viskoziteye, antioksidan aktiviteye ve kanser hücrelerinin antiproliferasyonu gibi gelişmiş biyolojik aktivitelere olumlu yönde katkıda bulunur. Bu aktiviteleri doğrulamak için çalışmaların devam etmesine ihtiyaç vardır.
3. Elde edilen CM $\beta$ -gluM16 biyopolimerinin ortamdaki çeşitli serbest radikalleri süpürerek vücuda birçok yönden zararlı olan oksidatif stresi hafifletmesi ve dolayısıyla antioksidan etki göstermesi onu birçok farklı sektör için ideal bir aday haline getirmektedir. Gıda, ilaç ve kozmetik ürünlerinin korunması için antioksidan aktiviteye sahip olan sentetik bileşiklerin kullanımı ne kadar son yıllarda yaygın hale gelse de besin değerini düşürme, istenmeyen tatların ortaya çıkmasını sağlama ve toksik maddeler meydana getirmesi gibi birçok dezavantaja sahiptir. Sentetik antioksidanların bu dezavantajlarından dolayı doğal antioksidanlara duyulan ilgi beta glukan biyopolimerini seçici bir hale getirmektedir. Ayrıca radikal tutma kapasitesinin yüksek oluşu CM $\beta$ -gluM16'nın kozmetik sektöründe de kullanımının oldukça önünü açacaktır. Cilt

beyazlatma, anti-aging, kırışıklık giderici etkilerini kanıtlamak için *in vivo* çalışmalara ihtiyaç vardır. CM $\beta$ -gluM16 gibi antioksidan etkiye sahip bileşiklerin probiyotik olarak oksidatif hasar sonucu oluşan hastalıkların önlenmesinde doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılabilme potansiyelleri de olabilecektir.

4. Tez çalışmasında mayadan izole edilen bir biyopolimerin (CM $\beta$ -gluM16) *E. coli* ATCC patojeni üzerine %80, *P. aeruginosa* ATCC patojeni üzerine %71, *S. aureus* patojeni üzerine %67 oranında antibiyofilm etkisi olduğu tespit edilmiştir. Biyofilm ile mücadelede etkili olabilecek antibiyofilm ajanların araştırılması son yıllarda artmıştır. Bu sebeple sonuçlarımıza bakıldığında gözlenen antibiyofilm aktivite, kullandığımız maddeyi, hastane, boru sistemleri, gıda, tıp vb. alanlarda biyofilmi ve yarattığı yıkıcı hasarı önlemek amacıyla kullanılabilir potansiyel bir aday haline getirmektedir.
5. CM $\beta$ -gluM16 biyopolimerinin MTT testi ile sitotoksik etkileri ölçülmüştür. Sağlıklı fibroblast L929 hücreleri üzerinde belirlen gün ve dozlarda yarattığı toksisitesi ölçülmüştür. HT-29 insan kolon kanseri hücrelerine ise belirli gün ve dozlarda uygulanan CM $\beta$ -gluM16'nın kanser hücrelerinin canlılık yüzdesini düşürmesi çok ciddi bir öneme sahiptir. Anti-kanserojenik, anti-tümöral ajan olarak ilgili sektörlerde kullanım potansiyelinin önünü açacaktır. CM $\beta$ -gluM16 direkt olarak tedavide kullanılamasa bile tedaviye ek bir adjuvant olarak kullanımı çok değerlidir. Bu kanının daha geniş perspektif kazanması için ileri düzey anti-kanser ve anti-tümör deneysel çalışmalara ihtiyaç vardır. Onkolojide ve immünolojide doğal biyolojik modülatörlerin yeni uygulama alanlarının yaratılması,  $\beta$ -D-glukan kimyasal ve biyolojik özelliklerinin araştırılmasını ileriye dönük bir araştırma alanı haline getirir.
6. CM $\beta$ -gluM16 biyopolimerinin sağlıklı hücre hattında canlılığı önemli ölçüde düşürmemesi, onun uygun doz ve sürelerde kullanımında toksik bir bileşik olmadığına kanıttır. Toksisitesi olmayan bu doğal polisakkarit, ilaç sektöründe büyük bir öneme sahip olabilir.
7. Adezyon çalışmasında kullanılan HT-29 ve L929 hücrelerinde probiyotik uygulamanın yüksek adezyon yeteneği gösterdiği belirlenmiş ve sinbiyotik uygulamaların da ortama ilavesi sonucu adezyon yeteneğinin arttığı, bu artışta da sinbiyotiğin probiyotiğe göre öne çıktığı tespit edilmiştir. Tek bir formülasyonda probiyotik ve beta glukanın kombine aktivitesi (sinbiyotik) tek başına probiyotik ile karşılaştırıldığında önemli bir etki göstermiştir. Beta glukanların insan sağlığı üzerinde bilinen olumsuz bir etkisi olmaması, koruyucu amaçlarla kullanılması, tedaviye ek ajanlar olarak kullanılması tavsiye edilebilir.

## KAYNAKLAR

- Abdi, R. ve Joye, I. J. (2021). Prebiotic potential of cereal components. *Foods*, 10(10), 1–18. doi:10.3390/foods10102338
- Abid, Y., Gharsallaoui, A., Dumas, E., Ghnimi, S., attia, H. ve Azabou, S. (2019). Spray-drying microencapsulation of nisin by complexation with exopolysaccharides produced by probiotic *Bacillus tequilensis*-GM and *Leuconostoc citreum*-BMS. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 181(April), 25–30. doi:10.1016/j.colsurfb.2019.05.022
- Abo Elsouid, M. M. ve El Kady, E. M. (2019). Current trends in fungal biosynthesis of chitin and chitosan. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 1–12. doi:10.1186/s42269-019-0105-y
- Ahmad, A., Anjum, F. M., Zahoor, T., Nawaz, H. ve Dilshad, S. M. R. (2012). Beta glucan: A valuable functional ingredient in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(3), 201–212. doi:10.1080/10408398.2010.499806
- Ai, Q., Mai, K., Zhang, L., Tan, B., Zhang, W., Xu, W. ve Li, H. (2007). Effects of dietary  $\beta$ -1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish and Shellfish Immunology*, 22(4), 394–402. doi:10.1016/j.fsi.2006.06.011
- Akter, S., Park, J. H. ve Jung, H. K. (2020). Potential Health-promoting benefits of paraprobiotics, inactivated probiotic cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(4), 477–481. doi:10.4014/JMB.1911.11019
- Alekseev, Y. I., Reznitskii, L. Z., Vereshchagin, V. I., Vasil'ev, E. P. ve Vakalova, T. V. (1994). Very Simple Method of Concentration of Iron-free Quartz- Diopside Ores From Slyudyansk Deposits. *Glass and Ceramics*, 51(5–6), 212–214.
- Alexandre, H. (2011). Autolysis of Yeasts. *Comprehensive Biotechnology, Second Edition* içinde (C. 2, ss. 641–649). Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-08-088504-9.00125-2
- Ali, Ö. (2008). İnflamatuvar Barsak Hastalığında Probiyotiklerin Yeri. *Güncel Gastroenteroloji*, 12(2), 121–127.
- Alzorqi, I., Ketabchi, M. R., Sudheer, S. ve Manickam, S. (2016). Optimization of ultrasound induced emulsification on the formulation of palm-olein based nanoemulsions for the incorporation of antioxidant  $\beta$ -D-glucan polysaccharides. *Ultrasonics sonochemistry*, 31, 71–84. doi:10.1016/J.ULTSONCH.2015.12.004
- Amer, E. M., Saber, S. H., Markeb, A. A., Elkhawaga, A. A., Mekhemer, I. M. A., Zohri, A. N. A., ... Abd-Allah, E. A. (2021). Enhancement of  $\beta$ -glucan biological activity using a modified acid-base extraction method from *saccharomyces cerevisiae*. *Molecules*, 26(8), 1–17. doi:10.3390/molecules26082113
- Angelin, J. ve Kavitha, M. (2020). Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *International journal of biological macromolecules*, 162, 853–865. doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2020.06.190

- Anjugam, M., Vaseeharan, B., Iswarya, A., Gobi, N., Divya, M., Thangaraj, M. P. ve Elumalai, P. (2018). Effect of  $\beta$ -1, 3 glucan binding protein based zinc oxide nanoparticles supplemented diet on immune response and disease resistance in *Oreochromis mossambicus* against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & shellfish immunology*, 76, 247–259. doi:10.1016/J.FSI.2018.03.012
- Ann Liebert, M., Evans, J. L. ve Goldfine, I. D. (2000). Acid: A Multifunctional Antioxidant That Improves Insulin Sensitivity in Patients with Type 2 Diabetes. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 2(3), 401–413. doi:10.1089/15209150050194279
- Anwar, M. I., Muhammad, F., Awais, M. M. ve Akhtar, M. (2017). A review of  $\beta$ -glucans as a growth promoter and antibiotic alternative against enteric pathogens in poultry. *World's Poultry Science Journal*, 73(3), 651–661. doi:10.1017/S0043933917000241
- Arroyo, J., Farkaš, V., Sanz, A. B. ve Cabib, E. (2016). Strengthening the fungal cell wall through chitin–glucan cross-links: effects on morphogenesis and cell integrity. *Cellular Microbiology*, 18(9), 1239–1250. doi:10.1111/cmi.12615
- Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., ... Derg, T. F. (2019). Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü - Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX). *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 26(3), 362–369. doi:10.17343/SDUTFD.566969
- Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., ... Yılmaz, B. (2020). Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü - Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX). *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 26(3), 362–369. doi:10.17343/sdutfd.566969
- Augustine, R., Rajendran, R., Cvelbar, U., Mozetič, M. ve George, A. (2013). Biopolymers for Health, Food, and Cosmetic Applications. *Handbook of Biopolymer-Based Materials: From Blends and Composites to Gels and Complex Networks* içinde (ss. 801–849). Wiley-VCH. doi:10.1002/9783527652457.CH27
- Avramia, I. ve Amarici, S. (2021). Spent Brewer's yeast as a source of insoluble  $\beta$ -glucans. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 1–26. doi:10.3390/ijms22020825
- Aziz, N. ve Bonavida, B. (2016). Activation of natural killer cells by probiotics. *Forum on Immunopathological Diseases and Therapeutics*, 7(1–2), 41–55. doi:10.1615/ForumImmunDisTher.2016017095
- Babincová, M., Bačová, Z., Machová, E. ve Kogan, G. (2002). Antioxidant properties of carboxymethyl glucan: Comparative analysis. *Journal of Medicinal Food*, 5(2), 79–83. doi:10.1089/109662002760178159
- Bai, J., Ren, Y., Li, Y., Fan, M., Qian, H., Wang, L., ... Rao, Z. (2019). Physiological functionalities and mechanisms of  $\beta$ -glucans. *Trends in Food Science and Technology*, 88, 57–66. doi:10.1016/J.TIFS.2019.03.023
- Balakrishnan, D., Kandasamy, D. ve Nithyanand, P. (2014). A review on Antioxidant activity of marine organisms. *International Journal of ChemTech Research*, 6(7), 3431–3436.

- Barcellini, W., Clerici, G., Montesano, R., Taioli, E., Morelati, F., Rebutta, P. ve Zanella, A. (2000). In vitro quantification of anti-red blood cell antibody production in idiopathic autoimmune haemolytic anaemia: effect of mitogen and cytokine stimulation. *British Journal of Haematology*, 111(2), 452–460. doi:10.1111/j.1365-2141.2000.02380.x
- Bedirli, A., Kerem, M., Pasaoglu, H., Akyurek, N., Tezcaner, T., Elbeg, S., ... Sakrak, O. (2007). Beta-glucan attenuates inflammatory cytokine release and prevents acute lung injury in an experimental model of sepsis. *Shock*, 27(4), 397–401. doi:10.1097/01.SHK.0000245030.24235.F1
- Bergendiova, K., Tibenska, E. ve Majtan, J. (2011). Pleuran ( $\beta$ -glucan from *Pleurotus ostreatus*) supplementation, cellular immune response and respiratory tract infections in athletes. *European Journal of Applied Physiology*, 111(9), 2033–2040. doi:10.1007/s00421-011-1837-z
- Bhatia, S. (2016a). *Systems for drug delivery: Safety, animal, and microbial polysaccharides*. *Systems for Drug Delivery: Safety, Animal, and Microbial Polysaccharides*. Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-41926-8/COVER
- Bhatia, S. (2016b). *Systems for drug delivery: safety, animal, and microbial polysaccharides*. Springer.
- Bikric, S., Aslim, B., Dincer, İ., Yuksekdağ, Z., Ulusoy, S. ve Yavuz, S. (2022a). Characterization of Exopolysaccharides (EPSs) Obtained from *Ligilactobacillus salivarius* Strains and Investigation at the Prebiotic Potential as an Alternative to Plant Prebiotics at Poultry. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 14(1), 49–59. doi:10.1007/s12602-021-09790-8
- Bikric, S., Aslim, B., Dincer, İ., Yuksekdağ, Z., Ulusoy, S. ve Yavuz, S. (2022b). Characterization of Exopolysaccharides (EPSs) Obtained from *Ligilactobacillus salivarius* Strains and Investigation at the Prebiotic Potential as an Alternative to Plant Prebiotics at Poultry. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 14(1), 49–59. doi:10.1007/S12602-021-09790-8
- Björklund, M., van Rees, A., Mensink, R. P. ve Önnings, G. (2005). Changes in serum lipids and postprandial glucose and insulin concentrations after consumption of beverages with  $\beta$ -glucans from oats or barley: A randomised dose-controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, 59(11), 1272–1281. doi:10.1038/sj.ejcn.1602240
- Bisen, P. S., Baghel, R. K., Sanodiya, B. S., Thakur, G. S. ve Prasad, G. B. K. S. (2010). *Lentinus edodes*: a macrofungus with pharmacological activities. *Current medicinal chemistry*, 17(22), 2419–2430. doi:10.2174/092986710791698495
- Blanco Alonso, R. ve Agudo Bilbao, M. (2009). Inhibition of interleukin 6, a new therapeutic option in rheumatoid arthritis. *Reumatologia Clinica*, 5(3), 121–127. doi:10.1016/j.reuma.2009.02.001
- Bohn Dz, J. A. ve Bemiller, J. N. (1995). (1-4)-D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers*, 28, 3–14.

- Borbély, A., Figueras, E., Martins, A., Esposito, S., Auciello, G., Monteagudo, E., ... Sewald, N. (2019). Synthesis and biological evaluation of RGD–cryptophycin conjugates for targeted drug delivery. *Pharmaceutics*, *11*(4). doi:10.3390/pharmaceutics11040151
- Bowman, S. M. ve Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, *28*(8), 799–808. doi:10.1002/BIES.20441
- Brennan, C. S. ve Tudorica, C. M. (2007). Fresh Pasta Quality as Affected by Enrichment of Nonstarch Polysaccharides. *JOURNAL OF FOOD SCIENCE*, *72*(9), 659–665. doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00541.x
- Burkus, Z. ve Temelli, F. (1999). Gelation of Barley  $\beta$ -Glucan Concentrate. *JOURNAL OF FOOD SCIENCE*, *64*(2), 198–201.
- Bzducha-Wróbel, A., Błazejak, S. ve Tkacz, K. (2012). Cell wall structure of selected yeast species as a factor of magnesium binding ability. *European Food Research and Technology*, *235*(2), 355–366. doi:10.1007/s00217-012-1761-4
- C.P. Kurtzman, J.W. Fell, T. B. (2011). A Taxonomic Study. *The Yeasts* içinde (ss. 159–174). <https://www.elsevier.com/books/the-yeasts/kurtzman/978-0-444-52149-1> adresinden erişildi.
- Çankaya, Nevin ve Sökmen, Ö. (2017). Biyopolimerler ve Montmorillonit Kil Nanokompozitleri. *Journal of Polytechnic*, *20*(3), 663–673. doi:10.2339/POLITEKNİK.339394
- Cao, Y., Xu, X., Liu, S., Huang, L. ve Gu, J. (2018). Ganoderma: A cancer immunotherapy review. *Frontiers in Pharmacology*, *9*(OCT), 1–14. doi:10.3389/fphar.2018.01217
- Carocho, M. ve Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, *51*(1), 15–25. doi:10.1016/j.fct.2012.09.021
- Celebioglu, H. U. ve Svensson, B. (2018). Dietary nutrients, proteomes, and adhesion of probiotic lactobacilli to mucin and host epithelial cells. *Microorganisms*, *6*(3). doi:10.3390/microorganisms6030090
- Chaieb, K., Kouidhi, B., Jrah, H., Mahdouani, K. ve Bakhrouf, A. (2011). Antibacterial activity of Thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial biofilm formation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *11*(29), 1–6. doi:10.1186/1472-6882-11-29
- Chakka, V. P. ve Zhou, T. (2020). Carboxymethylation of polysaccharides: Synthesis and bioactivities. *International Journal of Biological Macromolecules*, *165*, 2425–2431. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.10.178
- Chamidah, A., Hardoko ve Prihanto, A. A. (2017). Antibacterial activities of  $\beta$ -glucan (laminaran) against gram-negative and gram-positive bacteria. *AIP Conference Proceedings*, *1844*(1), 020011. doi:10.1063/1.4983422

- Chawla, L. S., Beers-Mulroy, B. ve Tidmarsh, G. F. (2019). Therapeutic Opportunities for Hepcidin in Acute Care Medicine. *Critical Care Clinics*, 35(2), 357–374. doi:10.1016/J.CCC.2018.11.014
- Chen, Lei, Ge, M. D., Zhu, Y. J., Song, Y., Cheung, P. C. K., Zhang, B. B. ve Liu, L. M. (2019). Structure, bioactivity and applications of natural hyperbranched polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 223, 2–15. doi:10.1016/j.carbpol.2019.115076
- Chen, Ling ve Huang, G. (2017). Antitumor Activity of Polysaccharides: An Overview. *Current Drug Targets*, 19(1), 89–96. doi:10.2174/1389450118666170704143018
- Chen, R., Lan, Z., Ye, J., Pang, L., Liu, Y., Wu, W., ... Zhang, P. (2021). Cytokine Storm: The Primary Determinant for the Pathophysiological Evolution of COVID-19 Deterioration. *Frontiers in Immunology*, 12(April), 1–11. doi:10.3389/fimmu.2021.589095
- Chen, Y., Dong, L., Weng, D., Liu, F., Song, L., Li, C., ... Chen, J. (2013). 1,3- $\beta$ -Glucan affects the balance of Th1/Th2 cytokines by promoting secretion of anti-inflammatory cytokines in vitro. *Molecular Medicine Reports*, 8(2), 708–712. doi:10.3892/MMR.2013.1553/HTML
- Chiste, R., Freitas, M., Mercadante, A. ve Fernandes, E. (2015). Superoxide Anion Radical: Generation and Detection in Cellular and Non-Cellular Systems. *Current Medicinal Chemistry*, 22(37), 34–56. doi:10.2174/0929867322666151029104311
- Chiurchiù, V. ve MacCarrone, M. (2011). Chronic inflammatory disorders and their redox control: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants and Redox Signaling*, 15(9), 2605–2641. doi:10.1089/ARS.2010.3547
- Cho, K. C. W. J. (1993). Enzymatic analysis of beta-glucan content in different oat genotypes. *Cereal Chemistry*, (70), 539–542. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9433793> adresinden erişildi.
- Choi, S. S., Kim, Y., Han, K. S., You, S., Oh, S. ve Kim, S. H. (2006). Effects of Lactobacillus strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro. *Letters in Applied Microbiology*, 42(5), 452–458. doi:10.1111/j.1472-765X.2006.01913.x
- Choromanska, A., Kulbacka, J., Rembalkowska, N., Pilat, J., Oledzki, R., Harasym, J. ve Saczko, J. (2015). Anticancer properties of low molecular weight oat beta-glucan – An in vitro study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 23–28. doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2015.05.035
- Clarke, A. E. (2009). Introduction and historical background. In *Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides* içinde (ss. 1–3). Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-373971-1.00001-7
- Cletus Kurtzman et al. (2011). A Taxonomic Study. *The Yeasts* içinde (ss. 159–174). Elsevier Science.
- Coşkun, T. (2005). Fonksiyonel Besinlerin Sağlığımız Üzerine Etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 48, 69–84.

- Costa, R. L., Moreira, J., Lorenzo, A. ve Lamas, C. C. (2018). Infectious complications following probiotic ingestion: A potentially underestimated problem? A systematic review of reports and case series. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(329), 1–8. doi:10.1186/s12906-018-2394-3
- D'Alessio, G., Di Donato, A., Piccoli, R. ve Russo, N. (2001). Seminal ribonuclease: Preparation of natural and recombinant enzyme, quaternary isoforms, isoenzymes, monomeric forms; assay for selective cytotoxicity of the enzyme. *Methods in Enzymology*, 341, 248–263. doi:10.1016/S0076-6879(01)41156-6
- Da Costa, L. A., Badawi, A. ve El-Soheemy, A. (2012). Nutrigenetics and modulation of oxidative stress. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 60(3), 27–36. doi:10.1159/000337311
- Das Sarma, A., Mallick, A. R. ve Ghosh, A. K. (2010). Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions: An Overview 2. *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)*, 1(3), 185–192.
- Dawkins, N. L. ve Nnanna, I. A. (1995). Studies on oat gum [(1→3, 1→4)-β-D-glucan]: composition, molecular weight estimation and rheological properties. *Topics in Catalysis*, 9(1), 1–7. doi:10.1016/S0268-005X(09)80188-4
- de Almada, C. N., Almada, C. N., Martinez, R. C. R. ve Sant'Ana, A. S. (2016). Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 58, 96–114. doi:10.1016/J.TIFS.2016.09.011
- De Nooy, A. E. J., Rori, V., Masci, G., Dentini, M. ve Crescenzi, V. (2000). Synthesis and preliminary characterisation of charged derivatives and hydrogels from scleroglucan. *Synthesis and preliminary characterisation of charged derivates and hydrogels from scleroglucan*, 324(2), 116–126. www.elsevier.nl/locate/carres adresinden erişildi.
- De Souza, N. L., Bartz, J., Zavareze, E. D. R., De Oliveira, P. D., Da Silva, W. S. V., Alves, G. H. ve Dias, A. R. G. (2015). Functional, thermal and rheological properties of oat β-glucan modified by acetylation. *Food Chemistry*, 178, 243–250. doi:10.1016/j.foodchem.2015.01.079
- De Vrese, M. ve Schrezenmeir, J. (2008). Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 111, 1–66. doi:10.1007/10\_2008\_097
- Dengiz, B. (2021). *Pichia kudriavzevii* Maya Suşlarından Beta Glukanın Ekstrakte Edilerek Prebiyotik Etkilerinin ve Gastrointestinal Sistemde Dayanıklılığının Belirlenmesi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Di Mascio, P., Murphy, M. E. ve Sies, H. (1991). Antioxidant defense systems: The role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *American Journal of Clinical Nutrition*, 53, 194–200. doi:10.1093/ajcn/53.1.194S
- Dinarello, C. A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual Review of Immunology*, 27, 519–550. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132612

- Diplock, A. T., Charuleux, J.-L., Crozier-Willi, G., Kok, F. J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., ... Viña-Ribes, J. (1998). Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition*, 80(1), 77–112. doi:10.1079/bjn19980106
- Doğan, M. (2011). Probiyotik bakterilerin etki mekanizması Probiotic bacteria effect mechanism. *Anadolu Bil Meslek Yüksekokulu Dergisi*, 21, 98–102.
- Du, B., Bian, Z. ve Xu, B. (2013). Skin Health Promotion Effects of Natural Beta-Glucan Derived from Cereals and Microorganisms: A Review. *Phytotherapy Research*, 28, 159–166. doi:10.1002/ptr.4963
- Du, B., Meenu, M., Liu, H. ve Xu, B. (2019). Molecular Sciences A Concise Review on the Molecular Structure and Function Relationship of  $\beta$ -Glucan. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4032), 1–18. doi:10.3390/ijms20164032
- Duary, R. K., Rajput, Y. S., Batish, V. K. ve Grover, S. (2011). Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells. *The Indian Journal of Medical Research*, 134(5), 664. doi:10.4103/0971-5916.90992
- Dusane, D. H., Rajput, J. K., Kumar, A. R., Nancharaiah, Y. V., Venugopalan, V. P. ve Zinjarde, S. S. (2008). Disruption of fungal and bacterial biofilms by lauroyl glucose. *Letters in Applied Microbiology*, 47(5), 374–379. doi:10.1111/J.1472-765X.2008.02440.X
- Duthie, G. G., Wahle, K. W. J. ve James, W. P. T. (1989). Oxidants, Antioxidants and Cardiovascular Disease. *Nutrition Research Reviews*, 2(1), 51–62. doi:10.1079/NRR19890007
- Ege, R., Zeynep, S. ve Köseoğlu, A. (2021). Beta- Glukanın Kardiyovasküler Sağlık Üzerine Etkisi. *İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 3(2), 159–164.
- Elbarbary, A. M. ve Mostafa, T. B. (2014). Effect of  $\gamma$ -rays on carboxymethyl chitosan for use as antioxidant and preservative coating for peach fruit. *Carbohydrate Polymers*, 104(1), 109–117. doi:10.1016/j.carbpol.2014.01.021
- Elena De Marco Costra, Philip C. Calder ve Helen M. Roche. (2021).  $\beta$ -1,3/1,6-Glucans and Immunity: State of the Art and Future Directions. *Molecular Nutrition & Food Research*, 65, 1–15. doi:https://doi.org/10.1002/mnfr.201901071
- Elisabeth, Z. M. ve Elisabeth, Z. M. (2022). The Mechanisms of Bacterial Biofilm Inhibition and Eradication: The Search for Alternative Antibiofilm Agents. *Focus on Bacterial Biofilms*. doi:10.5772/INTECHOPEN.104772
- Ewens, A., Mihich, E. ve Ehrke, M. J. (2005). Distant metastasis from subcutaneously grown E0771 medullary breast adenocarcinoma. *Anticancer Research*, 25(6 B), 3905–3915.
- Fan, L., Li, J., Deng, K. ve Ai, L. (2012). Effects of drying methods on the antioxidant activities of polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 1849–1854. doi:10.1016/j.carbpol.2011.10.018

- Feldmann, H. (2012). *Yeast Cell Architecture and Functions 2.1 General Morphology*.
- Freimoser, F. M., Jakob, C. A., Aebi, M. ve Tuor, U. (1999). The MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3727–3729. doi:10.1128/aem.65.8.3727-3729.1999
- G M Walker. (1999). Synchronization of yeast cell populations. *Methods in Cell Science*, 21, 87–93. doi:10.1023/a:1009824520278.
- Gabay, C., Lamacchia, C. ve Palmer, G. (2010). IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, 6, 232–241. doi:10.1038/nrrheum.2010.4
- Galichet, A., Sockalingum, G. D., Belarbi, A. ve Manfait, M. (2001). FTIR spectroscopic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: Study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype. *FEMS Microbiology Letters*, 197(2), 179–186. doi:10.1016/S0378-1097(01)00101-X
- Galinari, É., Almeida-Lima, J., Macedo, G. R., Mantovani, H. C. ve Rocha, H. A. O. (2018). Antioxidant, antiproliferative, and immunostimulatory effects of cell wall  $\alpha$ -d-mannan fractions from *Kluyveromyces marxianus*. *International journal of biological macromolecules*, 109, 837–846. doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2017.11.053
- Gandhi, S. ve Abramov, A. Y. (2012). Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 1–11. doi:10.1155/2012/428010
- Gao, D., Chen, H., Liu, H., Yang, X., Guo, P., Cao, X., ... Yang, J. (2022). Structure characterization and antioxidant activity analysis of polysaccharides from Lanzhou Lily. *Frontiers in Nutrition*, 9, 1–13. doi:10.3389/fnut.2022.976607
- Gao, X., Xia, X., Li, F., Zhang, M., Zhou, H., Wu, X., ... Zhang, N. (2021). Circular RNA-encoded oncogenic E-cadherin variant promotes glioblastoma tumorigenicity through activation of EGFR–STAT3 signalling. *Nature Cell Biology*, 23(3), 278–291. doi:10.1038/s41556-021-00639-4
- Gao, Z. X., Rao, J. ve Li, Y. H. (2017). Hyperbaric oxygen preconditioning improves postoperative cognitive dysfunction by reducing oxidant stress and inflammation. *Neural Regeneration Research*, 12(2), 329–336. doi:10.4103/1673-5374.200816
- Gaosong, J. ve Vasanthan, T. (2000). Effect of Extrusion Cooking on the Primary Structure and Water Solubility of  $\beta$ -Glucans from Regular and Waxy Barley. *Cereal Chemistry*, 77(3), 396–400.
- Gezginç, Y., Karabekmez-Erdem, T., Tatar, H. D., Ayman, S., Ganiyusufoğlu, E. ve Dayısoylu, K. S. (2022). Health promoting benefits of postbiotics produced by lactic acid bacteria: Exopolysaccharide. *Biotech Studies*, 31(2), 62–63. doi:10.38042/biotechstudies.1159166
- Giavasis, I. ve Biliaderis, C. G. (2006). Microbial Polysaccharides In: “Functional Food Carbohydrates. *Functional Food Carbohydrates* içinde (ss. 167–213).

- Giese, E. C., Gascon, J., Anzelmo, G., Barbosa, A. M., da Cunha, M. A. A. ve Dekker, R. F. H. (2015). Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of botryosphaeran and some other  $\beta$ -D-glucans. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 125–130. doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2014.07.046
- Górska-Fraczek, S., Sandström, C., Kenne, L., Paściak, M., Brzozowska, E., Strus, M., ... Gamian, A. (2013). The structure and immunoreactivity of exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus johnsonii* strain 151. *Carbohydrate Research*, 378, 148–153. doi:10.1016/J.CARRES.2013.05.012
- Gürsoy, O. ve Kınık, Ö. (2006). Peynir Üretiminde Probiyotik Bakterilerin Kullanımı: Probiyotik Peynir. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 12(1), 105–116.
- Habtemariam, S. (2013). Targeting the production of monocytes/macrophages-derived cytokines by anti-inflammatory herbal drugs. *Phytopharmacology*, 2013(1), 131–148.
- Haddaji, N., Khouadja, S., Fdhila, K., Krifi, B., Ben Ismail, M., Lagha, R., ... Bakhrouf, A. (2015). Acid stress suggests different determinants for polystyrene and HeLa cell adhesion in *Lactobacillus casei*. *Journal of Dairy Science*, 98(7), 4302–4309. doi:10.3168/JDS.2014-9198
- Hadjiakhoondi, A. (2014). Cytotoxicity of Two Species of *Glaucium* from Iran Article in Journal of Medicinal Plants. *Journal of Medicinal Plants*, 11(43), 85–92.
- Han, B., Baruah, K., Cox, E., Vanrompay, D. ve Bossier, P. (2020). Structure-Functional Activity Relationship of  $\beta$ -Glucans From the Perspective of Immunomodulation: A Mini-Review. *Frontiers in Immunology*, 11(April), 1–8. doi:10.3389/fimmu.2020.00658
- Hee JUNG, K., Kim, M.-J., Kyung KIM, H., Ock KIM, Y., Ah KANG, S., Chung, J.-H. ve Yim, S.-V. (2007). The Suppressive Effect of  $\beta$ -Glucan on the Production of Tumor Necrosis Factor-Alpha in BV2 Microglial Cells. *Biotechnology, and Biochemistry*, 71(5), 1360–1364. doi:10.1271/bbb.60608
- Henrion, M., Francey, C., Lê, K. A. ve Lamothe, L. (2019). Cereal B-glucans: The impact of processing and how it affects physiological responses. *Nutrients*, 11(8), 1–14. doi:10.3390/nu11081729
- Homayouni-rad, A., Oroojzadeh, P. ve Abbasi, A. (2021). The Effect of Yeast *Kluyveromyces marxianus* as a Probiotic on the Microbiological and Sensorial Properties of Set Yoghurt during Refrigerated Storage. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences*, 20(2), 254–268. doi:10.52547/jarums.20.2.254
- Hong, J. H. ve Jung, H. K. (2014). Antioxidant and antitumor activities of  $\beta$ -glucan-rich exopolysaccharides with different molecular weight from *Paenibacillus polymyxa* JB115. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 57(1), 105–112. doi:10.1007/s13765-013-4252-9
- Hooshdar, P., Kermanshahi, R. K., Ghadam, P. ve Khosravi-Darani, K. (2020). A Review on Production of Exopolysaccharide and Biofilm in Probiotics Like *Lactobacilli* and Methods of Analysis. *Review*, 10(5), 6058–6075. doi:10.33263/BRIAC105.60586075

- Huang, W. M., Liang, Y. Q., Tang, L. J., Ding, Y. ve Wang, X. H. (2013). Antioxidant and anti-inflammatory effects of Astragalus polysaccharide on EA.hy926 cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 6(1), 199–203. doi:10.3892/etm.2013.1074
- İlker Altıntaş. (2006). *Babesiosis`li atlarda levamizol ve beta glukun`ın bazı kan parametreleri ile IgG üzerine etkilerinin araştırılması.*
- Ishimoto, Y., Ishibashi, K. ichi, Yamanaka, D., Adachi, Y., Kanzaki, K., Iwakura, Y. ve Ohno, N. (2018). Production of low-molecular weight soluble yeast  $\beta$ -glucan by an acid degradation method. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 2269–2278. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.10.094
- Jacobsen, C. N., Nielsen, V. R., Hayford, A. E., Møller, P. L., Michaelsen, K. F., Pærregaard, A., ... Jakobsen, M. (1999). Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), 4949–4956. doi:10.1128/aem.65.11.4949-4956.1999
- Jacques, N. ve Casaregola, S. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The hemiascomycetous yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 126(3), 321–326. doi:10.1016/J.IJFOODMICRO.2007.08.020
- Jaehrig, S. C., Rohn, S., Kroh, L. W., Fleischer, L. G. ve Kurz, T. (2007). In Vitro Potential Antioxidant Activity of (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -d-Glucan and Protein Fractions from *Saccharomyces cerevisiae* Cell Walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4710–4716. doi:10.1021/JF063209Q
- Jagani, S., Chelikani, R. ve Kim, D. S. (2009). Effects of phenol and natural phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling*, 25(4), 321–324. doi:10.1080/08927010802660854
- Jay, D., Hitomi, H. ve Griendling, K. K. (2006, 15 Ocak). Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radical Biology and Medicine*. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.06.018
- Jayachandran, M., Chen, J., Chung, S. S. M. ve Xu, B. (2018). A critical review on the impacts of  $\beta$ -glucans on gut microbiota and human health. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 61, 101–110. doi:10.1016/j.jnutbio.2018.06.010
- Jeddou, K. Ben, Chaari, F., Maktouf, S., Nouri-Ellouz, O., Helbert, C. B. ve Ghorbel, R. E. (2016). Structural, functional, and antioxidant properties of water-soluble polysaccharides from potatoes peels. *Food Chemistry*, 205, 97–105. doi:10.1016/j.foodchem.2016.02.108
- Jeon, C., Park, J. Y. ve Yoo', Y. J. (2001). Removal of Heavy Metals in Plating Wastewater Using Carboxylated Alginic Acid. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 18(6), 955–960.
- Jesenak, M., Majtan, J., Rennerova, Z., Kyselovic, J., Banovcin, P. ve Hrubisko, M. (2013). Immunomodulatory effect of pleuran ( $\beta$ -glucan from *Pleurotus ostreatus*) in children with recurrent respiratory tract infections. *International Immunopharmacology*, 15(2), 395–399. doi:10.1016/j.intimp.2012.11.020

- Jezequel, V. (2009). Potential Application of Yeast  $\beta$ -Glucans in Food Industry. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 74(5), 277–287.
- Johnson, E., Førland, D. T., Sætre, L., Bernardshaw, S. V., Lyberg, T. ve Hetland, G. (2009). Effect of an extract based on the medicinal mushroom agaricus blazei murill on release of cytokines, chemokines and leukocyte growth factors in human blood ex vivo and in vivo. *Scandinavian Journal of Immunology*, 69(3), 242–250. doi:10.1111/j.1365-3083.2008.02218.x
- Kačuráková, M. ve Wilson, R. H. (2001). Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. *Carbohydrate Polymers*, 44(4), 291–303. doi:10.1016/S0144-8617(00)00245-9
- Kagimura, Francini Y., Da Cunha, M. A. A., Theis, T. V., Malfatti, C. R. M., Dekker, R. F. H., Barbosa, A. M., ... Salomé, K. (2015a). Carboxymethylation of (1  $\rightarrow$  6)- $\beta$ -glucan (lasiodiplodan): Preparation, characterization and antioxidant evaluation. *Carbohydrate Polymers*, 127, 390–399. doi:10.1016/J.CARBPOL.2015.03.045
- Kagimura, Francini Y., Da Cunha, M. A. A., Theis, T. V., Malfatti, C. R. M., Dekker, R. F. H., Barbosa, A. M., ... Salomé, K. (2015b). Carboxymethylation of (1  $\rightarrow$  6)- $\beta$ -glucan (lasiodiplodan): Preparation, characterization and antioxidant evaluation. *Carbohydrate Polymers*, 127, 390–399. doi:10.1016/j.carbpol.2015.03.045
- Kagimura, Francini Yumi, da Cunha, M. A. A., Barbosa, A. M., Dekker, R. F. H. ve Malfatti, C. R. M. (2014). Biological activities of derivatized D-glucans: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 588–598. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.09.008
- Kahlon, T. . ve Chow, F. . (1997). Kahlon. *Cereal foods world (USA)*, 42(2), 86–92. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9729300> adresinden erişildi.
- Kang, H., Uddin, M. A., Lee, C., Kim, K. H., Nguyen, T. L., Lee, W., ... Kim, B. J. (2015). Determining the role of polymer molecular weight for high-performance all-polymer solar cells: Its effect on polymer aggregation and phase separation. *Journal of the American Chemical Society*, 137(6), 2359–2365. doi:10.1021/ja5123182
- Kanmani, P., Satish kumar, R., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukumar, V. ve Arul, V. (2011). Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity in vitro. *Bioresource Technology*, 102(7), 4827–4833. doi:10.1016/j.biortech.2010.12.118
- Kannappan, A., Sivaranjani, M., Srinivasan, R., Rathna, J., Karutha Pandian, S. ve Veera Ravi, A. (y.y.). Inhibitory efficacy of geraniol on biofilm formation and development of adaptive resistance in *Staphylococcus epidermidis* RP62A. doi:10.1099/jmm.0.000570
- Kao, P. F., Wang, S. H., Hung, W. T., Liao, Y. H., Lin, C. M. ve Yang, W. Bin. (2012). Structural characterization and antioxidative activity of low-molecular-weights beta-1,3-glucan from the residue of extracted *Ganoderma lucidum* fruiting bodies. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 1–8. doi:10.1155/2012/673764

- Karabiyikli, Ş. ve Donat, İ. (2019). Prebiyotik Diyet Liflerinin Kolon Mikrobiyotası ve Sağlık Üzerine Etkileri. *Journal of New Results in Engineering and Natural Science*, 10, 1–14. <http://jrens.gop.edu.tr> adresinden erişildi.
- Karabulut, H. ve Gülay, M. Ş. (2016). Antioksidanlar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1(1), 65–76. doi:10.24880/MAEUVFD.260790
- Karshloğlu, F., Ertunç, S. ve Hitit, Z. Y. A. (2021). Investigation of extraction method effect on yeast beta glucan production. *Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences*, 4(2), 51–55. doi:10.46239/EJBCS.734046
- Kaur, R., Sharma, M., Ji, D., Xu, M. ve Agyei, D. (2020). Structural features, modification, and functionalities of beta-glucan. *Fibers*, 8(1), 1–29. doi:10.3390/fib8010001
- Kedare, S. B. ve Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412–422. doi:10.1007/s13197-011-0251-1
- Keser, O. (2008). Beta-Glukanın Hayvan Beslemede Bağışıklık Sistemi ve Performans Üzerine Etkisi. *Derleme J Fac Vet Med Univ Erciyes*, 5(2), 107–119.
- Khan, A. A., Gani, A., Masoodi, F. A., Amin, F., Wani, I. A., Khanday, F. A. ve Gani, A. (2016). Structural, thermal, functional, antioxidant & antimicrobial properties of  $\beta$ -d-glucan extracted from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)—Effect of  $\gamma$ -irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 140, 442–450. doi:10.1016/J.CARBPOL.2016.01.003
- Kida, K., Inouea, T., Kaino, Y., Goto, Y., Ikeuchi, M., Ito, T., ... Elliott, R. B. (1992). An immunopotentiator of  $\beta$ -1,6; 1,3 D-glcna prevents diabetes and insulinitis in BB rats. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 17, 75–79.
- Kim, H. S., Hong, J. T., Kim, Y. ve Han, S.-B. (2011). Stimulatory Effect of  $\beta$ -glucans on Immune Cells. *Immune network*, 11(4), 191. doi:10.4110/IN.2011.11.4.191
- Klis, F. M., Boorsma, A. ve De Groot, P. W. J. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 23(3), 185–202. doi:10.1002/yea.1349
- Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K. ve Brul, S. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(3), 239–256. doi:10.1111/j.1574-6976.2002.tb00613.x
- Kofuji, K., Aoki, A., Tsubaki, K., Konishi, M., Isobe, T. ve Murata, Y. (2012). Antioxidant Activity of  $\beta$ -Glucan. *Pharmaceutics*, 2012, 1–5. doi:10.5402/2012/125864
- Kogan, G., M Pajtinka, Babincová, M., Miadokova, E. ve Slamenova. (2008). Yeast cell wall polysaccharides as antioxidants and antimutagens: can they fight cancer? *Neoplasma*, 55(5), 388–393. [https://www.researchgate.net/publication/23136202\\_Yeast\\_cell\\_wall\\_polysaccharides\\_as\\_antioxidants\\_and\\_antimutagens\\_Can\\_they\\_fight\\_cancer\\_Minireview](https://www.researchgate.net/publication/23136202_Yeast_cell_wall_polysaccharides_as_antioxidants_and_antimutagens_Can_they_fight_cancer_Minireview) adresinden erişildi.

- Kong, M. G., Jang, S. Y., Jang, J., Cho, H. J., Lee, S., Lee, S. E., ... Lee, H. Y. (2020). Impact of diabetes mellitus on mortality in patients with acute heart failure: A prospective cohort study. *Cardiovascular Diabetology*, 19(49), 1–10. doi:10.1186/s12933-020-01026-3
- Krpan, V. Z., Srećec, S. ve Krbavčić, I. P. (2010). Biological effects of yeast  $\beta$ -glucans Taxonomy, Ecology and Utilization of Carob tree (*Ceratonia siliqua*) and Bay Laurel (*Laurus nobilis*) in Croatia View project Taxonomy, Ecology and Utilization of Carob tree (*Ceratonia siliqua*) and Bay Laurel (*Laurus no. Agriculturae Conspectus Scientificus*, 75(4), 149–158. <https://www.researchgate.net/publication/267031577> adresinden erişildi.
- Lam, K. L. ve Chi-Keung Cheung, P. (2013). Non-digestible long chain beta-glucans as novel prebiotics. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2(1), 45–64. doi:10.1016/j.bcdf.2013.09.001
- Laroche, C. ve Michaud, P. (2007). New Developments and Prospective Applications for  $\beta$  (1,3) Glucans. *Recent Patents on Biotechnology*, 1, 59–73.
- Laroche, C. ve Michaud, P. (2008). New Developments and Prospective Applications for  $\beta$  (1,3) Glucans. *Recent Patents on Biotechnology*, 1(1), 59–73. doi:10.2174/187220807779813938
- Lazaridou, A. ve Biliaderis, C. G. (2007). Molecular aspects of cereal  $\beta$ -glucan functionality: Physical properties, technological applications and physiological effects. *Journal of Cereal Science*, 46(2), 101–118. doi:10.1016/j.jcs.2007.05.003
- Lei, N., Wang, M., Zhang, L., Xiao, S., Fei, C. Z., Wang, X., ... Xue, F. (2015). Effects of Low Molecular Weight Yeast  $\beta$ -Glucan on Antioxidant and Immunological Activities in Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 75–90. doi:10.3390/IJMS160921575
- Lemieszek, M. ve Rzeski, W. (2012). Anticancer properties of polysaccharides isolated from fungi of the Basidiomycetes class. *Wspolczesna Onkologia*, 16(4), 285–289. doi:10.5114/wo.2012.30055
- Lenhart, T. R., Duncan, K. E., Beech, I. B., Sunner, J. A., Smith, W., Bonifay, V., ... Suflita, J. M. (2014). Identification and characterization of microbial biofilm communities associated with corroded oil pipeline surfaces. *Biofouling*, 30(7), 823–835. doi:10.1080/08927014.2014.931379
- Li, J. H., Miao, J., Wu, J. L., Chen, S. F. ve Zhang, Q. Q. (2014). Preparation and characterization of active gelatin-based films incorporated with natural antioxidants. *Food Hydrocolloids*, 37, 166–173. doi:10.1016/j.foodhyd.2013.10.015
- Li, S., Xiong, Q., Lai, X., Li, X., Wan, M., Zhang, J., ... Lin, Y. (2016). Molecular Modification of Polysaccharides and Resulting Bioactivities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(2), 237–250. doi:10.1111/1541-4337.12161

- Li, Y., Fan, Y., Pan, H., Qian, H., Qi, X., Wu, G., ... Ying, H. (2018). Effects of functional  $\beta$ -glucan on proliferation, differentiation, metabolism and its anti-fibrosis properties in muscle cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, *117*, 287–293. doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2018.05.188
- Li, Z., Du, Z., Wang, Y., Feng, Y., Zhang, R. ve Yan, X. (2022). of Land Plant Polysaccharides : A Review.
- Liang, N. ve Kitts, D. D. (2014). Antioxidant property of coffee components: Assessment of methods that define mechanism of action. *Molecules*, *19*(11), 19180–19208. doi:10.3390/MOLECULES191119180
- Lin, M. Y. ve Yen, C. L. (1999). Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, *47*(4), 1460–1466. doi:10.1021/JF981149L
- Liu, X. Y., Wang, Q., Cui, S. W. ve Liu, H. Z. (2008). A new isolation method of  $\beta$ -d-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Hydrocolloids*, *22*(2), 239–247. doi:10.1016/j.foodhyd.2006.11.008
- Locatelli, M., Gindro, R., Travaglia, F., Coisson, J. D., Rinaldi, M. ve Arlorio, M. (2009). Study of the DPPH-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. *Food Chemistry*, *114*(3), 889–897. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2008.10.035
- Loureiro, V. ve Querol, A. (1999). The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Trends in Food Science & Technology*, *10*, 356–365.
- Machová, E., Čížová, A. ve Bystrický, P. (2014). Effect of carboxymethylation on antioxidant properties and radical degradation of mannans and glucans. *Carbohydrate Polymers*, *112*, 603–607. doi:10.1016/J.CARBPOL.2014.06.050
- Maehara, Y., Tsujitani, S., Saeki, H., Oki, E., Yoshinaga, K., Emi, Y., ... Baba, H. (2012). Biological mechanism and clinical effect of protein-bound polysaccharide K (KRESTIN®): Review of development and future perspectives. *Surgery Today*, *42*(1), 8–28. doi:10.1007/s00595-011-0075-7
- Maggio, M., Guralnik, J. M., Longo, D. L. ve Ferrucci, L. (2006). Interleukin-6 in Aging and Chronic Disease: A Magnificent Pathway. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, *61*(6), 575–584. <https://academic.oup.com/biomedgerontology/article/61/6/575/589467> adresinden erişildi.
- Magnani, M., Calliari, C. M., de Macedo, F. C., Mori, M. P., de Syllos Cólus, I. M. ve Castro-Gomez, R. J. H. (2009). Optimized methodology for extraction of (1  $\rightarrow$  3)(1  $\rightarrow$  6)- $\beta$ -d-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* and in vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of the corresponding carboxymethyl derivative. *Carbohydrate Polymers*, *78*(4), 658–665. doi:10.1016/j.carbpol.2009.05.023
- Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Dieste, A. P., Cerrada, E. ve Yoldi, M. J. R. (2017). Colorectal carcinoma: A general overview and future perspectives in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(1). doi:10.3390/ijms18010197

- Medeiros, S. D. V., Cordeiro, S. L., Cavalcanti, J. E. C., Melchuna, K. M., Lima, A. M. da S., Filho, I. A., ... Sales, V. S. F. (2012). Effects of purified *Saccharomyces cerevisiae* (1→3)- $\beta$ -glucan on venous ulcer healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8142–8158. doi:10.3390/ijms13078142
- Meydani, M., Biology Program, V. ve Mayer, J. (2001). Nutrition Interventions in Aging and Age-Associated Disease. *Annals New York Academy of Sciences*, 17496632, 226–235. doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb05652.x
- Mirończuk-Chodakowska, I., Kujawowicz, K. ve Witkowska, A. M. (2021). Beta-glucans from fungi: Biological and health-promoting potential in the covid-19 pandemic era. *Nutrients*, 13(11), 1–23. doi:10.3390/nu13113960
- Mizu, M., Koumoto, K., Kimura, T., Sakurai, K. ve Shinkai, S. (2003). Polysaccharide-Polynucleotide Complexes Part 17. Solvent Effects on Conformational-Transition of Polydeoxyadenylic Acid in the Complexes with Schizophyllan. *Polymer Journal*, 35(9), 714–720.
- Mocellin, S., Marincola, F. M. ve Young, H. A. (2005). Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *Journal of Leukocyte Biology*, 78(5), 1043–1051. doi:10.1189/jlb.0705358
- Mocellin, S., Marincola, F., Rossi, C. R., Nitti, D. ve Lise, M. (2004). The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: Putting together the pieces of a puzzle. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 15(1), 61–76. doi:10.1016/j.cytogfr.2003.11.001
- Mohammed, A. S. A., Naveed, M. ve Jost, N. (2021). Polysaccharides; Classification, Chemical Properties, and Future Perspective Applications in Fields of Pharmacology and Biological Medicine (A Review of Current Applications and Upcoming Potentialities). *Journal of Polymers and the Environment*, 29(8), 2359–2371. doi:10.1007/s10924-021-02052-2
- Monks, N. R., Lerner, C., Henriques, A. T., Farias, F. M., Schapoval, E. E. S., Suyenaga, E. S., ... Mothes, B. (2002). Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, southern Brazil. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 281(1–2), 1–12. doi:10.1016/S0022-0981(02)00380-5
- Monteagudo-Mera, A., Rastall, R. A., Gibson, G. R., Charalampopoulos, D. ve Chatzifragkou, A. (2019). Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(16), 6463–6472. doi:10.1007/s00253-019-09978-7
- Movasaghi, Z., Rehman, S. ve Rehman, I. U. (2008). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43(2), 134–179. doi:10.1080/05704920701829043
- Mshelia, D. S. (2004). Role of Free Radicals In Pathogenesis of Diabetes Nephropathy. *Annals of African Medicine*, 3(2), 55–62.

- Münzberg, J., Rau, U. ve Wagner, F. (1995). Investigations on the regioselective hydrolysis of a branched  $\beta$ -1,3-glucan. *Carbohydrate Polymers*, 27(4), 271–276. doi:10.1016/0144-8617(95)00069-0
- Murphy, E. J., Rezoagli, E., Major, I., Rowan, N. J. ve Laffey, J. G. (2020).  $\beta$ -Glucan Metabolic and Immunomodulatory Properties and Potential for Clinical Application. *Journal of Fungi* 2020, Vol. 6, Page 356, 6(4), 356. doi:10.3390/JOF6040356
- Musso, G., Gambino, R. ve Cassader, M. (2011). Interactions between gut microbiota and host metabolism predisposing to obesity and diabetes. *Annual review of medicine*, 62, 361–380. doi:10.1146/ANNUREV-MED-012510-175505
- Neun, B. W., Cedrone, E., Potter, T. M., Crist, R. M. ve Dobrovolskaia, M. A. (2020). Detection of beta-glucan contamination in nanotechnology-based formulations. *Molecules*, 25(15), 1–16. doi:10.3390/molecules25153367
- Nicolosi, R., Bell, S. J., Bistrain, B. R., Greenberg, I., Forse, R. A. ve Blackburn, G. L. (1999). Plasma lipid changes after supplementation with  $\beta$ -glucan fiber from yeast. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70(2), 208–212. doi:10.1093/AJCN.70.2.208
- Nie, X., Shi, B., Ding, Y. ve Tao, W. (2006). Preparation of a chemically sulfated polysaccharide derived from *Grifola frondosa* and its potential biological activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 39(4–5), 228–233. doi:10.1016/j.ijbiomac.2006.03.030
- Nilsson, U., Johansson, M., Nilsson, Å., Björck, I. ve Nyman, M. (2008). Dietary supplementation with  $\beta$ -glucan enriched oat bran increases faecal concentration of carboxylic acids in healthy subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, 62(8), 978–984. doi:10.1038/sj.ejcn.1602816
- Nishiyama, K., Sugiyama, M. ve Mukai, T. (2016). Adhesion properties of lactic acid bacteria on intestinal mucin. *Microorganisms*, 4(3), 1–18. doi:10.3390/microorganisms4030034
- Noss, I., Doekes, G., Thorne, P. S., Heederik, D. J. ve Wouters, I. M. (2013). Comparison of the potency of a variety of  $\beta$ -glucans to induce cytokine production in human whole blood. *Innate Immunity*, 19(1), 10–19. doi:10.1177/1753425912447129
- Novak, M. ve Vetvicka, V. (2008, Ocak).  $\beta$ -glucans, history, and the present: Immunomodulatory aspects and mechanisms of action. *Journal of Immunotoxicology*. doi:10.1080/15476910802019045
- Oberoi, H. S., Babbar, N., Sandhu, S. K., Dhaliwal, S. S., Kaur, U., Chadha, B. S. ve Bhargav, V. K. (2012). Ethanol production from alkali-treated rice straw via simultaneous saccharification and fermentation using newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(4), 557–566. doi:10.1007/s10295-011-1060-2
- Okay, S., Özdal, M. ve Kurbanoglu, E. B. (2013). Characterization, antifungal activity, and cell immobilization of a chitinase from *Serratia marcescens* MO-1. *Turkish Journal of Biology*, 37(6), 639–644. doi:10.3906/biy-1208-45

- Ooi, V. E. ve Liu, F. (2000). Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Curr Med Chem*, 7, 715–729.
- Ookushi, Y., Sakamoto, M. ve Azuma, J. (2006). Optimization of Microwave-assisted Extraction of Polysaccharides from the Fruiting Body of Mushrooms. *Journal of Applied Glycoscience*, 53(4), 267–272. doi:10.5458/JAG.53.267
- Ortega-Toro, R., Santagata, G., Gomez D'Ayala, G., Cerruti, P., Talens Oliag, P., Chiralt Boix, M. A. ve Malinconico, M. (2016). Enhancement of interfacial adhesion between starch and grafted poly( $\epsilon$ -caprolactone). *Carbohydrate Polymers*, 147, 16–27. doi:10.1016/J.CARBPOL.2016.03.070
- Otero MC, N.-M. M. (2007). Lactobacillus adhesion to epithelial cells from bovine vagina.. A. Méndez-Vilas (Ed.) FORMATEX 20007, Badajoz Spain pp. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, (May 2014), 749–757.
- Othman, R. A., Moghadasian, M. H. ve Jones, P. J. H. (2011). Cholesterol-lowering effects of oat  $\beta$ -glucan. *Nutrition Reviews*, 69(6), 299–309. doi:10.1111/j.1753-4887.2011.00401.x
- Öztürk, H. (2008). Ruminant Beslenmesinde Probiyotik Mayalar. *Veteriner Hekim Dergisi*, 79(3), 37–42.
- Percival, M. (1996). Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights*, 1(96), 1–4.
- Péter, G., Takashima, M. ve Cadež, N. (2017). Yeast habitats: Different but global. *Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology* içinde (ss. 39–71). Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-61575-2\_2/TABLES/2
- Pham-Huy, L. A., He, H. ve Pham-Huy, C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science*, 4(2), 89–96. www.ijbs.org adresinden erişildi.
- Pisoschi, A. M. ve Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74. doi:10.1016/j.ejmech.2015.04.040
- Plaza-Diaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M. ve Gil, A. (2019). Mechanisms of Action of Probiotics. *Advances in Nutrition*, 10, S49–S66. doi:10.1093/advances/nmy063
- Pyrzyska, K. ve Pe, A. (2013). Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical Methods*, 5, 4288–4295. doi:10.1039/c3ay40367j
- Queenan, K. M., Stewart, M. L., Smith, K. N., Thomas, W., Fulcher, R. G. ve Slavin, J. L. (2007). Concentrated oat  $\beta$ -glucan, a fermentable fiber, lowers serum cholesterol in hypercholesterolemic adults in a randomized controlled trial. *Nutrition Journal*, 6(6), 1–8. doi:10.1186/1475-2891-6-6

- Queiroz, E. A. I. F., Fortes, Z. B., Da Cunha, M. A. A., Barbosa, A. M., Khaper, N. ve Dekker, R. F. H. (2015). Antiproliferative and pro-apoptotic effects of three fungal exocellular  $\beta$ -glucans in MCF-7 breast cancer cells is mediated by oxidative stress, AMP-activated protein kinase (AMPK) and the Forkhead transcription factor, FOXO3a. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 67, 14–24. doi:10.1016/J.BIOCEL.2015.08.003
- Raffaele Badolato, B., Ming Wang, J., Murphy, W. J., Michiel, D. F., Bausserman, L. L., Kelvin, D. J. ve Oppenheim, J. J. (1994). Serum Amyloid A Is a Chemoattractant: Induction Migration, Adhesion, and Tissue Infiltration of Monocytes and Polymorphonuclear Leukocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 180(1), 203–209. <http://rupress.org/jem/article-pdf/180/1/203/1105379/203.pdf> adresinden erişildi.
- Rani, R. P., Anandharaj, M. ve David Ravindran, A. (2018). Characterization of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus gasseri* FR4 and demonstration of its in vitro biological properties. *International journal of biological macromolecules*, 109, 772–783. doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2017.11.062
- Reaven, P. D., Khouw, A., Beltz, W. F., Parthasarathy, S. ve Witztum, J. L. (1993). Effect of Dietary Antioxidant Combinations in Humans Protection of LDL by Vitamin E but Not by  $\beta$ -Carotene. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 13(4), 590–599. <http://ahajournals.org> adresinden erişildi.
- Rebello, S., Abraham, A., Madhavan, A., Sindhu, R., Binod, P., Karthika Bahuleyan, A., ... Pandey, A. (2018). Non-conventional yeast cell factories for sustainable bioprocesses. *FEMS Microbiology Letters*, 365(21), 1–10. doi:10.1093/femsle/fny222
- Reed, G. ve Nagodawithana, T. W. (1991). Yeast-Derived Products. *Yeast Technology* içinde (ss. 369–412). Springer, Dordrecht. doi:10.1007/978-94-011-9771-7\_9
- Reinheimer, J. A., Demkow, M. R. ve Candiotti, M. C. (1990). Inhibition of coliform bacteria by lactic cultures. *Australian Journal of Dairy Technology*, 45(1), 5–9.
- Rendueles, O., Kaplan, J. B. ve Ghigo, J. M. (2013). Antibiofilm polysaccharides. *Environmental Microbiology*, 15(2), 334–346. doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02810.x
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M. ve Pridham, J. B. (1995). The Relative Antioxidant Activities of Plant-Derived Polyphenolic Flavonoids. *Free Radical Research*, 22(4), 375–383.
- Rodriguez-Morales, A. J., Cardona-Ospina, J. A., Gutiérrez-Ocampo, E., Villamizar-Peña, R., Holguin-Rivera, Y., Escalera-Antezana, J. P., ... Sah, R. (2020). Clinical, laboratory and imaging features of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 34, 1–13. doi:10.1016/j.tmaid.2020.101623
- Rosa, C. ve Gábor, P. (2006). *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Springer.
- Russell, I. ve Stewart, G. (1998). *An Introduction to Brewing Science & Technology - Brewer's Yeast. An Introduction to Brewing Science & Technology - Brewer's Yeast. London: The Institute of Brewing.*

- Russo, P., López, P., Capozzi, V., de Palencia, P. F., Dueñas, M. T., Spano, G. ve Fiocco, D. (2012). Beta-glucans improve growth, viability and colonization of probiotic microorganisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(5), 6026–6039. doi:10.3390/ijms13056026
- Sah, B. N. P., Vasiljevic, T., McKechnie, S. ve Donkor, O. N. (2014). Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yogurt. *Food Chemistry*, 156, 264–270. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2014.01.105
- Samlaska, C. P. ve Winfield, E. A. (1994). Pentoxifylline. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 30(4), 603–621. doi:10.1016/S0190-9622(94)70069-9
- Sandasi, M., Leonard, C. M. ve Viljoen, A. M. (2010). The in vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 50(1), 30–35. doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02747.x
- Šandula, J., Kogan, G., Kačuráková, M. ve MacHová, E. (1999). Microbial (1→3)- $\beta$ -D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. *Carbohydrate Polymers*, 38(3), 247–253. doi:10.1016/S0144-8617(98)00099-X
- Sarikaya, H., Aslim, B. ve Yuksekdog, Z. (2017). Assessment of anti-biofilm activity and bifidogenic growth stimulator (BGS) effect of lyophilized exopolysaccharides (1-EPSs) from *Lactobacilli* strains. *INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD PROPERTIES*, 20(2), 362–371. doi:10.1080/10942912.2016.1160923
- Scheibmeir, H. D., Christensen, K., Whitaker, S. H., Jegaethesan, J., Clancy, R. ve Pierce, J. D. (2005). A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive and Critical Care Nursing*, 21(1), 24–28. doi:10.1016/j.iccn.2004.07.007
- Selvamani, S., El-Enshasy, H. A., Dailin, D. J., Malek, R. A., Hanapi, S. Z., Kumar Ambehatabi, K., ... Moloi, N. (2018). Antioxidant Compounds of the Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus*. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 7, 1–14.
- Sharma, O. P. ve Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4), 1202–1205. doi:10.1016/j.foodchem.2008.08.008
- Shi, F., Shi, J. ve Li, Y. (2014). Mechanochemical phosphorylation and solubilisation of  $\beta$ -D-glucan from yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its biological activities. *Plos One*, 9(7), 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0103494
- Siciliano, R. A., Reale, A., Fiorella Mazzeo, M., Morandi, S., Silvetti, T., Brasca, M. ve Romero-Pérez, M. (2021a). Paraprobiotics: A New Perspective for Functional Foods and Nutraceuticals. *Nutrients*, 13(1225), 1–19. doi:10.3390/nu13041225
- Siciliano, R. A., Reale, A., Fiorella Mazzeo, M., Morandi, S., Silvetti, T., Brasca, M. ve Romero-Pérez, M. (2021b). Paraprobiotics: A New Perspective for Functional Foods and Nutraceuticals. doi:10.3390/nu13041225

- Siciliano, R. A., Reale, A., Mazzeo, M. F., Morandi, S., Silvetti, T. ve Brasca, M. (2021). Paraprobiotics: A new perspective for functional foods and nutraceuticals. *Nutrients*, 13(4), 1–19. doi:10.3390/nu13041225
- Şöhretoğlu, D. ve Kuruüzüm Uz, A. (2015).  $\beta$ -Glukanlar ve İmmün Sistem. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 35(2), 103–115.
- Soyuçok, A., Ekiz, T. ve Başyigit Kılıç, G. (2016). Ekzopolisakkaritlerin Özellikleri ve Gıda Sanayindeki Önemi. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 5, 332–332. doi:10.17100/nevbiltek.211029
- Soyuçok, A., Ekiz, T. ve Kılıç, G. B. (2016). Ekzopolisakkaritlerin Özellikleri ve Gıda Sanayindeki Önemi. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi TARGİD Özel Sayı*, 332–344. doi:10.17100/nevbiltek.211029
- Srinivasan, R., Santhakumari, S., Poonguzhali, P., Geetha, M., Dyavaiah, M. ve Xiangmin, L. (2021). Bacterial Biofilm Inhibition: A Focused Review on Recent Therapeutic Strategies for Combating the Biofilm Mediated Infections. *Frontiers in Microbiology*, 12(May), 1–19. doi:10.3389/fmicb.2021.676458
- Steinke, J. W. ve Borish, L. (2006). Cytokines and chemokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(2), 441–445. doi:10.1016/j.jaci.2005.07.001
- Stier, H., Ebbeskotte, V. ve Gruenwald, J. (2014). Immune-modulatory effects of dietary Yeast Beta-1,3/1,6-D-glucan. *Nutrition Journal*, 13(1), 1–9. doi:10.1186/1475-2891-13-38/TABLES/2
- Sucher R. E, Robbins E. A., Sidoti D. R., Schuldt Jr. E. H., S. R. D. (2002). Glucan From Spent Brewer's Yeast: Preparation, Analysis and Use As a Potential Immunostimulant in Shrimp Feed. *World Journal of Microbiology and Biotechnology volume*, 18, 527–539.
- Sun, J., Le, G. W., Shi, Y. H. ve Su, G. W. (2007). Factors involved in binding of *Lactobacillus plantarum* Lp6 to rat small intestinal mucus. *Letters in Applied Microbiology*, 44(1), 79–85. doi:10.1111/J.1472-765X.2006.02031.X
- Sun, Z., Shi, C., Wang, X., Fang, Q. ve Huang, J. (2017). Synthesis, characterization, and antimicrobial activities of sulfonated chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 155, 321–328. doi:10.1016/j.carbpol.2016.08.069
- Synytsya, A., Míčková, K., Synytsya, A., Jablonský, I., Spěváček, J., Erban, V., ... Čopíková, J. (2009a). Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers*, 76(4), 548–556. doi:10.1016/j.carbpol.2008.11.021
- Synytsya, A., Míčková, K., Synytsya, A., Jablonský, I., Spěváček, J., Erban, V., ... Čopíková, J. (2009b). Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers*, 76(4), 548–556. doi:10.1016/J.CARBPOL.2008.11.021
- Synytsya, A. ve Novak, M. (2014). Structural analysis of glucans. *Ann Transl Med*, 2(2), 17. doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2014.02.07

- Tandon, V. R., Sharma, S., Mahajan, A. ve Bardi, G. H. (2005). Oxidative Stress : A Novel Strategy in Cancer Treatment. *JK Sci*, 7(1), 1–3.
- Taverniti, V. ve Guglielmetti, S. (2011). The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: Proposal of paraprobiotic concept). *Genes and Nutrition*, 6(3), 261–274. doi:10.1007/s12263-011-0218-x
- Teame, T., Wang, A., Xie, M., Zhang, Z., Yang, Y., Ding, Q., ... Zhou, Z. (2020). Paraprobiotics and Postbiotics of Probiotic Lactobacilli, Their Positive Effects on the Host and Action Mechanisms: A Review. *Frontiers in Nutrition*, 7, 1–16. doi:10.3389/fnut.2020.570344
- Thammakiti, S., Supphantharika, M., Phaesuwan, T. ve Verduyn, C. (2004). Preparation of spent brewer's yeast  $\beta$ -glucans for potential applications in the food industry. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 21–29.
- Tharanathan, R. N. ve Kittur, F. S. (2003). Chitin - The Undisputed Biomolecule of Great Potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(1), 61–87. doi:10.1080/10408690390826455
- Tiwari, A. ve Jatawa, S. K. (2011). Free Radicals and Antioxidants: A Review. *Journal of Pharmacy Research*, 4(12), 4340–4343. www.jpronline.info adresinden erişildi.
- Tokmak, D. (2017). *TNBS ile Oluşturulmuş Deneysel Kolit Modelinde Beta Glukanın Etkisi*.
- Tsiapali, E., Whaley, S., Kalbfleisch, J., Ensley, H. E., William Browder, ‡ I ve Williams, D. L. (2001). Glucans Exhibit Weak Antioxidant Activity, But Stimulate Macrophage Free Radical Activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(4), 393–402.
- Ullah, S., Khalil, A. A., Shaukat, F. ve Song, Y. (2019). Sources, extraction and biomedical properties of polysaccharides. *Foods*, 8(8), 1–23. doi:10.3390/foods8080304
- Upadhyaya, L., Singh, J., Agarwal, V. ve Tewari, R. P. (2014). The implications of recent advances in carboxymethyl chitosan based targeted drug delivery and tissue engineering applications. *Journal of Controlled Release*, 186, 54–87. doi:10.1016/j.jconrel.2014.04.043
- Urbancikova, I., Hudackova, D., Majtan, J., Rennerova, Z., Banovcin, P. ve Jesenak, M. (2020). Efficacy of Pleuran ( $\beta$ -Glucan from *Pleurotus ostreatus*) in the Management of Herpes Simplex Virus Type 1 Infection. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2020, 1–8. doi:10.1155/2020/8562309
- Varelas, V., Liouni, M., Calokerinos, A. C. ve Nerantzis, E. T. (2016). An evaluation study of different methods for the production of  $\beta$ -D-glucan from yeast biomass. *Drug Testing and Analysis*, 8(1), 47–56. doi:10.1002/dta.1833
- Vetvicka, V., Vannucci, L., Sima, P. ve Richter, J. (2019, 30 Mart). Beta glucan: Supplement or drug? From laboratory to clinical trials. *Molecules*. MDPI AG. doi:10.3390/molecules24071251
- Vinay, D. S. ve Kwon, B. S. (2012). Immunotherapy of cancer with 4-1BB. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(5), 1062–1070. doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0677

- Wang, M., Zhang, L., Yang, R., Fei, C., Wang, X., Zhang, K., ... Xue, F. (2016). Improvement of immune responses to influenza vaccine (H5N1) by sulfated yeast beta-glucan. *International Journal of Biological Macromolecules*, *93*, 203–207. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.06.057
- Wang, X., Fan, D., Cao, X., Ye, Q., Wang, Q., Zhang, M. ve Xiao, C. (2022). The Role of Reactive Oxygen Species in the Rheumatoid Arthritis-Associated Synovial Microenvironment. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *11*(6). doi:10.3390/ANTIOX11061153
- Wang, Yihai, Xiang, L., Wang, C., Tang, C. ve He, X. (2013). Antidiabetic and antioxidant effects and phytochemicals of mulberry fruit (*Morus alba* L.) polyphenol enhanced extract. *PloS One*, *8*(7), 1–10. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0071144
- Wang, Yongjiang, Mo, Q., Li, Z., Lai, H., Lou, J., Liu, S. ve Mao, J. (2012). Effects of degree of carboxymethylation on physicochemical and biological properties of pachyman. *International Journal of Biological Macromolecules*, *51*(5), 1052–1056. doi:10.1016/j.ijbiomac.2012.08.022
- Wang, Z., Ying, J., Xu, J., Yuan, P., Duan, J., Bai, H., ... Wang, J. (2020). Safety, Antitumor Activity, and Pharmacokinetics of Toripalimab, a Programmed Cell Death 1 Inhibitor, in Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A Phase 1 Trial. *JAMA network open*, *3*(10), e2013770. doi:10.1001/JAMANETWORKOPEN.2020.13770
- Williams, D. L., Pretus, H. A., Mcnamee, R. B., Jones, E. L., Ensley, H. E., Browder, I. W., ... Williams, D. L. (1991). Development, physicochemical characterization and preclinical efficacy evaluation of a water soluble glucan sulfate derived from *Saccharomyces cerevisiae*. *Immunopharmacology*, *22*, 139–156.
- Williams, N. T. (2010). Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy*, *67*(6), 449–458. doi:10.2146/AJHP090168
- Wong, M., Ziring, D., Korin, Y., Desai, S., Kim, S., Lin, J., ... Singh, R. R. (2008). TNF $\alpha$  blockade in human diseases: Mechanisms and future directions. *Clinical Immunology*, *126*(2), 121–136. doi:10.1016/j.clim.2007.08.013
- Worrasinchai, S., Suphantharika, M., Pinjai, S. ve Jamnong, P. (2006).  $\beta$ -Glucan prepared from spent brewer's yeast as a fat replacer in mayonnaise. *Food Hydrocolloids*, *20*(1), 68–78. doi:10.1016/J.FOODHYD.2005.03.005
- Xia, S., Zhai, Y., Wang, X., Fan, Q., Dong, X., Chen, M. ve Han, T. (2021). Phosphorylation of polysaccharides: A review on the synthesis and bioactivities. *International Journal of Biological Macromolecules*, *184*, 946–954. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.06.149
- Xu, H., Zou, S., Xu, X. ve Zhang, L. (2016). Anti-tumor effect of  $\beta$ -glucan from *Lentinus edodes* and the underlying mechanism. *Nature Publishing Group*, *6*(28802), 1–13. doi:10.1038/srep28802
- Xu, T., Xin, M., Li, M., Huang, H., Zhou, S. ve Liu, J. (2011). Synthesis, characterization, and antibacterial activity of N,O-quaternary ammonium chitosan. *Carbohydrate Research*, *346*(15), 2445–2450. doi:10.1016/j.carres.2011.08.002

- Yamashita, K., Ougolkov, A. V., Nakazato, H., Ito, K., Ohashi, Y., Kitakata, H., ... Minamoto, T. (2007). Adjuvant immunochemotherapy with protein-bound polysaccharide K for colon cancer in relation to oncogenic  $\beta$ -catenin activation. *Diseases of the Colon and Rectum*, 50(8), 1169–1181. doi:10.1007/s10350-006-0842-5
- Yangıar, F. (2015). Use of Probiotic Microorganisms for Bio-Protective Aims. *Uludağ University Journal of The Faculty of Engineering*, 20(1), 119. doi:10.17482/uujfe.16850
- Yeşilova, Y., Sula, B., Yavuz, E., Uçmak, D., Devlet Hastanesi, S., Kliniği, D., ... Devlet Hastanesi, B. (2010). Probiyotikler. *Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi*, 21(1), 49–56.
- Yiğit, N. ve Benli, M. (2005). Maya Hücre Duvar Yapısının Dinamikleri. *Orlab on-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 03, 11–17. <http://www.mikrobiyoloji.org/pdf/702050303.pdf> adresinden erişildi.
- Young, S. H., Ye, J., Frazer, D. G., Shi, X. ve Castranova, V. (2001). Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha production in 1 $\rightarrow$ 3-beta-glucan (zymosan)-activated macrophages. *The Journal of biological chemistry*, 276(23), 20781–20787. doi:10.1074/JBC.M101111200
- Yuan, H., Lan, P., He, Y., Li, C. ve Ma, X. (2020). Effect of the modifications on the physicochemical and biological properties of  $\beta$ -glucan-a critical review. *Molecules*, 25(57), 1–21. doi:10.3390/molecules25010057
- Yun, J. C., Lee, S., Mi, A. Y. ve Hyeon, G. L. (2006). Structural and biological characterization of sulfated-derivatized oat  $\beta$ -glucan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 3815–3818. doi:10.1021/JF060243W/ASSET/IMAGES/LARGE/JF060243WF00003.JPEG
- Zhang, M., Cui, S. W., Cheung, P. C. K. ve Wang, Q. (2007). Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science and Technology*, 18(1), 4–19. doi:10.1016/J.TIFS.2006.07.013
- Zhao, D., Huang, J., Hu, S., Mao, J. ve Mei, L. (2011). Biochemical activities of N,O-carboxymethyl chitosan from squid cartilage. *Carbohydrate Polymers*, 85(4), 832–837. doi:10.1016/j.carbpol.2011.04.007
- Zhu, Z. Y., Dong, F., Liu, X., Lv, Q., Yingyang, Liu, F., ... Zhang, Y. (2016). Effects of extraction methods on the yield, chemical structure and anti-tumor activity of polysaccharides from *Cordyceps gunnii* mycelia. *Carbohydrate Polymers*, 140, 461–471. doi:10.1016/j.carbpol.2015.12.053
- Zi, Y., Jiang, B., He, C. ve Liu, L. (2020). Lentinan inhibits oxidative stress and inflammatory cytokine production induced by benzo(a)pyrene in human keratinocytes. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 19(2), 502–507. doi:10.1111/jocd.13005





*Gazili olmak ayrıcalıktır*