ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

S. cerevisiae MAYASINDAN BETA GLUKAN ÜRETİMİNDE KULLANILAN EKSTRAKSİYON YÖNTEMİNİN VERİME ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Fatma KARSLIOĞLU

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2021

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

S. cerevisiae MAYASINDAN BETA GLUKAN ÜRETİMİNDE KULLANILAN EKSTRAKSİYON YÖNTEMİNİN VERİME ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Fatma KARSLIOĞLU

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç Dr. Suna ERTUNÇ

Beta glukan, D-glikoz monomerlerinin beta glikozidik bağlarla birbirine bağlanmasıyla oluşan polisakkarittir. Beta glukanın özellikleri elde edildiği kaynağa, ekstraksiyon ve saflaştırma yöntemlerine göre değişmektedir. Bu kapsamda, tez çalışmasında üç farklı ekstraksiyon yöntemiyle *S. cerevisiae* mayasından beta glukan üretilmiştir ve analiz edilmiştir. Ultrasonik destekli alkali asidik ekstraksiyon yönteminin ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve çözücü/katı oranı koşulları Box – Behnken deneysel tasarım yöntemi kullanılarak optimize edilmiştir. Ekstraksiyon yönteminin optimum koşulları 95°C, 30 dk ve 0.007 v/w olarak bulunmuştur. Otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyon yönteminin tampon/katı oranı ve otoliz süresi ekstraksiyon koşulları tam faktöriyel deneysel tasarım yöntemi kullanılarak optimize edilmiştir. Ekstraksiyon yönteminin optimum koşulları 0.01 v/w ve 48 saat olarak elde edilmiştir. Her iki yöntem de yanıtlar beta glukan verimi ve saflığı olarak belirlenmiştir. Sayısal optimizasyon yöntemi olan istenebilirlik fonksiyonuyla her iki ekstraksiyon yöntemi için bulunan optimum koşullarda tekrar deneyleri yapılmıştır. Beta glukanın saflıkları antron-sülfürik asit ve enzimatik; protein derişimleri Bradford ve karakterizasyonu FTIR ve molekül kütleleri SLS analiziyle bulunmuştur. Optimum koşullarda ultrasonik destekli alkali asidik ekstraksiyon yönteminden elde edilen beta glukan verimi % 12.86 ve saflığı ise % 48.6; otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyondan elde edilen beta glukan verimi % 28.34 ve saflığı ise % 15.4 bulunmuştur. Soxhlet ekstraksiyon yönteminde ise ekstraksiyon süresi optimize edilerek beta glukan saflığı en yüksek % 9.2 ve verimi 52.3 elde edilmiştir. Kullanılan üç farklı ekstraksiyon yönteminin sonuçları karşılaştırılarak; beta glukan veriminin ve saflığının yüksek olması, uygulaması daha kolay, ekstraksiyon süresinin kısa olmasından dolayı üç yöntem arasında en iyi yöntem ultrasonik destekli alkali asidik ekstraksiyon yöntemi olarak değerlendirilmiştir.

Temmuz 2021, 129 sayfa

Anahtar Kelimeler: Beta glukan, maya, ekstraksiyon, istatistiksel deneysel tasarım, verim, saflık, molekül kütlesi

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF EXTRACTION METHOD USED IN BETA GLUCAN PRODUCTION FROM *S.cerevisiae* YEAST

Fatma KARSLIOĞLU

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemical Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Suna ERTUNÇ

Beta glucan is polysaccharide consisting of beta glycosidic bonds with glucose. Properties of beta glucan changes according to source, extraction and purification methods. Beta glucan was produced from *S.cerevisiae* yeast using three different extraction methods in this thesis. Extraction temperature, extraction time and solvent/solid which are extraction conditions of ultrasonic assested alkali acidic extraction method were optimized using Box-Behnken experimental design method. Optimum conditions of extraction methods were found as 95°C, 30 min and 0.007 v/w. Autolysis time and buffer/solid which are extraction conditions of autolysis ultrasonic assested acidic extraction method were optimized using full factorial experimental design method. Beta glucans were analyzed using anthrone-sulfuric acid, enzymatic, FTIR and SLS methods. Proteins were analyzed using Bradford method. Optimum conditions of extraction methods were found as 0.007 v/w and 48 h. Beta glucan yield and purity were determined as responses in both methods. Optimum conditions of both extraction methods were found using desirability function are one of numerical optimization and experiments were done in these conditions. Beta glucan yield and purity respectively were found % 12.86 and % 48.6 in optimum conditions of ultrasonic assested alkali and acidic extraction and were found respectively % 28.34 and % 15.4 in optimum conditions of autolysis ultrasonic assested acidic extraction. Beta glucan yield and purity were found respectively % 52.33 and % 9.2 by being optimized extraction time of Soxhlet extraction. The best method was selected ultrasonic assested alkali acidic extraction method due to being highest beta glucan yield and purity, fast, easier production.

July 2021, 129 pages

Key Words: Beta glucan, yeast, extraction, statistical experimental design, yield, purity, molecular weight

TEŞEKKÜR

Sadece çalışmamın değil hayatımın her aşamasında desteğini, önerilerini ve ilgisini esirgemeyen, yol göstermenin yanı sıra ufkumu açan sorularıyla bu yolda daha sağlam adımlarla ilerlememi sağlayan, her daim yanımda olan, iyi ki hayatımda dediğim ve örnek aldığım canım danışman hocam Sayın Doç. Dr. Suna ERTUNÇ'a, teşekkür ederim.

Çalışmamın her aşamasında ne zaman problem çıksa farklı bakış açısıyla çözüm bulan ve tecrübeleri ve bilgisiyle çalışmamda yardımcı olan hocam Prof. Dr. Bülent AKAY'a ve en yoğun zamanlarında bile yardımlarını, desteğini esirgemeyen ve umutsuz olduğum anlarda güler yüzüyle ve sohbetleriyle bana umut aşılayan canım hocam Arş. Gör. Dr. Zeynep YILMAZER HİTİT'e, teşekkür ederim.

FTIR analizlerimde desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen hocalarım Arş. Gör. Dr Ceren ATİLA DİNÇER'e ve Arş. Gör. Dr. Yavuz GÖKÇE'ye teşekkür ederim. Çalışmalarımda bana yardımcı olan hocam Arş. Gör. Dr. Baran ÖZYURT'a teşekkür ederim.

Numunelerimin öğütülmesinde bana yardımcı olan Ankara Üniversitesi YEBİM'e (Yer Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi) teşekkür ederim.

Laboratuvarda birlikte çalıştığım, beraber bir sürü güzel anılar biriktirdiğim, çalışmamda desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen canım arkadaşlarım başta Seda ÇEVİK, Sıla ELDEMİR, Gamze UZUNKÖYLÜ ve Simay ÖZKAYA olmak üzere tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımda attığım her adımda yanımda olan, desteklerini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, çalışmamda benim kadar emekleri olan, beni benden daha fazla düşünen ve seven, bugünkü ben olmamı sağlayan ve hayatımdaki en değerli varlık olan canım annem Derya KARSLIOĞLU, babam Hakkı KARSLIOĞLU, kardeşlerim Zeynep KARSLIOĞLU ve Emre KARSLIOĞLU'na en içten duygularımla teşekkür ederim ve bu tezi onlara ithaf ederim.

Bu yüksek lisans tez çalışması, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından onaylanan 20L0443002 numaralı Lisansüstü Tez Projesi kapsamında desteklenmiştir.

Fatma KARSLIOĞLU
Ankara, Temmuz 2021

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI
ETİK i
ÖZET ii
ABSTRACT iii
TEŞEKKÜR iv
SİMGELER DİZİNİ viii
ŞEKİLLER DİZİNİ x
ÇİZELGELER DİZİNİ xiii
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI 6
2.1 Beta Glukan Ekstraksiyonu 6
2.2 Ekstraksiyon Koşullarının Optimizasyonu 12
3. KURAMSAL TEMELLER 15
3.1 Beta Glukan 15
3.2 Beta Glukanın Yapısı 16
3.3 Beta Glukanın Özellikleri 19
3.3.1 Fizikokimyasal özellikler 19
3.3.2 Biyolojik aktivite 21
3.4 Beta Glukan Kaynakları 23
3.4.1 *Saccharomyces cerevisiae* (Ekmek mayası) 25
3.5 Beta Glukanın Kullanım Alanları 27
3.6 Beta Glukan Üretimi 30
3.6.1 Farklı kaynaklardan beta glukan üretim yöntemleri 31
3.6.2 Mayadan beta glukan üretiminde kullanılan yöntemler 37
3.6.3 Beta glukan verimi ve saflığı 41
3.6.4 Beta glukan üretiminde verim ve saflığı etkileyen parametreler 42
3.7 İstatistiksel Deneysel Tasarım 43
3.7.1 Yanıt yüzey yöntemi (RSM) 44
3.7.2 Box – Behnken tasarımı 45
3.7.3 Faktöriyel tasarım 47
4. MATERYAL VE YÖNTEM 48
4.1 Ön Çalışmalar 48

4.1.1 Farklı ekstraksiyon yöntemlerinin beta glukanın verimine ve molekül kütlesine etkisinin incelenmesi 48
4.1.2 Kuru ve yaş mayanın beta glukan ektstraksiyonuna etkisinin incelenmesi ... 49
4.1.3 Ticari ve laboratuvarda üretilen mayaların beta glukan verimlerinin ve saflıklarının karşılaştırılması 49
4.2 Ultrasonik Destekli Alkali – Asidik Ekstraksiyonu 50
4.2.1 *S.cerevisiae* mayasından beta glukan üretiminde ekstraksiyonda kullanılan farklı alkali çözücülerin beta glukan üretimine etkisinin incelenmesi 50
4.2.2 Ultrasonik destekli alkali-asidik ekstraksiyon yönteminin koşullarının optimizasyonu 51
4.2.3 Ultrasonik destekli alkali-asidik ekstraksiyonu yöntemi için elde edilen optimum koşulların denenmesi 53
4.3 Otoliz Ultrasonik Destekli Asidik Ekstraksiyonu 54
4.3.1 Otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyonunda kullanılan tampon çözeltisini belirleme 54
4.3.2 Otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu ... 55
4.3.3 Otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyonu yöntemi için elde edilen optimum koşulların denenmesi 57
4.4 Soxhlet Ekstraksiyonu 58
4.5 Analizler 60
4.5.1 Antron – sülfürik asit yöntemi ile beta glukan analizi 60
4.5.2 Enzimatik analiz yöntemi ile beta glukan analizi 62
4.5.3 Antron – sülfürik asit analiz ile enzimatik analiz yönteminin karşılaştırılması 65
4.5.4 Bradford analiz yöntemi 65
4.5.5 FTIR 68
4.5.6 Statik ışık saçılımı (SLS) 69
5. BULGULAR VE TARTIŞMA 70
5.1 Ön Çalışmalar 70
5.1.1 Farklı ekstraksiyon yöntemlerinin beta glukanın verimine ve molekül kütlesine etkisinin incelenmesi 70
5.1.2 Kuru ve yaş mayanın beta glukan ektstraksiyonuna etkisinin incelenmesi ... 72
5.1.3 Ticari ve laboratuvarda üretilen mayaların beta glukan verimlerinin ve saflıklarının karşılaştırılması 74
5.2 Ultrasonik Destekli Alkali – Asidik Ekstraksiyonu 75

5.2.1 Alkali çözücülerin beta glukan üretimine etkisi 75
5.2.2 Ultrasonik destekli alkali-asidik ekstraksiyonun koşullarının optimizasyonu 78
5.2.3 Ultrasonik destekli alkali - asidik ekstraksiyonu yönteminin elde edilen optimum koşulların denenmesi 94
5.3 Otoliz Ultrasonik Destekli Asidik Ekstraksiyonu 96
5.3.1 Tampon çözeltinin ekstraksiyona etkisi 96
5.3.2 Otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu ... 97
5.4 Soxhlet ekstraksiyonu 108
5.5 Ekstraksiyon Yöntemlerinin Molekül Kütlesine Etkisi 109
6. SONUÇ 111
KAYNAKLAR 116
EK SLS yöntemi analizinin sonuç grafikleri 125
ÖZGEÇMİŞ 129

SİMGELER DİZİNİ

α	Alfa
β	Beta
µm	Mikrometre
µL	Mikrolitre
°C	Santigrat derece
η	Viskozite
$	Dolar
$Ca(OH)_2$	Kalsiyum hidroksit
CH_3COOH	Asetik Asit
C_5H_5N	Piridin
$C_6H_8O_7$	Sitrik Asit
cm	Santimetre
CO_2	Karbondioksit
Da	Dalton
dk	Dakika
DMSO	Dimetilsülfoksit
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
g	gram
HCl	Hidroklorik Asit
$HClO_4$	Perklorik Asit
H_2SO_4	Sülfürik Asit
HSO_3Cl	Klorsülfonik Asit
H_3PO_4	Fosforik Asit
K_2CO_3	Potasyum Karbonat
kDa	Kilodalton
kGy	Kilo Gray
kHz	Kilohertz
KOH	Potasyum Hidroksit
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
MPa	Megapaskal
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
nm	Nanometre
$POCl_3$	Fosforil Klorür
ppm	Parts per million
rpm	Revoluation per minute
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
sn	Saniye
st	Saat
v/w	Hacim/Kütle
W	Watt
w/w	Kütle/kütle

wt	Kütle

Kısaltmalar

BBD	Box-Benkhen Tasarımı
CCCD	Sınırlı Merkezi Kompozit Tasarımı
CCRD	Döndürülebilir Merkezi Kompozit Tasarımı
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EFSA	European Food Safety Administration
FDA	Food Drug Administration
FRAP	Ferric – Reducing Antioxidant Power
FTIR	Fouirer Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrometresi
GC/MS	Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi
GPC	Jel Geçirgenlik Kromatografisi (Gel Permeation Chromatography)
GSH	Glutatyon
HPAEC-PAD	High Performance Anion Exchange Chromatograpy with Pulsed Amperometric Detection
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
IR	Infrared Spektroskopisi
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
ODTÜ	Orta Doğu Teknik Üniversitesi
PID	Proportional – Integral – Derivative Control
RSM	Yanıt Yüzey Yöntemi
SAS	Statistical Analysis System
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SLS	Statik Işık Saçınımı
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
YEBİM	Yer Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Alfa ve beta glikoz molekülleri 16

Şekil 3.2 Lineer (1→3)-β-glukanın yapısı 17

Şekil 3.3 (1→3) (1→2)-β-glukanın yapısı 17

Şekil 3.4 (1→3) (1→4)-β-D-glukanın yapısı 17

Şekil 3.5 (1→3) (1→6)-β-D-glukanın yapısı 18

Şekil 3.6 Beta glukanın bağışıklık hücreleri üzerine etkisi 21

Şekil 3.7 *Saccharomyces cerevisiae*'nın hücre duvarı 26

Şekil 3.8 Soxhlet ekstraksiyon cihazı 35

Şekil 3.9 Maksimum noktayı (a) ve minimum noktayı (b) gösteren yanıt yüzey grafikleri 45

Şekil 3.10 Box – Behnken tasarımının geometrik gösterimi 46

Şekil 4.1 Ultrasonik destekli alkali – asidik ekstraksiyon yönteminin basamakları 52

Şekil 4.2 Ekstraksiyon yöntemindeki alkali (a), asidik (b) ve etanol (c) muamelesi sonrası örnekler 53

Şekil 4.3 Otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyon yönteminin basamakları 56

Şekil 4.4 Ekstraksiyon yöntemindeki otoliz (a), asidik (b) ve etanol (c) muamelesi sonrası örnekler 57

Şekil 4.5 Soxhlet ekstraksiyon yönteminin basamakları 59

Şekil 4.6 Beta glukan üretiminde kullanılan Soxhlet ekstraksiyonun deney sistemi 60

Şekil 4.7 Antron – sülfürik asit yöntemi ile beta glukan analizinin aşamaları 61

Şekil 4.8 Antron – sülfürik asit yönteminde oluşturulan kalibrasyon grafiği 62

Şekil 4.9 Buz banyosunda bekletme (a), sıcak su banyosunda bekletme (b), GOPOD reaktif eklenip bekletme (c) işleminden sonra örnekler 63

Şekil 4.10 Alfa glukan ölçümünde enzim ekleme (a), GOPOD reaktifi eklenip bekletme (b) işleminden sonra örnekler 64

Şekil 4.11 Beta glukan saflığını hesaplayan program 64

Şekil 4.12 İki farklı analiz yöntemi arasındaki kalibrayon grafiği 65

Şekil 4.13 Bradford analiz yönteminin basamakları 66

Şekil 4.14 Alkali (a), etanol (b), tampon (c) çözücüleri için oluşturulan kalibrasyon grafikleri 67

Şekil 4.15 Ekstraksiyon yöntemlerinin alkali (a) ve etanol (b) aşamasından sonra alınan örnekler 68

Şekil 5.1 Farklı ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen beta glukanların molekül kütleleri 71

Şekil 5.2 Farklı ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen beta glukanların FTIR spektrumları 72

Şekil 5.3 Elde edilen beta glukanların FTIR spektrumları 73

Şekil 5.4 Farklı üretilen mayalardan elde edilen beta glukanların FTIR spektrumları ... 75

Şekil 5.5 Farklı çözücüler kullanılarak elde edilen beta glukanların FTIR spektrumları 77

Şekil 5.6 Beta glukan veriminin tahmini değerlerine karşı gerçek değerlerinin grafiği. 81

Şekil 5.7 Faktörlerin beta glukan verimi üzerindeki etkisini gösteren pertürbasyon grafiği 82

Şekil 5.8 Farklı çözücü/katı oranı kullanmanın beta glukan verimine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri 82

Şekil 5.9 Ekstraksiyon sıcaklığının beta glukan verimine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri 83

Şekil 5.10 Ekstraksiyon süresinin beta glukan verimine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri 84

Şekil 5.11 Beta glukan saflığının tahmini değerlerine karşı gerçek değerlerinin grafiği 86

Şekil 5.12 Faktörlerin beta glukan saflığı üzerindeki etkisini gösteren pertürbasyon grafiği 87

Şekil 5.13 Çözücü/katı oranının beta glukan saflığına etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri 88

Şekil 5.14 Ekstraksiyon sıcaklığının beta glukan saflığına etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri 89

Şekil 5.15 Ekstraksiyon süresinin beta glukan saflığına etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri 90

Şekil 5.16 Ultrasonik destekli alkali-asidik ekstraksiyonun istenebilirlik fonksiyonu yaklaşımıyla optimum değerlerinin belirlenmesi 91

Şekil 5.17 Optimizasyon sonucu elde edilen beta glukanların FTIR spektrumları 92

Şekil 5.18 Farklı ekstraksiyon koşullarından sonraki maya hücrelerinin mikroskop görüntüleri 93

Şekil 5.19 Optimum koşullar kullanılarak elde edilen beta glukanın FTIR spektrumu 95

Şekil 5.20 Beta glukanların FTIR spektrumları 97

Şekil 5.21 Faktörlerin beta glukan verimi üzerindeki etkisini gösteren pertürbasyon grafiği 100

Şekil 5.22 Beta glukan verimlerinin tahmini değerlerine karşı gerçek değerlerinin grafiği 100

Şekil 5.23 Otoliz süresinin ve tampon /katı oranının beta glukan verimine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri 101

Şekil 5.24 Beta glukan saflığının tahmini değerlerine karşı gerçek değerlerinin grafiği 103

Şekil 5.25 Faktörlerin beta glukan saflığı üzerindeki etkisini gösteren pertürbasyon grafiği 103

Şekil 5.26 Otoliz süresinin ve tampon /katı oranının beta glukan saflığına etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği 104

Şekil 5.27 Beta glukan örneklerinin FTIR spekturumları 105

Şekil 5.28 Otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyonun istenebilirlik fonksiyonu yaklaşımıyla optimum değerlerinin belirlenmesi 105

Şekil 5.29 Beta glukan örneklerinin FTIR spekturumları 107

Şekil 5.30 Beta glukan örneklerinin FTIR spektrumları 109

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Beta glukanın yapıları, kaynakları, biyolojik etkileri 23

Çizelge 3.2 Farklı beta glukan kaynakları, kimyasal yapıları ve bulundukları yerler..... 24

Çizelge 3.3 Bazı kaynakların beta glukan içerikleri 25

Çizelge 3.4 *Saccharomyces cerevisiae*'nın taksonomik sınıflandırılması 26

Çizelge 3.5 Beta glukanın gıda ve medikal alandaki uygulamaları 28

Çizelge 3.6 Beta glukanın kozmetik, yem ve diğer sağlık ürünleri alanlarındaki uygulamaları..... 29

Çizelge 3.7 Farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak mayalardan beta glukan üretimi 38

Çizelge 4.1 Ultrasonik destekli alkali-asidik ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu için oluşturulan Box-Behnken deney tasarım matrisi 51

Çizelge 4.2 Otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu için oluşturulan tam faktöriyel deney tasarım matrisi 555

Çizelge 5.1 Farklı ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen beta glukan verimlerinin karşılaştırılması 70

Çizelge 5.2 Beta glukan ve maya verimi ve miktarı 72

Çizelge 5.3 Ticari ve laboratuvarda üretilen mayadan elde edilen beta glukanların verimleri ve saflıkları 74

Çizelge 5.4 Farklı alkali çözücüler kullanılarak *S.cerevisiae* mayasından elde edilen beta glukanların verimleri ve saflıkları (pH 10)..... 76

Çizelge 5.5 Farklı alkali çözücüler kullanılarak *S.cerevisiae* mayasından elde edilen beta glukanların verimleri ve saflıkları (pH 12)..... 76

Çizelge 5.6 Ultrasonik destekli alkali-asidik ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu ile elde edilen sonuçlar 79

Çizelge 5.7 Beta glukan verimi için ANOVA tablosu..... 80

Çizelge 5.8 Beta glukan saflığı için ANOVA tablosu 85

Çizelge 5.9 Optimum koşullarla yapılan deneyler sonucu elde edilen örneklerin analiz sonuçları..... 94

Çizelge 5.10 Farklı tampon çözeltileri kullanılarak otoliz destekli asidik ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen beta glukanların verimleri ve saflıkları 96

Çizelge 5.11 Tam faktöriyel istatistiksel deneysel tasarımı ile belirlenen ekstraksiyon koşullarıyla yapılan deneylerin sonuçları 98

Çizelge 5.12 Beta glukan verimi için ANOVA tablosu.....98

Çizelge 5.13 Beta glukan saflığı için ANOVA tablosu 102

Çizelge 5.14 Optimum koşullarla yapılan deneyler sonucu elde edilen örneklerin analiz sonuçları 106

Çizelge 5.15 Farklı ekstraksiyon süreleri ile yapılan Soxhlet ekstraksiyonundan elde edilen örneklerin analiz sonuçları……108

Çizelge 5.16 Beta glukan örneklerinin statik ışık saçılımı analiz sonuçları 110

1. GİRİŞ

Günümüzde teknolojinin gelişmesiyle beraber insanlar stresli, yorucu, yoğun ve doğadan uzak bir yaşam sürmektedir. Bu durum, insanların bağışıklık sistemlerinin zayıflamasına ve daha çabuk hastalanmalarına sebep olmaktadır. Bugünün yaşam şartlarına daha kolay uyum sağlamak ve daha sağlıklı yaşamak için bilim insanları bağışıklık sistemini kuvvetlendirecek yeni, doğal ve sağlıklı ürünler üzerine araştırmalar yapmaktadır. Bu ürünlerden biri de beta glukandır.

Beta glukan çeşitli kaynaklardan elde edilen, elde edildiği kaynağa göre de (1→3) (1→2), (1→3) (1→4) ve (1→3) (1→6) dallanma yapılarına sahip bir polisakkarittir. Çeşitli dallanma yapılarına sahip olması beta glukana farklı özellikler kazandırmaktadır. Beta glukanın özellikleri genel olarak iki sınıfa ayrılır: fizikokimyasal özellikler ve biyolojik aktivite. Fizikokimyasal özellikleri; molekül kütlesi, çözünürlük, viskozite, köpürme kapasitesi ve kararlılığı ve su bağlama kapasitesi olarak ayrılabilir. Hem çözünürlük, viskozite gibi diğer fizikokimyasal özellikleri hem de biyolojik aktiviteyi etkilediği için molekül kütlesi beta glukanın en önemli fizikokimyasal özelliği denilebilmektedir. Molekül kütlesi de beta glukanın kaynağına ve elde edildiği ekstraksiyon yöntemine göre değişmektedir. Beta glukanın diğer bir ana özelliği biyolojik aktivitesidir. Biyolojik aktivite üç ana başlık altında toplanmaktadır: Antioksidan, antimikrobiyal ve antitümör aktivite. Biyolojik aktivite de molekül kütlesi, ekstraksiyon yöntemi ve kaynağa göre değişmektedir. (1→3) (1→4) dallanma yapısına sahip beta glukanlar, genelde kolestrolün düşürülmesinde, kanın pıhtılaşmasını engellemede ve antioksidan olarak etkili rol oynamaktadırlar. (1→3) (1→6) dallanma yapılarına sahip beta glukanlar ise antioksidan, antimikrobiyal ve antitümör aktiviteleri yüksektir. Biyolojik aktivite ve çözünürlük dolayısıyla molekül kütlesi özelliği birbiriyle ilişkili özelliklerdir. Örneğin; (1→3) (1→6) dallanma yapısına sahip beta glukanların çoğunun molekül kütlesi yüksek olduğu için suda çözünememektedir. Ancak, bu durum (1→3) (1→6) dallanmaya sahip beta glukanların antitümör etkisini arttırmaktadır.

Beta glukanların farklı birçok özelliğe sahip olması, yan etkisinin olmaması ve diğer ilaçlarla da birlikte kullanımının zararı olmamasından dolayı beta glukanların birçok farklı alanda kullanımı mevcuttur. Bu alanlar dört ana kategoride sınıflandırılabilmektedir: gıda, sağlık, kozmetik ve yem. Gıda da kıvam arttırıcı, yağ bağlayıcı, su tutucu ve emülsiye edici stabilizatör olarak kullanılırken sağlıkta bağışıklık kuvvetlendirici gıda takviyesi, yaraların hızlı iyileşmesinde, ameliyatlardan veya yanıklardan sonra oluşabilecek oksidatif doku hasarını engellemede ve biyomalzemelerde kullanılmaktadır. Kozmetik alanında; yaşlandırma karşıtı ve nemlendirici olarak kullanılmaktadır. Yem sanayisinde yemlere antibiyotik yerine hayvanların vücut bağışıklığını kuvvetlendirmesi için beta glukan eklenmektedir. Yeni yapılan araştırmalarla da yeni kullanım alanları keşfedilmektedir.

Tahıllar (arpa, yulaf ve buğday), mikroorganizmalar (maya, bakteri ve mantar) ve şapkalı mantarlar olmak üzere beta glukan farklı üç ana kaynaktan elde edilmektedir. Genellikle, tahılların besi dokusunun hücre duvarında, mikroorganizmaların ve şapkalı mantarların da hücre duvarlarında bulunmaktadır. Farklı kaynaklar farklı dallanma yapılarına sahiplerdir. Tahıllar, (1→3) (1→4) dallanma yapılı beta glukan, mikroorganizmalarda (1→3) (1→2) ve (1→3) (1→6) dallanma yapılı beta glukanlar bulunmaktadır. Şapkalı mantarlar da ise hem (1→3) (1→4) hem de (1→3) (1→6) dallanma yapılı beta glukanlar mevcuttur. Kaynakların arasında en çok beta glukan içeriğine sahip kaynak *S. cerevisiae* mayasıdır.

S. cerevisiae diğer ismiyle ekmek mayası hücresinin yaklaşık % 8 – 16 (w/w)'sını oluşturan beta glukan (1→3) (1→6) dallanma yapısına sahiptir. Ekmek mayasından elde edilen beta glukan birçok biyolojik aktivite göstermektedir. Özellikle bağışıklık kuvvetlendirici olarak kullanılan gıda takviyesinde ekmek mayasından elde edilen beta glukan kullanılmaktadır. Bu kadar önemli bir kaynaktan beta glukanın ekstraksiyonu da kolay olmamaktadır. Çünkü, mayanın hücre duvarında beta glukan dışında en temelde mannoproteinler, kitin ve yağlar bulunmaktadır.

Geniş kullanım alanı ve farklı etkileri olan beta glukanın iki ana üretim yöntemi vardır. Bunlar, mikroorganizmadan beta glukan üretimi ve tahıllardan veya şapkalı mantarlardan beta glukan üretimidir. İki yöntemin ortak basamakları; ekstraksiyon, saflaştırma ve kurutmadır.

Beta glukan üretimindeki ekstraksiyon ve saflaştırma basamakları önemlidir. Bu basamaklar, üretilen beta glukanın molekül kütlesini ve saflığını etkilediği için dolayısıyla diğer fizikokimyasal özelliklerini, biyolojik aktivitelerini ve kullanım alanlarını etkilemektedir. Kaynakların farklı olması, yüksek verim ve saflıkta ve istenilen molekül kütlesi aralığında beta glukan elde etmek için alkali – asidik, ultrasonik destekli, mikrodalga destekli süperkritik akışkan, sıcak su gibi farklı birçok ekstraksiyon yöntemi denenmiştir.

Ekstraksiyon yöntemi değiştikçe beta glukan verimini, saflığını ve molekül kütlesini etkileyen parametreler de değişmektedir. En yüksek verim ve saflığı ekonomik bir şekilde elde etmek için ekstraksiyonu etkileyen parametrelerin tespit edilmesi ve optimizasyonu yapılması gerekmektedir. Günümüzde optimizasyonu yapan tasarım yöntemleri mevcuttur ve bunlara istatistiksel deneysel tasarım yöntemleri denilmektedir. Box – Behnken, merkezi kompozit, faktöriyel gibi tasarım yöntemleri mevcuttur.

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, *S.cerevisiae* maya hücre duvarından farklı ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen beta glukanın miktarı ve veriminin değiştiğinden hareketle *S.cerevisiae* mayasından en yüksek beta glukan verimini elde etmek amacıyla seçilen ekstraksiyon yöntemlerinin optimizasyonu amaçlanmaktadır. Bu amaçla, ekonomik ve uygulama kolaylığı açısından farklı ekstraksiyon yöntemleri öncelikle değerlendirilip, seçilen ekstraksiyon yöntemleri için istatistiksel analize dayalı optimizasyon ile ekstraksiyon koşulları, beta glukan verimini maksimize etmek üzere optimize edilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla, ilk olarak optimize edilecek yöntemler literatür araştırması ve ön çalışmalar yapılarak karar verilmiştir. Ekonomik, uygulama kolaylığı olan, çevreye en az zarar veren, enerji tasarrufu sağlayan üç tane yöntem belirlenmiştir. Bu yöntemler; ultrasonik destekli alkali – asidik ekstraksiyonu, otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyonu ve Soxhlet ekstraksiyonudur. Mayalardan beta glukan eldesinde Soxhlet ekstraksiyonunun kullanılmamış olması da bu yöntemin seçiminde için etkili olmuştur. Bu ekstraksiyon yöntemleriyle ilgili yapılan ön çalışmalarda molekül kütlesinin ekstraksiyon yöntemine göre değiştiği kanıtlanmıştır. Buna göre tez kapsamında beta glukanların molekül kütlesi de analiz ettirilmiştir.

Ön çalışmalardan sonra ultrasonik destekli alkali – asidik ekstraksiyonda alkali kısmında kullanılacak çözücü tespit edilmiştir. Ultrasonik destekli alkali – asidik ekstraksiyonun optimize edilecek koşulları literatürde yapılan araştırmalar sonucunda karar verilmiştir. Ekstraksiyon süresi, ekstraksiyon sıcaklığı ve çözücü/katı oranı ekstraksiyon koşulları Box – Behnken deneysel tasarım kullanılarak optimize edilmiştir. Tasarımın yanıtları beta glukan verimi ve saflığıdır. Bu kapsamda; üç faktörlü, üç seviyeli, iki yanıtlı ve üç tekrarlı deney tasarım matrisi oluşturulup deneyler yapılmış ve istatistiksel analiz edilmiştir. Her bir deneyden elde edilen beta glukan örneklerine antron – sülfürik asit yöntemi uygulanarak beta glukanların saflığı ve FTIR (Fouirer Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrometresi) analizleri yapılarak karakterizasyonu yapılmıştır. Optimum belirlenen koşullarda tekrar deneyi yapılmıştır ve elde edilen beta glukan örneklerine antron – sülfürik asit, FTIR, enzimatik beta glukan analizi, süpernatant örneklerindeki proteinler için Bradford yöntemi analizleri yaptırılmış ve elde edilen beta glukan örneklerinin molekül kütlelerinin belirlenmesi için ODTÜ (Orta Doğu Teknik Üniversitesi) Merkez Laboratuvarı'nda statik ışık saçılımı (SLS) analizi yaptırtılmıştır.

İkinci ekstraksiyon yöntemi olarak otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. İlk olarak yöntemin otoliz kısmında kullanılacak tampon çözeltisine eklenecek katkı maddesi yapılan deneyle belirlenmiştir. Otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyonun optimize edilecek koşulları literatürde yapılan araştırmalar sonucunda karar verilmiştir. Ekstraksiyon süresi ve tampon/katı oranı

ekstraksiyon koşulları tam faktöriyel deneysel tasarım kullanılarak optimize edilmiştir. Tasarımın yanıtları beta glukan verimi ve saflığıdır. Bu kapsamda; iki faktörlü, iki seviyeli, iki yanıtlı ve üç tekrarlı deney tasarım matrisi oluşturulup deneyler yapılmış ve istatistiksel analiz edilmiştir. Her bir deneyden elde edilen beta glukan örneklerine antron – sülfürik asit yöntemi uygulanarak beta glukanların saflığı ve FTIR analizleri yapılarak karakterizasyonu yapılmıştır. Optimum belirlenen koşullarda tekrar deneyi yapılmıştır ve elde edilen beta glukan örneklerine antron – sülfürik asit, FTIR, enzimatik beta glukan analizi, süpernatant örneklerindeki proteinler için Bradford yöntemi analizleri yaptırılmış ve elde edilen beta glukanların molekül kütlelerinin belirlenmesi için ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda statik ışık saçılımı (SLS) analizi yaptırtılmıştır.

Üçüncü yöntem ise Soxhlet ektraksiyonudur. Bu yöntemde tek faktörlü analiz (one factor) kullanılarak ekstraksiyon süresi optimize edilmiştir. Ekstraksiyon süresi çevrim sayısını da etkilediği için bu ekstraksiyon koşulu da optimize edilmiş olacaktır. Elde edilen beta glukan örneklerine antron – sülfürik asit, FTIR, enzimatik beta glukan analizi, süpernatant örneklerindeki proteinler için Bradford yöntemi analizleri yaptırılmış ve elde edilen beta glukanların molekül kütlelerinin belirlenmesi için ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda statik ışık saçılımı (SLS) analizi yaptırtılmıştır.

Beta glukan saflığını belirlemek için kullanılan antron – sülfürik asit ve enzimatik beta glukan analizi yöntemleri arasında kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur.

Kullanılan üç farklı ekstraksiyon yöntemi karşılatırıldığında en yüksek beta glukan saflığı (% 48,6) ve anlamlı en yüksek beta glukan verimi (0.1286 g/g) ultrasonik destekli alkali – asidik ekstraksiyonu yöntemi ile elde edilen beta glukanlar için bulunmuştur.

Bu yüksek lisans tez çalışması, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından onaylanan 20L0443002 numaralı Lisansüstü Tez Projesi kapsamında desteklenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 Beta Glukan Ekstraksiyonu

Jaehrig vd. (2008), *S.cerevisiae* maya hücresinin duvarındaki protein parçacıklarının ve (1→3) (1→6)-β-D glukanın antioksidan aktivitelerini belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, öncelikle *S.cerevisiae* maya hücresinden beta glukanı elde etmek için mayanın hücre duvarını yüksek basınçlı homojenizatörle parçalanmıştır. Sıcak su ekstraksiyonu uygulanmıştır. Saflaştırma basamağında enzim ve ditiyotretol maddesi kullanılmıştır. Her işlemin sonunda yapılan yıkamalardaki süpernatant kısımları saklanmıştır. Yapılan işlemlerin sonunda kalan çökelekte beta glukan içeriklerine ve süpernatant kısımlarında kalan protein içeriklerine bakılmıştır. Her ikisi için de antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. En yüksek protein içeriği yüksek basınçlı homojenizatör işlemi sonunda elde edilen süpernatantta (% 22.23 kuru kütlece) ve en yüksek beta glukan içeriği savinaz enzimi sonunda elde edilen çökelekte (% 83 kuru kütlece) bulunmuştur. Hem beta glukanlar hem de hücre duvarı proteinleri antioksidan özellik göstermişlerdir. Özellikle doğal yapısı bozulmuş proteinlerdeki aromatik halkaların ve serbest tiyollerin antioksidan özellik gösterdiği görülmüştür.

Rhee vd. (2008), beta glukan içeriğine göre ölçülen ekstraksiyon ve analiz yöntemleri karşılaştırılarak Chaga (*Inonotus obliquus)* şapkalı mantarındaki beta glukanın standartlaşması için analitik referans sağlamak amaçlanmıştır. Maya ve tahılların hücre duvarlarına uygulanan farklı ekstraksiyon yöntemlerinden iki tanesi (alkali ve enzimatik ekstraksiyon) beta glukan eldesinde kullanılmıştır. Beta glukan içeriği ise gravimetrik analiz, birleşik analiz yöntemleri ve HPLC (Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi) analizi ile belirlenmiştir. Her iki ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen beta glukanın içerikleri yapılan bütün analizlerin sonucunda birbirine yakın değerler bulunmuştur. Aynı ekstraksiyonla elde edilen ve farklı analizlerle ölçülen beta glukan içeriklerinde anlamlı bir fark bulunmuştur. Bu durumda, ekstraksiyon yönteminin Chaga mantarından beta glukan içeriğine etkisinin olmadığı analiz yöntemlerinin standar
tlaştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Adachi vd. (2013), mantarlardan beta glukan ve ağaç kabuğundan tanen elde etmek için ekspresso kahve makinesinin kullanımı incelenmiştir. Dört tane mantar türünden kızgın su kullanılarak ekspresso makinesiyle ekstraksiyon yapılarak beta glukan elde edilmiştir. Aynı yöntem kullanılarak ağaç kabuğundan tanen de elde edilmiştir. Çeşitli analitik yöntemler uygulanarak beta glukan, tanen, toplam karbonhidrat, protein içeriği, tanenin antioksidan, beta glukanın antitümör ve tanenin antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Sonuç olarak, en yüksek antitümör aktivite *Hypsizygus marmoreus* mantar türünden elde edilen beta glukanda bulunmuştur. Otoklav ekstraksiyonuyla elde edilen beta glukan antitümör aktivite göstermemiştir. *Grifola frondosa* mantarından her iki ekstraksiyonla en yüksek beta glukan verimi elde edilmiştir. Elde edilen en yüksek beta glukan verimleri karşılaştırılarak ekspresso makinesiyle yapılan ekstraksiyondan elde edilen beta glukanın verimi (%0.5 wt) otoklav ekstraksiyonuyla elde edilen beta glukan verimden (%1.1 wt) daha düşük olduğu sonucuna varılmıştır.

Naruemon vd. (2013), SDS, EDTA ve NaCl katkı maddelerinin tek tek kullanılmasının ve SDS-NaCl, SDS-EDTA'nın birlikte kullanılmasının *S.cerevisiae*'deki beta glukan içeriğine olan etkisi incelenmiştir. Katkı maddeleri eklenerek birçok ekstraksiyon çeşidi bir arada kullanılarak ekstraksiyon yapılmıştır. Sonuçlara göre, en yüksek beta glukan içeriği, 100 ppm SDS ekli maya çözeltisinden elde edilmiştir (kontrol beta glukanından %40 daha fazla). SDS ekli çözeltideki maya hücre yapısı daha küreselleşmiştir ve yüksek sayıda tomurcuk izi oluşmuştur. Daha yüksek β-(1,6)-glukan dallanmasıyla daha yüksek beta glukan içeriği daha az protein içeriği bulunmuştur. Bu durumda, katkı maddelerinin hücre duvar üretimlerini, dallanmalarını ve beta glukan sentezini aktifleştirebildiği gösterilmiştir.

Luan ve Uyen (2014), (1→3) – β – glukanın molekül kütlesini ışın uygulamasıyla azaltarak suda çözünebilir hale getirmek ve bitkilerin gelişimi üzerine etkisi incelenmiştir. Bira mayası hücre duvarından (1→3) – β – glukan alkali – asidik ekstraksiyon yöntemiyle elde edilmiştir. Elde edilen (1→3) – β – glukan suda çözünemediği için oda sıcaklığında 100 – 300 kGy ışın uygulanarak (1→3) – β – glukanın molekül kütlesi azaltılmış ve suda çözünmesi sağlanmıştır. Hardal otu bitkisi 28 gün boyunca 75 mg/L beta glukan içeren çözeltiyle beslenmiştir. 28 gün sonra çeşitli

analizler yapılmıştır. Sonuç olarak, ışın uygulamasıyla (1→3) – β – glukanın molekül kütlesi 48.13 kDa değerinden 10.77 kDa değerine düşürülmüştür. 100 – 150 kGy ışın uygulanarak molekül kütlesi düşürülen (1→3) – β – glukanların bitkinin gelişmesine anlamlı bir etkisi olmamıştır. Ancak, 200 – 300 kGy ışın uygulanarak molekül kütlesi azaltılan (1→3) – β – glukanların hardal otu bitkisinin gelişmesine anlamlı bir etkisi olmuştur. 250 kGy ışın uygulanarak 18 kDa molekül kütlesine düşürülen (1→3) – β – glukan, hardal otunun uzamasına, büyüyüp gelişmesine en iyi katkıyı sağlamıştır.

Harasym vd. (2015), yulaftan beta glukan eldesinde ekstraksiyondan önce yulafa uygulanan öğütme ön işleminden önce dondurup sonra öğütmenin etkisini incelemek amaçlanmıştır. Yulaflar 24 saat -20°C sıcaklıkta dondurulduktan sonra öğütülmüştür. Öğütülen yulaflara etanolle muamele edildikten sonra alkali ekstraksiyon yöntemi, saflaştırma yöntemleri uygulanmış ve elde edilen beta glukanlar kurutulmuştur. Viskozite, molekül kütlesi, beta glukan içeriği gibi analizler yapılmıştır. Pilot ölçekte üretim yapılmıştır. Yulaf örneklerinden önce dondurma sonra öğütme işlemi yapılmayan numuneye kontrol numunesi denmiştir. Kontrol beta glukanının verimi % 54.89 bulunurken dondurup öğütülerek elde edilen beta glukanların verimi % 64.03 bulunmuştur. Beta glukan saflığı, kontrol beta glukanının % 54.89 bulunurken dondurup öğütülerek elde edilen beta glukanların % 84.4 bulunmuştur. Molekül kütlesi, viskozite ve suda çözünürlük kontrol beta glukanına göre daha düşük elde edilmiştir. Partikül boyutunu % 89 düşürürken yağ atılımını % 30 arttırmıştır. Partikül boyutunun düşmesiyle yüzey alanı artmasının sonucu olarak ekstraksiyon artmış ve enzim kullanılmadan yağ gideriminin olabileceği ve molekül kütlesini düşürmede de etkili olduğu kanıtlanmıştır.

Kodama vd. (2015), karbondioksit – su karışımı çözücü kullanılarak basınçlı su ekstraksiyonu yöntemiyle arpadan beta glukan elde etmek amaçlanmıştır. Arpadan beta glukanı basınçlı su ekstraksiyonu ile elde etmişlerdir. Su pompayla ve karbondioksit kompresörle ekstraksiyonun gerçekleşeceği hazneye basılmıştır. Ekstraksiyon sıcaklığı 130°C - 170°C, basınç 10 - 40 MPa ve ekstraksiyon süresi 3 saattir. Her 30 dakikada bir sıvı örnek alınmıştır. Ekstraksiyon sonunda katı ve sıvı örnekler alınıp analiz edilmişlerdir. Ekstraksiyon süresi ve sıcaklığı arttıkça beta glukan verimi artmıştır.

Basınçlı su ekstraksiyon yönteminde aynı ekstraksiyon koşullarında çözücü olarak karbondioksit – su karışımı kullanılması sadece suyun çözücü olarak kullanılmasına göre beta glukan verimini arttırmıştır. Yüksek miktarda elde edilen beta glukan, hemiselüloz ve türevlerinin molekül kütleleri jel geçirgenlik kromatografisi kullanılarak (GPC) 500 Da – 1167 kDa olarak tespit edilmiştir. Ekstraksiyon süresi ve sıcaklığı artması beta glukanın bozunmasına da sebep olduğu için molekül kütlesi ekstraksiyon sıcaklığı ve süresi arttıkça azalmıştır. Sonuç olarak, bu yöntemin biyoaktif bileşenlerin elde edilmesinde kullanılabilir olduğu önerilmiştir.

Khan vd. (2016), maya beta glukanının yapısal biçiminin, fonksiyonel özelliklerinin, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinin üzerinde gama ışımasının etkisi incelenmiştir. Molekül kütlesi büyük olan ve çözünmeyen beta glukanlar belirli yöntemler kullanılarak molekül kütleleri azaltılarak çözünür hale getirilmiştir. Bu yöntemlerden biri de radyasyondur. Bu çalışmada radyasyon kaynağı olarak gama ışını kullanılmıştır. *S.cerevisiae*'dan beta glukan alkali ve asidik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilmiştir. Belirli dozlarda beta glukana gama ışını verilmiştir. Gama ışını verilmeden önce verildikten sonra molekül kütlesi jel geçirgenlik kromatografisiyle (GPC) bulunmuştur. Yapılan analizlerde fonksiyonel ve karakteristik özelliklerine de bakılmıştır. Sonuçlara göre, beta glukanın saflığı %91 ve verimi %38.5 olarak bulunmuştur. Gama ışını verilen beta glukanın fonksiyonel özelliklerinde negatif yönde bir değişim olmamıştır. Aksine, gama ışıması arttıkça pozitif yönde bir değişim olmasına karşı viskozite azalmıştır. Çünkü, ışıma arttıkça molekül kütlesi azalmıştır. Işıma olmadan önceki beta glukanın molekül kütlesi 175 kDa ve 50 kGy ışıma uygulandıktan sonra beta glukanın molekül ağırlığı 27.9 kDa olarak bulunmuştur. Düşük molekül kütlesine sahip beta glukanların daha iyi antibakteriyel aktiviteye ve daha yüksek antioksidan seviyeye sahip olduğu bulunmuştur.

Alzorqi vd. (2017), *G.lucidum* şapkalı mantarından beta glukan eldesinde kullanılan farklı ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç kapsamında, sıcak su, Soxhlet ve ultrasonik destekli ekstraksiyon olmak üzere üç farklı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Sıcak su ekstraksiyonu, 100°C sıcaklıkta ve farklı ekstraksiyon sürelerinde (1, 2, 3, 4 ve 5 st) koşullarında; Soxhlet ekstraksiyonu, farklı ekstraksiyon

sürelerinde (1 – 24 st), 60'ın üzerinde çevrim sayısında ve 6 farklı Soxhlet ekstraksiyon cihazıyla ve ultrasonik destekli ekstraksiyon ise ultrasonik gücün 600 W olduğu ve farklı ekstraksiyon sürelerinde (20, 40, 60 ve 80 dk) gerçekleştirilmiştir. Fenol – sülfürik asit, FTIR, SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu), elde edilen beta glukanların antioksidan aktivitelerini belirlemek için üç farklı antioksidan tayin yöntemi (DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), FRAP (Ferric – Reducing Antioxidant Power) ve Folin test) ve elde edilen beta glukanların içerikleri ve dallanma dereceleri HPAEC-PAD (High Performance Anion Exchange Chromatograpy with Pulsed Amperometric Detection) ve enzimatik - HPAEC-PAD, molekül kütleleri ise GPC yöntemleriyle belirlenmiştir. Soxhlet ekstraksiyon yönteminde en yüksek polisakkarit verimi 16 saatte, sıcak su ekstraksiyon yönteminde en yüksek polisakkarit verimi 4 saatte ve ultrasonik destekli ekstraksiyonda en yüksek verim 60 dk sonunda elde edilmiştir. Ekstraksiyonlar birbiri ile karşılaştırıldığında, ultrasonik destekli ekstraksiyon ile elde edilen beta glukanın molekül kütlesi değeri (15.995 kDa) ile sıcak su ekstraksiyon ile elde edilen beta glukanın molekül kütlesi değeri (15.595 kDa) birbirine yakın bulunmuştur. Soxhlet ekstraksiyonuyla elde edilen beta glukanın molekül kütlesi değeri ise 12.973 kDa bulunarak diğer iki ekstraksiyona göre daha düşük değerde bulunmuştur. Antioksidan aktiviteleri karşılaştırıldığında en yüksek antioksidan aktivitesi ultrasonik destekli ekstraksiyon ile elde edilen beta glukan için bulunmuştur. Beta glukan içeriği en yüksek ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemiyle (44.42 mg/g) en düşük ise Soxhlet ekstraksiyon yöntemiyle (25.03 mg/g) elde edilmiştir. *G.lucidum* şapkalı mantarından ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen beta glukan diğer iki yöntemle elde edilen beta glukanlara göre daha yüksek molekül kütlesi, antioksidan aktivitesi, uygun dallanma derecesi elde edilmiştir. Hem daha iyi sonuçlar elde edildiği hem de daha kısa sürede ekstraksiyon sağladığı için *G.lucidum* şapkalı mantarından beta glukan eldesinde en uygun ekstraksiyon yöntemi, ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntem olduğunu göstermiştir.

Tang vd. (2017), *S. cerevisiae* hücre duvarından elde edilen beta glukan altı farklı türevi (sülfatlanmış, fosfatlanmış, karboksimetillenmiş, karboksimetillenmiş – fosfatlanmış, karboksimetillenmiş – sülfatlanmış ve sülfatlanmış – fosfatlanmış) üretmek ve bu türevlerin antioksidan aktivitelerini incelemek amaçlanmıştır. Beta glukanın bu türevleri

suda çözünürlüğünü arttırmak için yapılmaktadır. *S. cerevisiae* hücre duvarından alkali – asidik ekstraksiyon yöntemi kullanılarak beta glukan elde edilmiştir. Elde edilen beta glukan sodyum hidroksit, sodyum klorür, hidroklorik asit ve etanolle ile muamele edilerek karboksimetillenmiş; elde edilen beta glukan dimetilsülfoksit (DMSO), fosforil klorür ($POCl_3$) ve etanolle muamele edilerek fosfatlanmış; elde edilen beta glukan DMSO, klorsülfonik asit (HSO_3Cl), piridin (C_5H_5N) ve etanolle muamele edilmiş ve ikili türevleri de elde edilmiştir. Altı farklı metotla elde edilen beta glukanın türevlerinin toplam karbonhidratları, molekül kütleleri, antioksidan aktiviteleri ve yapılarının karakterizasyonu için analiz edilmiştir. En düşük molekül kütlesi sülfatlanmış beta glukanda ($2.31x10^4$ Da) ve en yüksek molekül kütlesi karboksimetillenmiş beta glukanda ($2.97x10^4$ Da) bulunmuştur. En yüksek toplam karbonhidrat içeriği % 94.17 olarak sülfatlanmış beta glukanda elde edilmiştir. En iyi antioksidan aktiviteler sülfatlanmış ve fosfatlanmış beta glukanlar göstermiştir.

Karimi vd. (2019), arpadan beta glukan eldesinde kullanılan farklı enzimatik ekstraksiyonların beta glukanın fizikokimyasal özelliklerine etkisini incelemek amaçlanmıştır. Beta glukan eldesinde farklı enzimatik ekstraksiyon yöntemlerinde farklı enzimler tek veya birkaç enzim birarada (α-amilaz; α-amilaz – proteaz; α-amilaz – proteaz – glikoamilaz; α-amilaz – proteaz – pullulanaz; α-amilaz – proteaz – ksilanaz) kullanılmıştır. Elde edilen beta glukanların molekül kütleleri, akışsal özellikleri ve bileşenleri analiz edilmiştir. Maksimum beta glukan saflığı (% 89), en düşük molekül kütlesi ($2x10^4$ g/mol) ve en düşük ekstraksiyon verimi (% 11.44) α-amilaz – proteaz – ksilanaz kullanıldığında elde edilmiştir. Arpadaki nişastayı α-amilaz, proteini proteaz ve pentozu ksilanaz gidererek beta glukanın saflığını arttırmada etkili olmuştur. En düşük beta glukan saflığı (% 55), en düşük molekül kütlesi ($16x10^4$ g/mol) ve en yüksek ekstraksiyon verimi (% 23.14) sadece α-amilaz kullanıldığında bulunmuştur. Farklı birkaç enzim kullanmanın beta glukanın saflığını arttırdığı ve beta glukanın bozunmasına da sebep oldukları için molekül kütlesinin azalttığı sonucuna varılmıştır. Farklı enzimatik ekstraksiyon yöntemler kullanmanın beta glukanın verimini, saflığını, molekül kütlesini ve reolojik özelliklerini etkilediği gösterilmiştir.

2.2 Ekstraksiyon Koşullarının Optimizasyonu

Bayer vd. (2014), beta glukanın humid ekstraksiyonuyla arpadan elde edilmesi incelenmiştir ve karakterize edilmiştir. Deney tasarımında merkezi kompozit tasarım ve yanıt yüzey yöntemi kullanılıp değişkenler pH ve sıcaklık değerleri seçilmiştir. Kimyasal ve akışsal analizleriyle, kızılötesi spektroskopisiyle ve taramalı elektron mikroskobuyla beta glukanın özellikleri saptanmıştır. Sonuçlara göre, maksimum verim % 53.38 bulunmuştur. Ekstrakte edilen beta glukanın görünür viskozitesi (η) ticari beta glukanın görünür viskozitesinden (η) daha yüksek bulunmuştur. Ekstrakte edilen beta glukan pseudoplastik ticari beta glukan ise Newton uyumlu akışkan olarak tanımlanmıştır. Her iki beta glukanın IR (Infrared Spectroscopy) ve SEM sonuçları benzer bulunmuştur. Bu benzerlikten dolayı gıda sanayisinde potansiyel kıvam arttırıcı olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Du vd. (2014), beta glukan açısından zengin ticari atık olan az kabuklu arpadan elde edilen beta glukanın optimum ekstraksiyon yöntemini ve optimum ekstraksiyon koşullarını bulmayı amaçlamıştır. Optimum ekstraksiyon yöntemini bulmak için dört farklı ekstraksiyon yöntemi (hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu, ultrasonik destekli ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon ve geri akış ekstraksiyonu) kullanılmıştır. Saflaştırma kısmında α-amilaz ve proteaz enzimleri ile etanol kullanılmıştır. Optimum ekstraksiyon yöntemi bulunduktan sonra bu yöntemin optimum ekstraksiyon koşulları bulunmuştur. Deney tasarımında üç seviyeli üç değişkenli Box-Behnken tasarımı ve yanıt yüzey yöntemi uygulanmıştır. FTIR analizi de yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, optimum ekstraksiyon yönteminin hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu olduğu bulunmuştur. En yüksek ham beta glukan verimi bu yöntemle elde edilmiştir (%8,8). Optimum ekstraksiyon koşullarında (70°C, 9 dk ve 4 çevrim sayısı) elde edilen beta glukan ise % 16.9 bulunmuştur.

Li ve Karboune (2018), *S. cerevisiae* hücre duvarından üç farklı ekstraksiyon yöntemiyle mannoproteinlerin elde edilmesini amaçlamışlardır. Otoklav veya fırında sodyum fosfat tamponunda ekstraksiyon, sodyum dodesil sülfat (SDS) ile ekstraksiyon ve enzimatik ekstraksiyon yöntemleri denenmiştir. Enzimatik ekstraksiyon yöntemiyle

en yüksek verim, mannoprotein içeriği elde edildiği için bu yöntemin koşulları optimize edilmiştir. Enzimatik ekstraksiyonunun süre ve enzim ünite koşullarının optimizasyonunda döndürülebilir merkezi kompozit tasarımı (CCRD) kullanılmıştır. Beş seviyeli iki faktörlü tasarımın yanıtları verim, mannoprotein içeriği ve mannan protein oranıdır. Mannoproteinlerin molekül kütleleri de analiz edilmiştir. Modellerin p değeri 0,05 değerinden küçük olması ve R^2 değerlerinin (0.9018, 0.9893 ve 0.9318) 1 değerine yakın olması regresyon modellerinin uyumlu olduğunu göstermiştir. Optimum değerler 23.6 st ve 157.4 ünite olarak belirlenmiştir. Bu değerlerde verim % 46.9 ve mannoprotein içeriği % 39.73 olarak bulunmuştur. En düşük molekül kütlesi (6.5 kDa) otoklav veya fırında sodyum fosfat tamponunda ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen mannoproteinde, enzimatik ekstraksiyonla elde edilen mannoproteinlerin molekül kütlesi (5 – 400 kDa) elde edilmiştir.

Taofiq vd. (2019), *Agaricus blazei* şapkalı mantarından ergosterol eldesinde kullanılan geleneksel ve geleneksel olmayan ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Ergosterol kolesterol seviyesini azaltan fitosteroldür. Geleneksel yöntem olarak Soxhlet ve sıcak su ekstraksiyonu kullanılırken, ultrasonik ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemleri kullanılmıştır. Sıcak su ekstraksiyon yönteminde ekstraksiyon sıcaklığı (30 - 90°C) ve ekstraksiyon süresi (10 – 150 dk); mikrodalga destekli ekstraksiyonda ekstraksiyon sıcaklığı (60 - 150°C) ve ekstraksiyon süresi (2 – 25 dk) ve ultrasonik destekli ekstraksiyon yönteminde ise ekstraksiyon süresi (5 – 30 dk) ve ultrasonik güç (100 – 400 W) koşulları standart Soxhlet ekstraksiyonu ile diğer üç ekstraksiyon yönteminin performansı karşılaştırılarak sınırlı merkezi kompozit tasarım yöntemi (CCCD) kullanılarak optimize edilmiştir. Çalışmada % ekstrakte edilen madde (Y_1), mg ergosterol/g ekstrakte edilen çökelek (Y_2) ve verim (mg ergosterol/100 g kuru mantar) (Y_3) olmak üzere ekstraksiyonlar için ortak üç yanıt tanımlanmıştır. R^2 değeri (0.8 – 0.95) arasında bulunmuştur. Bu durumda, modelin R^2 değerinin 1 değerine yakın olması regresyon modelinin uyumunun iyi olduğunu göstermiştir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon için optimum koşullar 25 dk, 134.6°C; sıcak su ekstraksiyonu için optimum koşullar 150 dk, 81.6°C; ultrasonik destekli ekstraksiyon için optimum koşullar 30 dk, 400 W olarak elde edilmiştir. Ultrasonik destekli ekstraksiyon

yöntemiyle diğer iki yönteme göre daha yüksek miktarda ergosterol elde edildiği için bu yöntemin kullanılması uygun bulunmuştur.

Gil-Ramírez vd. (2020), *L. edodes, A. judea, A. aegerita, A. caesaria, B. edulis, C. cibarius, C. cornucopioides, C. lutescens, C. tubaeformis, H. marmoreus, L. deliciosus, M. conica, P. eryngii* ve *P. pulmonarius* şapkalı mantarlarından beta glukan eldesinde kullanılan mikrodalga destekli ekstraksiyonun koşullarını optimize etmek amaçlanmıştır. Mikrodalga ekstraksiyonunun koşulları (sıcaklık ve süre) üç seviyeli ve iki faktörlü tam faktöriyel tasarım yöntemiyle optimize edilmiştir. Toplam karbonhidrat içerikleri için fenol – sülfürik asit, beta glukan içerikleri için anilin mavi florimetrik analizi, monosakkarit bileşimler için GC – MS (Gaz Kromatografisi – Kütle Spektrofotometresi) ve NMR (Nükleer Manyetik Rezonans) analizi yapılmıştır. 180°C ve 30 dk ekstraksiyon koşullarında en yüksek toplam karbonhidrat ve beta glukan içeriği elde edildiği için kullanılan bütün mantarların ekstraksiyonunda bu koşullar en uygun koşullar olarak belirlenmiştir.

3. KURAMSAL TEMELLER

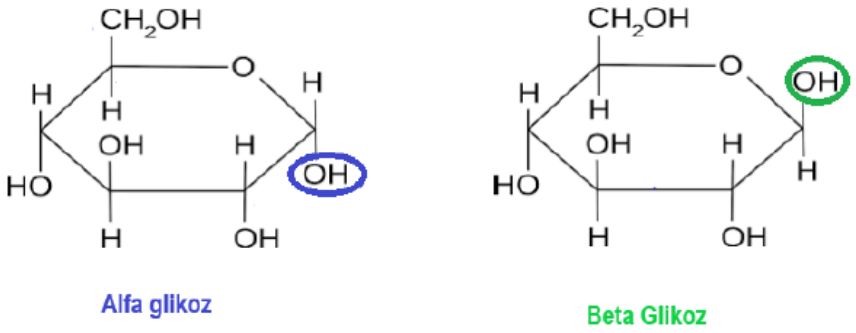
3.1 Beta Glukan

Beta glukan, farklı kaynaklardan elde edilen ve D-glikoz monomerlerinin beta glikozidik bağlarla birbirine bağlanmasıyla oluşan bir polisakkarittir (Zhu vd. 2016). Glukanlar, D-glikoz monomerlerinden oluşurlar. Glikozidik bağları α ve β biçimindedir. Eğer glikoz molekülündeki birinci karbona bağlı hidroksil grubu halka düzleminin üstündeyse β glikozidik bağı, hidroksil grubu halka düzleminin altındaysa α-glikozidik bağı oluşur (şekil 3.1). Beta glukanın kapalı formülü $(C_6H_{10}O_5)n$ 'dir. Beta glukanların kapalı formülleri aynı olmasına rağmen açık formülleri birbirinden farklıdır. Çünkü dallanma yapıları farklıdır (Bettelheim vd. 2013). 1960'lı yıllarda Nicholas DiLuzio tarafından keşfedilen beta glukan, FDA (Food and Drug Administration) ve EFSA (European Food Safety Authority) tarafından onaylanan bir üründür (Anonymous 2020a,b). Yan etkisi olmayan ve bağışıklık sistemini destekleyen bir ürün olan beta glukanın önerilen günlük dozu elde edildiği kaynağa göre değişmektedir. Şapkalı mantarlardan elde edilen beta glukandan günlük 100 – 1000 mg, mayadan elde edilen beta glukandan günlük 30 – 1000 mg ve yulaftan elde edilen beta glukandan günlük 1000 – 3000 mg miktarda alınması önerilmektedir (Anonymous 2020c).

Beta glukanın doğal kaynaklardan elde edilmesi, bağışıklık sistemini kuvvetlendirmesi ve günümüzde insanların sağlıklı ve doğal yaşama olan taleplerinden dolayı her geçen yıl dünyadaki pazar büyüklüğü artmaktadır. Yapılan araştırmada 2020 yılındaki beta glukanın dünyadaki pazar büyüklüğü 410,6 milyon US$ değerindedir ve 2025 yılı sonuna kadar 476,5 milyon US$ olması beklenilmektedir. 2020 – 2025 yılları arasında yıllık bileşik faiz oranının %7,6 civarında olacağı tahmin edilmektedir. Önümüzdeki yıllarda beta glukan tüketim ve üretimi artması beklenmektedir ve çoğu şirket beta glukanın üretiminde yenilikçi teknolojilerin kullanılmasına odaklanmaktadır. (Anonymous 2020d). Dünyada beta glukanın ABD, Çin, Almanya, Fransa, Japonya, İngiltere ve Norveç gibi ülkelerde beslenme desteği ve ilaç etken maddesi olarak veya ham madde formunda üretimi yapılmaktadır (Sabuncu 2016). Yapılan araştırmalarla

kullanım alanı genişleyen, avantajlı ve karlı bir ürün olan beta glukan Biothera Pharmaceuticals, Biotec Pharmacon ASA, Super Beta Glucan Inc, Tate & Lyle Plc gibi birçok firma tarafından üretilmektedir. Dünyada piyasada satılan beta glukanlara örnek olarak Beta Force, Immutol, Beta Max, Macroforce, NSC Immunition, SenseiroGold, Krestin, AgaricusK2, Hanabira Take verilebilir. Beta glukanın satış fiyatı yaklaşık olarak 50$ - 95$'dır (Anonymous 2020e).

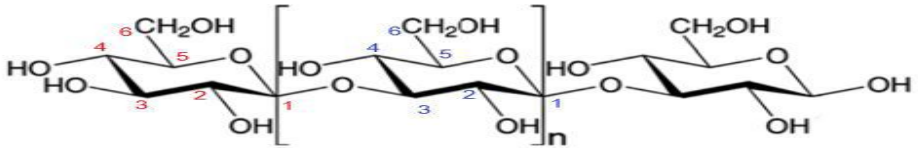
Türkiye'de beta glukanın ilk ve tek ruhsatlı üreticisi Mustafa Nevzat İlaç Sanayi'dir. β-Glukan içerikli kapsül ve şurup formları 'Imunex' markasıyla satılmaktadır (Sabuncu 2010). Türkiye'de de dünyada olduğu gibi beta glukan çeşitli miktarlarda (genellikle 10 mg, 20 mg, 50 mg ve 100 mg) ve markalar tarafından (Imunex, Ligone, Allergo VitaGlucan, Solgar, Eczacıbaşı Imutor vb.) piyasada satılmaktadır.



Şekil 3.1 Alfa ve beta glikoz molekülleri

3.2 Beta Glukanın Yapısı

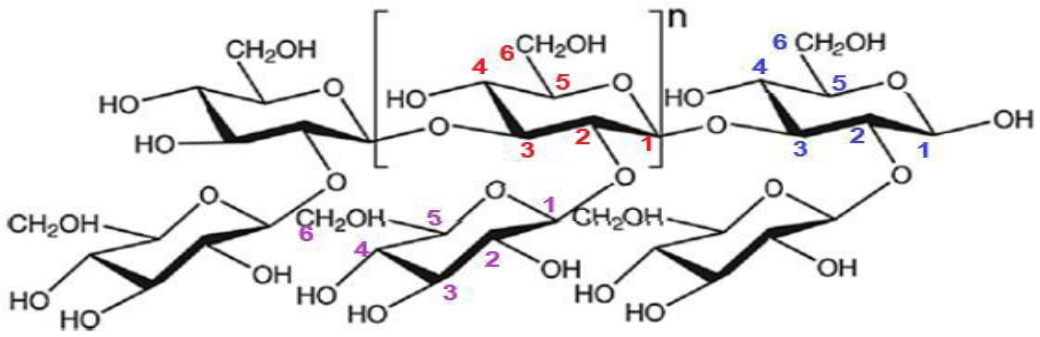
Lineer (1→3)-β-glukan yapısı, beta glukanın temel moleküler yapısı şekil 3.2'de görüldüğü gibidir.



Şekil 3.2 Lineer (1→3)-β-glukanın yapısı (Bacic vd. 2009)

Beta glukanın moleküler yapısı elde edildiği kaynağına göre değişmektedir. Beta glukanın dallanma yapıları şekil 3.3, 3,4 ve 3.5'teki gibi üç temel sınıfa ayrılmaktadır.

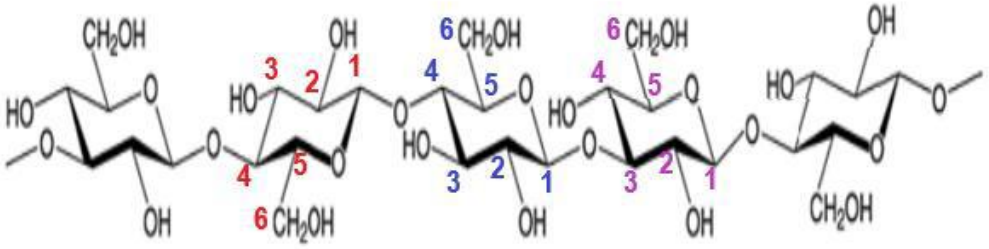
a) (1→3) (1→2)-β-Glukan



Şekil 3.3 (1→3) (1→2)-β-glukanın yapısı (Bacic vd. 2009)

Streptococcus pneumoniae tip 37 türünün kapsülü sadece homopolisakkarittir. 90 pnömokoksal kapsül tipleri vardır. Bu kapsül tipi iki nötr polisakkaritten biridir. Bu kapsüldeki glukan suda ve DMSO'da çözülür (Bacic vd. 2009).

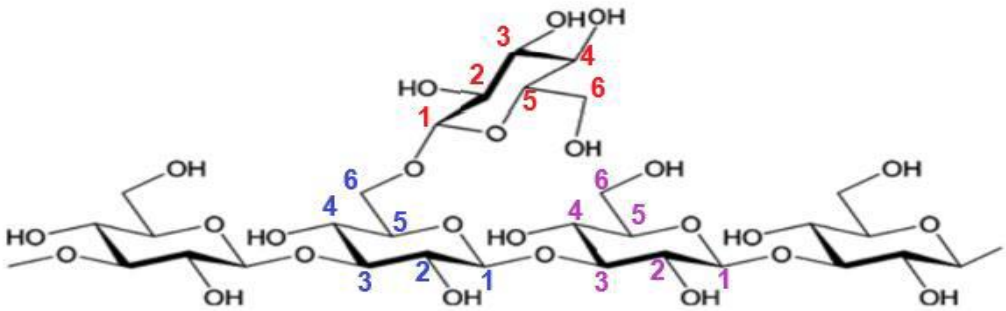
b) (1→3) (1→4)-β-Glukan



Şekil 3.4 (1→3) (1→4)-β-D-glukanın yapısı (Bacic vd. 2009)

(1→3) (1→4)-β-D-Glukanlar; tahıllarda (arpa, yulaf ve buğday), çimenlerde, kızılyapraklarda, yosunlarda, mantarlarda (chromistanlar ve şapkalı), alglerde (yeşil ve sülfatlanmış kırmızı) bulunur (Bacic vd. 2009). Bu tür beta glukanlar genellikle suda çözünürler.

c) (1→3) (1→6)-β-Glukan



Şekil 3.5 (1→3) (1→6)-β-D-glukanın yapısı (Bacic vd. 2009)

(1→3) (1→6)-β-D-Glukanlar; dallanmış ve halkalı halde bulunurlar. Dallanmış (1→3) (1→6)-β-D-glukanlar; mayalarda, mantarlarda, kahverengi alglerde, tek hücreli deniz otlarında, asklı mantarlarda ve basidiomisetlerde bulunur.

Halkalı (1→3) (1→6)-β-D-glukanlar; *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium loti*, *Azospirillum brasilense* ve *Azorhizobium caulinodas* bulunur. Bu mikroorganizmalar baklagillerde simbiyotik yaşarlar (Bacic vd. 2009). Bu tür beta glukanlar genellikle suda çözünmezler.

Beta glukanın özellikleri elde edildiği kaynağa göre değişmektedir. Bunun sebebi, farklı kaynaklardan elde edilen beta glukanların molekül yapılarının da farklı olmasıdır. Beta glukanın özellikleri iki ana kategoriye ayrılır: Fizikokimyasal özellikler ve biyolojik aktivite.

3.3 Beta Glukanın Özellikleri

3.3.1 Fizikokimyasal özellikler

Beta glukanın kullanıldığı alana göre incelenen fizikokimyasal özellikleri değişmektedir. Örneğin; gıda alanında viskozite, çözünürlüğün yanı sıra köpürme kapasitesi, kıvam arttırıcılığı, su bağlama kapasitesi gibi fizikokimyasal özelliklerine de bakılmaktadır. Fizikokimyasal özelliklerinden bazıları aşağıdaki gibidir.

- **Çözünürlük:** Beta glukanın çözünürlüğü uygulama alanları için önemlidir. Özellikle suda çözünürlüğü gıda ve sağlık alanlarındaki kullanımını etkilemektedir. Bu alanlarda beta glukanın suda çözünmesi istenmektedir. Çözünürlüğe üç faktör etki etmektedir. İlk faktör molekül kütlesidir. Beta glukanın molekül kütlesi arttıkça çözünürlüğü azalmaktadır (Kim vd. 2013). İkinci faktör polimerizasyon derecesidir. Polimerizasyon derecesi, bir polimer zinciri başına düşen ortalama tekrarlanan birim sayısıdır (Saçak 1998). Polimerizasyon derecesi 100'den büyük olursa beta glukan suda çözünmez (Lam ve Cheung 2013). Üçüncü faktör molekül yapısıdır. Literatürde genellikle beta glukanlar çözünürlüklerine göre üç sınıfa ayrılırlar: Alkali ve asetik asitte çözünemeyen (1→3)-β-glukanları, alkalide çözünen (1→3)-β-glukanlar ve yüksek dallanmış (1→6)-β-glukanlar (Zekovic vd. 2008). Aslında, bu üç faktör de birbiriyle ilişkilidir. Beta glukanın molekül kütlesi dolayısıyla da polimerizasyon derecesi arttıkça beta glukan zinciri bir yumak haline gelir ve moleküler yapısı karmaşıklaşır. Bu durumda çözünemez.

- **Molekül kütlesi:** Glukanların molekül kütleleri, yapıları ve dolayısıyla viskoziteleri elde edilen kaynağa göre değişmektedir (Synytsya ve Novak 2014). Molekül kütlesi arttıkça viskozite artarken çözünürlük azalmaktadır. Bu durumda beta glukanın hem biyolojik aktivitesini hem de kullanım alanlarını etkilemektedir. Beta glukanın molekül kütlesinin biyolojik aktiviteyi etkilediğine dair birçok çalışma yapılmıştır. 100 – 200 kDa aralığında molekül

kütlesine sahip olan beta glukanların en iyi antitümör aktivitesi göstermesine rağmen 5 – 10 kDa aralığındaki molekül kütlesine sahip olan beta glukanların ya antitümör aktivitesi göstermemiş ya da sınırlı bir antitümör aktivite göstermiştir (Zeković vd. 2008). Antitümör aktivitesi gibi diğer biyolojik aktivitelerin de (antimikrobiyal, antioksidan aktivitesi vb.) beta glukanın molekül kütlesine göre değiştiği yapılan çalışmalarla bulunmuştur (Lazaridou ve Biliaderis 2007; Khan vd. 2016; Khan vd. 2018; Zielke vd. 2018; Bai vd. 2019; Sun vd. 2020). Molekül kütlesi biyolojik aktivitelerin yanı sıra viskozite, köpürme kapasitesini, çözünürlük, yağ bağlama kapasitesi, kabarma gücü gibi fizikokimyasal özellikleri de etkilediği ve bu özelliklere göre kullanım alanı değiştiği için beta glukanın molekül kütlesinin bilinmesinin önemi artmaktadır. Örneğin; yüksek molekül kütleli suda çözünemeyen beta glukanlar prebiyotik olarak kullanılırken daha düşük moleküllü suda çözünebilen beta glukanlar gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Lam ve Cheung 2013; Zhu vd. 2016).

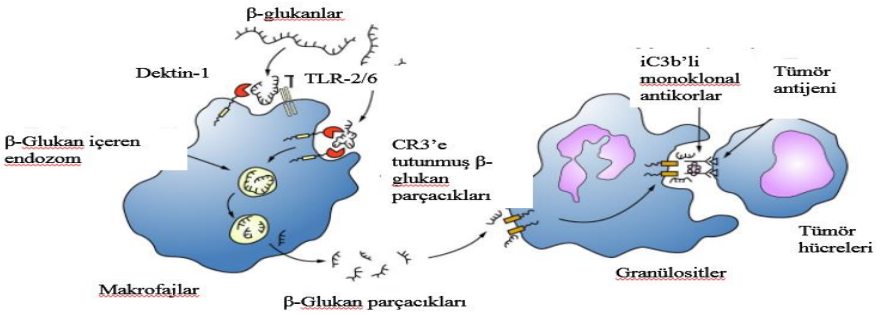
- **Köpürme kapasitesi ve kararlılığı:** Köpürme kapasitesi ve kararlılığı gıdalarda kullanılan malzemeler için önemli bir özelliktir. Beta glukan gıdalarda katkı maddesi ve hamurlarda kıvam arttırıcı olarak kullanıldığından bu özelliği öne çıkmaktadır. Beta glukan keklere ve hamurlara eklendiğinde yüksek köpürme sağlamakta ve kıvam arttırmaktadır. Viskoziteyle köpürme kapasitesi arasında negatif ilişki vardır. Daha yüksek viskoziteye sahip malzemede daha az köpürme olmaktadır (Anonymous 2020f).

- **Su bağlama kapasitesi:** Hidrasyon özellikleri gıda uygulamalarında önemli bir özelliktir. Bu özelliklerden biri su bağlama kapasitesidir. Su bağlama kapasitesi, bir dış kuvvet uygulandıktan sonra lifte kalan su miktarıdır (Thebaudin vd. 1997). Beta glukanın su bağlama kapasitesi yüksektir. Bu durum, reçel, peynir gibi çeşitli ürünlerdeki su ayrılması (sineresis) probleminin çözülmesinde kullanılabileceğini göstermektedir (Anonymous 2020f).

3.3.2 Biyolojik aktivite

Antioksidan aktivite: Bir veya daha fazla çift oluşturmamış elektron içeren moleküller olarak tanımlanan serbest radikaller yüksek enerjili ve kararsızdır. Serbest radikaller; sülfür, karbon, hidrojen veya nitrojen merkezli olabilir (Delibaş ve Özcankaya 1995). Canlı sistemlerdeki serbest radikallerin çoğu oksijen merkezlidir. Bunlara da reaktif oksijen türleri denir. Süperoksit radikali (O_2^-), peroksi (ROO^-) radikali, hidroksil radikali (OH^-) ve alkoksi (RO^-) radikali serbest radikallere örnek verilebilir (Bardakçı 2017). Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşmasını engelleyen ve serbest radikaller oluştuğunda onları etkisiz hale getiren maddelerdir. Antioksidanlar kendi elektronlarını serbest radikallerle eşleyerek serbest radikalleri daha kararlı ve zararsız hale getirirler. Vitamin C, vitamin E, melatonin, sistein ve beta glukan antioksidanlara örnek verilebilir (Bardakçı 2017). Yapılan bir çalışmada, beta glukanların da antioksidan aktivite gösterdiği ve özellikle buğdaydan elde edilen beta glukanın pektin, kitosan gibi polimerlerden daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği bulunmuştur (Kofuji vd. 2011).

Antitümör aktivite: Yapılan araştırmalar sonucunda beta glukanın antitümör aktivitesi olduğu bulunmuştur. Beta glukanın bağışıklık hücreleri üzerindeki etkisi en basit haliyle şekil 3.6'da gösterilmiştir. Beta glukanın yapısal karmaşıklığıyla birlikte molekül kütlesi arttıkça bağışıklık üzerine etkisi ve antitümör aktivitesinin de arttığı bulunmuştur.



Şekil 3.6 Beta glukanın bağışıklık hücreleri üzerine etkisi (Hong vd. 2004)

Uzun zincirli beta glukanlar makrofajların dektin-1 alıcıları tarafından makrofaja tutunurlar. Makrofajlarda beta glukanlar parçacıklara ayrılırlar. Beta glukan parçacıkları granülositlere komplemanlar (CR3) vasıtasıyla tutunurlar. Tümör hücresindeki komplemanlı (iC3b) monoklonal, tümör hücrelerini opsonize eder. Opsonize olmuş tümör hücresi fagositozla granülosit tarafından yok edilir. Beta glukanın buradaki görevi bağışıklık hücrelerini uyarıp tümör hücresine yönlendirmektir (Hong vd. 2004). Dektin-1, bir lektin alıcısıdır. Beta glukanlara bağlanırlar (Mohl vd. 2006). Lektin, karbonhidrat bağlayıcı glikoproteinler veya proteinlerdir. Makrofajlar, bir çeşit beyaz kan hücresidir. Doğal immün sistemde makrofajlar fagositik fonksiyon gösteren iki hücreden biridir. Bu hücreler, patojenleri alma, tanıma ve yok etme kapasitesine sahiptirler (Abbas ve Lichtman 2007, Goldsmith vd. 2012). Opsonin, bakteri veya antijenlere bağlanan, antijenlerin makrofaj ve nötrofiller tarafından fagositozunu kolaylaştıran antikor veya kompleman gibi maddelere denir. Opsonize, belli bir antijeni opsonin yardımıyla fagositoza duyarlı hale getirmektir. Monoklonal antikor, antijenlerdeki sadece bir tip epitopa (bağlanma yeri) bağlanan antikorlardır.

Antimikrobiyal aktivite: Beta glukanın antimikrobiyal aktivitesi, antitümör aktivitesine benzemektedir. Tek farkı tümör hücreleri yerine virüs, bakteri ve parazit mantarlar gibi hücreler yok edilmektedir. Burada da beta glukanın görevi bağışıklık hücrelerini uyarıp virüs, bakteri, parazit ve mantar hücrelerine yönlendirmektir. Yapılan çalışmalarda farklı mikroplara karşı beta glukanın iyi bir antimikrobiyal aktivite gösterdiği bulunmuştur (Ali 2009, Khan vd. 2016, Özcan ve Ertan 2018).

Farklı kaynaklardan elde edilen beta glukanların farklı biyolojik etkiler göstermektedir ve bazı kaynaklardan elde edilen beta glukanların biyolojik etkileri çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Beta glukanın yapıları, kaynakları, biyolojik etkileri (Mantovani vd. 2008)

Yapı	Kaynak	Etkiler
β (1→3) (1→6)	*Saccharomyces cerevisiae*	Anti parazitik
		Anti bakteriyel
		Anti viral
		Anti fungal
		Anti mutajenik
		Anti tümör
		Mitojenik
		Hematopoetik uyarıcı
		Antioksidan
	Candida albicans	İmmünostimülasyon aktivite
	Poria cocus	Anti tümör
	Agaricus blazei	Sitokin indüksiyonu
		Anti tümör
		Anti mutajenik
		CYP450 izoenzimlerin inhibisyonu
	Lentinus edodes	Anti tümör
		CYP450 izoenzimlerin inhibisyonu
	Schizophyllum commune	Anti tümör
	Coriolus versicolor	Anti tümör
β (1→3) (1→4)	Yulaf	Anti mikrobiyal
		Anti parazitik
		Hipokolestrolemik
		Anti trombotik
	Arpa	Antimutajenik

3.4 Beta Glukan Kaynakları

Beta glukan tahıllar, şapkalı mantarlar ve mikroorganizmalar olmak üzere üç ana kaynaktan elde edilmektedir. Elde edildiği kaynaklara göre özellikleri ve moleküler yapısı değişmektedir. Beta glukanların yapıları, bulundukları yerler ve elde edildikleri kaynaklar çizelge 3.2'de bulunmaktadır. Kaynakların bulunduğu kısımlarına bakıldığında beta glukanın genellikle kaynakların hücre duvarlarında bulunduğu görülmüştür.

Çizelge 3.2 Farklı beta glukan kaynakları, kimyasal yapıları ve bulundukları yerler (Bacic vd. 2009, Kagimura vd. 2015)

Kimyasal Yapısı	Kaynak	Bulunduğu Kısım	Referans
(1→3)-β-Glukan	*Pleurotus sajor-caju*	Hücre duvarı	Silveira vd. 2014
	Rhodotorula mucilaginosa	Hücre duvarı	Valasques vd. 2014
(1→3) (1→4)-β-Glukan	Buğday (*Triticum vulgare*)	Endosperm hücre duvarı	Lazaridou vd. 2004
	Yulaf (*Avena sativa*)	Endosperm hücre duvarı	Volman vd. 2010
	Arpa (*Holdeum vulgare*)	Endosperm hücre duvarı	Cui vd. 2000
(1→6)-α-Glukan	*Ipomoea batatas*	Kök	Zhao vd. 2005
(1→4)-α-Glukan	*Lonicera japonica*	Hücre dışı	Wang vd. 2014
(1→6)-β-Glukan	*Agaricus bisporus*	Hücre dışı	Smiderle vd. 2013
(1→3) (1→6)-β-Glukan	*Schizophyllum commune*	Hücre duvarı	Akima vd. 1985
	Lentinus edodes	Hücre duvarı	Zhang vd. 2004
	Saccharomyces cerevisiae	Hücre duvarı	Kollar vd. 1995, 1997
	Candida albicans	Hücre duvarı	Hearn ve Siestma vd. 1994
	Aspergillus fumigatus		
	B.rhodina	Hücre dışı	Weng vd. 2011
	Jinqian mushroom	Hücre duvarı	Liu vd. 2014

Bazı beta glukan kaynaklarının içerdikleri beta glukan miktarları yüzdece kuru kütle üzerinden çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3 Bazı kaynakların beta glukan içerikleri (Klis vd. 2002, Sapirstein 2016, Maheshwari vd. 2017, Özcan ve Ertan 2018)

Kaynak	Kuru Kütle (% wt)
Buğday	2.3
Yulaf	2.55 – 2.91
Öğütülmüş arpa	2.95
Kabuksuz arpa	4.83
Kırık arpa	3.96
Mantarlar	11.3 – 14.6
Ekmek mayası (*S.cerevisae*)	8 - 16

S.cerevisiae diğer kaynaklardan daha yüksek miktarda beta glukan içerdiği için beta glukan üretiminde kaynak olarak kullanmak bir avantaj olacaktır.

3.4.1 *Saccharomyces cerevisiae* (Ekmek mayası)

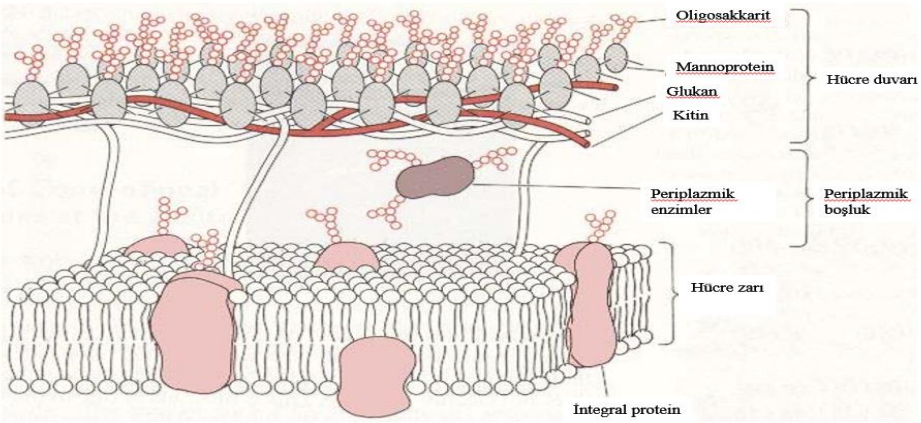
Ekmek mayası olarak da anılan *Saccharomyces cerevisiae* fungi alemine bağlı olan bir mayadır. *Saccharomyces cerevisiae* çizelge 3.4'teki gibi taksonomik olarak sınıflandırılır.

Çizelge 3.4 *Saccharomyces cerevisiae*'nın taksonomik sınıflandırılması (Kurban 2019)

Alem	Fungi
Şube	Ascomycota
Alt Şube	Saccharomycotina
Sınıf	Saccharomycetes
Takım	Saccharomycetales
Aile	Saccharomycetaceae
Cins	Saccharomyces
Tür	*S.cerevisiae*

Mayalar tek hücreli ökaryotik canlılardır. Boyutları yaklaşık 3-4 µm olan mayaların hücre duvarı ve zarı vardır ancak kloroplastları yoktur. Mayalar kendi besinini üretemeyip dışarıdan aldıkları için dış beslek (heterotrof) canlılardır. Mayalar besinlerini, amino asitleri ve monosakkaritleri hücre duvarından absorplarlar veya organik maddeleri sindirebilmek için çeşitli proteolitik, glikolitik veya lipolitik enzimleri salgılayarak elde ederler. Tomurcuklanarak ve bölünerek çoğalan mayalar fakültatiflerdir. Oksijenli ortamda çoğaldıklarında şeker ve oksijeni karbondioksit ve enerjiye dönüştürürken oksijensiz ortamda çoğaldıklarında şekeri etanol ve enerjiye dönüştürürler (Shurson 2018).

Saccharomyces cerevisiae'nın hücre duvarı şekil 3.7'de de görüldüğü üzere esas olarak mannoproteinler, kitin ve glukanlardan oluşmaktadır.



Şekil 3.7 *Saccharomyces cerevisiae*'nın hücre duvarı (Paciello 2016)

Hücre duvarının kalınlığı yaklaşık 70-100 nm'dir ve duvarın kalınlığı genetik geçmişine ve çoğalma koşullarına göre değişmektedir. Hücre duvarının mekanik dayanıklılığını sağlayan β 1,3-glukan ve kitin duvarın iç kısmında yer almaktadır. Hücre duvarının dış kısmında ise mannoproteinler bulunmaktadır ve mannoproteinler hücre-hücre tanıma olayını gerçekleştirmektedirler. Aynı zamanda, mannoproteinler yabancı enzimlerin hücre zarına ve duvarının iç kısmına geçişini kısıtlamaktadır. Genel olarak hücre duvarının % 35-40'ını mannoproteinler, %55-65'ini beta glukan ve %1-2'sini kitin oluşturmaktadır (Klis vd. 2002).

Geçmişten günümüze insanoğlu mayaları ekmek üretimi başta olmak üzere alkol içeren ve alkol içermeyen içeceklerin üretiminde, heterojen protein üretiminde, endüstriyel etanol üretiminde, gıda takviyesi ve probiyotik olarak, biyomedikal araştırmalarda, ilaçlarda biyokataliz olarak kullanmaktadır. Yeni bilimsel araştırmalarla mayaların kullanım alanlarına yenileri de eklenmektedir (Johnson ve Echavarri-Erasun 2011, Shurson 2018).

3.5 Beta Glukanın Kullanım Alanları

Beta glukanların elde edildiği kaynaklara göre özellikleri değiştiği için farklı alanlarda kullanılabilmektedir. Genel olarak bu alanlar beş ana kategoride toplanabilir. Bunlar, gıda, sağlık, kozmetik, yem ve diğer sağlık ürünleridir. Bu kategorilerdeki uygulamalara örnekler çizelge 3.5 ve çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.5 Beta glukanın gıda ve medikal alandaki uygulamaları (Zhu vd. 2016)

Uygulama Alanı	Ürün	İşlevi
Gıda	Beta glukanlı prebiyotik sosis	Duyusal ve fiziksel özelliklerinde fark edilebilir etki
	Glutensiz beta glukanlı ekmek	Duyusal analizlerin kabul edilebilir sonuçları
	Beta glukanlı günlük ürünler	Az kalori ve düşük kolestrol
	Beta glukanlı yoğurtlar	Proteinin daha hızlı sindirilmesi
	Beta glukanlı şekerli içecekler	Besin alımının kontrolü ve enerji alımının azalması
	Gıda ürünlerinde kullanımı	Kıvam arttırıcı, yağ bağlayıcı ya da su tutucu ajan da emülsifye edici stabilizatör
Medikal	Şeffaf sargı bezi	Tedavi edici etkisi
	İkinci derece yanıkların tedavisi	Yanığın sızısını azaltma
	Yanığın sebep olduğu doku hasarlarının tedavisi	Yanmadan kaynaklı oluşan oksidatif doku hasarına karşı etkili olma
	Kemik yerine kullanılan malzeme	İyi ve kolay uyum sağlama
	Beta glukan içeren poli-membranlar	Yaraları daha hızlı iyileştirme

Tahıllardan elde edilen beta glukanlar genellikle gıda sektöründe mayalardan ve mantarlardan elde edilen beta glukanlar genellikle sağlık, kozmetik ve yem sektöründe kullanılmaktadır. Gıdada beta glukan ile ilgili yapılan araştırmalarda genellikle yiyeceklerin veya içeceklerin içinde kullanılabilirliği, sağlayabileceği yararlar ve olabilecek zararlar incelenmektedir. Beta glukanın günlük ürünlerde kullanılmasıyla ürünlerin daha az kaloriye sahip olduğu, kandaki glikoz seviyesinin düzenlenmesinde rol oynadığı ve kandaki kolestrol seviyesini düşürdüğü bulunmuştur (Sharafbafi vd. 2014, Lazaridou ve Biliaderis 2007). Yapılan çalışmalarda glütensiz ekmeklere beta glukanın katılabileceği ve yoğurtların içine beta glukan katıldığında daha hızlı protein çözümü olduğu bulunmuştur (Kittisuban vd. 2014, Rinaldi vd. 2015). Medikal alanda ise beta glukan yaraların daha çabuk iyileşmesinde, bağışıklık sistemini kuvvetlendirerek hastalığın önlenmesinde, yaraların ağrılarının azaltılmasında ve biyo malzeme olarak kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada, beta glukan-kitosan kompleksli sargı bezi ticari sargı beziyle karşılaştırıldığında yaralarda tedavi edici etkisi olduğu kanıtlanmıştır (Kofuji vd. 2010). Yapılan başka bir çalışmada, yanığın sebep

olduğu doku hasarlarının tedavisinde beta glukanın etkili olup olmadığının anlaşılması için farelerde deney yapılmıştır. Beta glukanın antioksidan aktivitesi sayesinde malondialdehit seviyelerini düşürdüğü ve dokulardaki glutatyon (GSH) içeriğini yenilediği görülmüştür. Beta glukanın yanma sonucu oluşabilecek organlarda oluşabilecek hasarlara karşı koruyabileceği sonucuna da ulaşılmıştır (Toklu vd. 2006).

Çizelge 3.6 Beta glukanın kozmetik, yem ve diğer sağlık ürünleri alanlarındaki uygulamaları (Zhu vd. 2016)

Uygulama Alanı	Ürün	İşlevi
Kozmetik	Nemlendiriciler	İnce çizgileri ve kırışıklıkları azaltmada etkili
	Cilt ve dermatolojik bileşimler	Ciltte canlandırıcı, nemlendirici ve yaşlanma karşıtı etki
	Kozmetik ürün	Yaşlanmadan dolayı kaybolan kolajeni yerine koyma
	Kozmetik ürün	Cildi beyazlaştırma, yaşlandırma geciktirici ve ciltteki zarar gören yerleri iyileştirme
	Göz damlaları	Gözün nemli kalmasını sağlama
	Beta glukanlı kozmetik formülasyonu	Cildi pürüzsüzleştirme
Yem	Hayvan yemi katkı maddesi	Bağışıklığı güçlendirme ve potansiyel antitümör ajanı
	Balık yemi katkı maddesi	Belirli antikor salgılayan hücrelerin sayısını arttırmak
Diğer Sağlık Ürünleri	Yeni geliştirilen prebiyotik	Sağlığı arttırıcı özellikler
	Beta glukanlı kişisel bakım bileşimleri	Saçın keratin kaynağını düzenlemek

Beta glukan kozmetik ürünlerinde de kullanılmaktadır. Nemlendiricilerde kullanıldığında ince çizgileri ve kırışıklıkları azaltmada etkili olduğu bulunmuştur (Pillai vd. 2005). Ciltte canlandırıcı, nemlendirici ve yaşlanma karşıtı etkisinin olduğu görülmüştür (Baschong vd. 2009). Mantarlardan elde edilen beta glukanların göz damlalarında kullanıldığında gözün nemli kalmasını sağladığı bulunmuştur (Chen 2014).

Hayvan yemlerinde antibiyotik kullanıldığında hayvanlara verdiği zararlardan ve insanlarda antibiyotik direnci oluşturmalarından dolayı yemlerde antibiyotik kullanımı

yasaklanmıştır. Beta glukan hem zararsızdır hem de bağışıklık sistemini güçlendirmektedir. Bu özelliklerinden dolayı antibiyotik yerine beta glukanın yem katkı maddesi olarak kullanılabileceği kanıtlanmıştır (Jung vd. 2007, Siwicki vd. 2004).

Bazı beta glukanların suda çözünememe özelliğinden dolayı prebiyotik olarak kullanılabilirliği konusu bilim insanlarının dikkatini çekmiştir. Bu konuda yapılan araştırmalar sonucunda suda çözünemeyen beta glukanların prebiyotik olarak kullanılabileceği bulunmuştur (Lam ve Cheung 2013).

Özellikle son yıllarda birçok olumlu özelliği sayesinde yeni yapılan araştırmalarla beta glukanın bu kullanım alanlarının dışında yeni kullanım alanları da keşfedilmeye devam edilmektedir. Bu alanlara ilaç salınımı, karbon nanotüpler, atık su arıtımı örnek verilebilir. Hatta, koronavirüs üzerinde de beta glukanın etkisi incelenmiştir ve koronovirisü yok etmede pozittif bir etki bıraktığı görülmüştür (Murphy vd. 2020).

3.6 Beta Glukan Üretimi

Beta glukanın üretim yöntemleri, beta glukanın fizikokimyasal özelliklerini (viskozite, molekül kütlesi, çözünürlük vb.) ve biyolojik aktivitelerini (antimikrobiyal, antioksidan ve antitümör aktivite) etkilediği için elde edildiği kaynak kadar önemlidir. Beta glukanın kaynağı değiştikçe beta glukanın özellikleri değiştiği gibi üretim yöntemi değiştikçe de beta glukanın özellikleri değişmektedir (Zhu vd. 2016, Bai vd. 2019, Maheshwari vd. 2019, Puligundla vd. 2020). Farklı yapıdaki beta glukanlar farklı özelliklere sahip oldukları için beta glukanın yapısı, kaynağı, üretim yöntemi ve uygulama alanlarının seçimi önemlidir. Kullanılan kaynağa göre en ekonomik, çevreci, yüksek verim ve beta glukan saflığı elde edilen beta glukan üretim yöntemi seçilmelidir. Beta glukan üretim yöntemleri, mikroorganizmalardan beta glukan üretimi ve tahıllar ve şapkalı mantarlardan beta glukan üretimi olmak üzere iki ana sınıfta toplanabilir. Mikroorganizmalardan beta glukan üretimi; mikroorganizma üretimi, hücre duvarı parçalanması ve hücre duvarındaki beta glukan dışındaki istenmeyen maddelerin uzaklaştırılması basamaklarından oluşurken tahıllardan ve şapkalı mantarlardan beta

glukan üretim yöntemleri ise ön işlemler ve hücre duvarındaki beta glukan dışındaki istenmeyen maddelerin uzaklaştırılması basamaklarından oluşmaktadır. Beta glukan üretim yönteminde en önemli sıkıntılar üç ana aşamada gerçekleşmektedir: Mikroorganizmalarda hücre duvarının parçalanması ve beta glukan dışındaki maddelerin uzaklaştırılması; tahıllarda ve şapkalı mantarlarda ön işlemler ve beta glukan dışındaki maddelerin uzaklaştırılması. Bu aşamalardaki problemleri çözebilmek için birçok yöntem geliştirilmiştir.

3.6.1 Farklı kaynaklardan beta glukan üretim yöntemleri

Beta glukan birçok farklı kaynaklardan elde edilmektedir. Beta glukanın üretildiği kaynakların yapıları da farklı olduğu için üretim yöntemleri de değişmektedir. Benzer bir şekilde, beta glukanın üretim yöntemleri beta glukanın yapısını ve özelliklerini etkilemektedir. Örnek vermek gerekirse, beta glukanın önemli özelliklerinden birisi olan molekül kütlesinin farklılıkları beta glukanın ekstraksiyonu boyunca oluşan çökelme, depolimerizasyon olması ve farklı ekstraksiyon yöntemlerinin kullanılmasından kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Dolayısıyla en uygun yöntem beta glukanın yapısına ve kaynağına göre belirlenmelidir (Zhu vd. 2016, Ma Maheshwari vd. 2017, Bai vd. 2019).

Beta glukan mikroorganizmaların, tahılların ve şapkalı mantarların genellikle hücre duvarlarında bulunur (Klis vd. 2002, Bacic vd. 2009, Bai vd. 2019, Ruiz-Herrera ve Ortiz-Castellanos 2019). Farklı kaynaklardan beta glukan üretiminde ilk aşamalar farklı olsa da hücre duvarındaki beta glukan dışındaki istenmeyen maddelerin uzaklaştırılması aşamasında kullanılan yöntemler benzerdir.

Ön işlem: Ön işlemler tahılların veya şapkalı mantarların hücre duvarındaki beta glukan dışındaki istenmeyen maddelerin uzaklaştırılmasını kolaylaştırmak için yapılır (Zhu vd. 2016). En çok uygulanan ön işlemler kurutma, öğütme ve etanolle muameledir. Etanol çözeltisiyle muamele tahıl veya şapkalı mantar hücrelerinin enzimlerini inaktif etmek için yapılmaktadır (Brennan ve Cleary 2005).

- Öğütme
- Taşlama
- Santrifüjleme
- Kurutma
- Mekanik Karıştırma
- Nişasta Ayırma
- Süzme
- Homojenleştirme
- Protein Giderme
- Etanolle muamele

Hücre duvarının parçalanması: Beta glukan, mikroorganizmaların hücre duvarının bir bileşenidir. Beta glukan dışındaki maddelerin hücre duvarından uzaklaştırılabilmesi için hücre duvarının parçalanması gerekmektedir. Hücre duvarı parçalanmasında en çok kullanılan yöntemler otoliz, homojenizatör, ultrasonik dalgalar, enzim ve otoklavdır (Yılmaz 2010).

Ekstraksiyon: Beta glukan farklı kaynakların hücre duvarlarında proteinler, nişasta, alfa glukan, kitin gibi moleküllerle bağlantılı halde bulunmaktadır. Bu sebeple, beta glukanı elde etmek için bu moleküllerin hücre duvarından uzaklaştırılması gerekmektedir. Beta glukan elde etmek için kullanılan yöntemler genellikle katı – sıvı ekstraksiyon temeline dayanmaktadır. Tahıllar ve şapkalı mantarlarda ön işlemler yapıldıktan sonra ekstraksiyon yapılırken mikroorganizmalarda genellikle hücre duvarı parçalama ve ekstraksiyon eş anlı olmaktadır. Beta glukanın üretiminde alkali-asidik, enzimatik, ultrasonik, hızlandırılmış çözücü, süperkritik akışkan, sıcak su, Soxhlet,

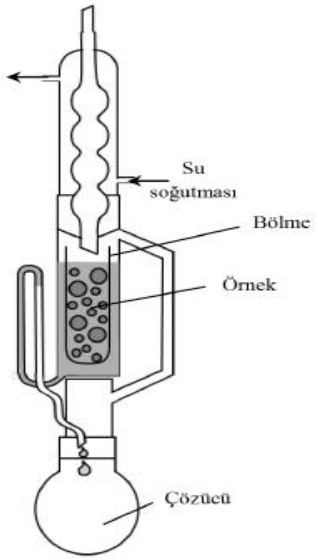
mikrodalga destekli ekstraksiyon gibi farklı birçok ekstraksiyon yöntemi kullanılmaktadır ve yapılan araştırmalarla da yeni yöntemlerde eklenmektedir. Kullanılan bazı ekstraksiyon yöntemleri aşağıda gibi özetlenmiştir.

1) **Alkali – asidik ekstraksiyonu:** Alkali – asidik ekstraksiyonu, katı – sıvı ekstraksiyon temeline dayanan ve farklı kaynaklardan beta glukan üretiminde en çok kullanılan çözücü ekstraksiyon çeşitlerinden biridir. Alkali ve asidik çözücüler kullanılarak ekstraksiyon gerçekleştirilmektedir. Alkali ve asidik çözücüler birlikte kullanılabildiği gibi alkali ya da asidik ekstraksiyonu olarak ayrı ayrı da kullanılmaktadır. Tahıllardan beta glukan üretiminde bu yöntem kullanılmasına rağmen daha çok mikroorganizmalardan (özellikle mayalar) ve şapkalı mantarlardan beta glukan üretiminde uygulanmaktadır. Mayaların hücre duvarlarının büyük bir bölümü alkali ortamda çözünebilen mannoproteinlerden, proteinlerden ve glukan, mannan, kitin gibi polisakkaritlerden şapkalı mantarların ise glikoproteinlerden, glukanlardan ve selülozlar/kitinlerden oluşmaktadır (Klis vd. 2002, Zekovic vd. 2008, Kwiatkowski ve Kwiatkowski 2012, Leong vd. 2021). Alkali kısmında mannoproteinlerin ve alkalide çözünen polisakkaritlerin çoğu giderildiği tahmin edilmektedir. Alkali – asidik ekstraksiyonun alkali kısmında en çok kullanılan çözücüler sodyum hidroksit (NaOH) ve potasyum hidroksittir (KOH). Yüksek pH değerlerinde olan çözücülerde nötr ve asidik amino asitlerin iyonlaşmasından dolayı proteinlein çözünürlükleri artmaktadır. Bu sebeple, kuvvetli alkali çözücüler kullanıldığında ekstraksiyon verimi ve protein giderimi artmaktadır (Kumar vd. 2021). Asidik kısmında ise hidroklorik asit (HCl), asetik asit (CH_3COOH), fosforik asit (H_3PO_4), perklorik asit ($HClO_4$) ve sitrik asit ($C_6H_8O_7$) kullanılmaktadır. Hidroklorik asit ve perklorik asit gibi asitler zehirli ve aşındırıcı olduğu için hem beta glukanın yapısına zarar verebilir hem de sağlık çalışmaları için kullanılan beta glukanın ekstraksiyonunda kullanılmasının iyi olmadığı görülmüştür (Sabuncu 2016, Maheshwari vd. 2017). Asidik kısım da ise kalan protein, polisakkarit, yağların giderimi ve nötrleşme gerçekleştirilmektedir. Kuvvetli alkalilerle ekstraksiyon yapılırken beta glukanın bozunmasını önlemek için eser miktarda kuvvetli alkali çözeltinin içine sodyum borhidrür katılmaktadır

(Brennan ve Cleary 2005). Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde genellikle suda çözünen beta glukana sahip kaynaklar olduğu, herhangi bir kaynaktan beta glukan ekstraksiyonunda ekstraksiyon süresi uzun olduğu ve/veya yüksek derişimli kuvvetli alkali çözeltilerle ekstraksiyon yapıldığı zaman sodyum borhidrür katıldığı fark edilmiştir (Beer vd. 1997, Knuckles vd. 1997, Amaral vd. 2008, Goudar vd. 2020).

2) **Sıcak su ekstraksiyonu:** Sıcak su ekstraksiyonu, katı – sıvı ekstraksiyonu temeline dayanan ve hem günlük hayatta hem de beta glukan üretiminde en çok kullanılan ekstraksiyon çeşitlerinden bir diğeridir. Genellikle suda çözünen beta glukan içeren kaynaklardan (tahıllar ve şapkalı mantarlar) beta glukan üretiminde kullanılmaktadır. Ekstraksiyonun isminden de anlaşılacağı gibi çözücü olarak su kullanılmaktadır. Ekstraksiyon suyun kaynama sıcaklığında gerçekleşmektedir. Özellikle tahıllardaki beta glukanların alkali ortamlarda suda çözünmeyen beta glukanlara göre daha kolay parçalanması ve bu sebeple alkali ortamlarda elde edilen beta glukanın saflığı daha yüksek olmasına rağmen molekül kütlelerinin azalması istenmediği için genellikle tahıllardan beta glukan üretiminde alkali ekstraksiyonu yerine sıcak su ekstraksiyonu tercih edilmektedir. Çünkü, beta glukan kıvam arttırıcı özellikte de kullanıldığı için molekül kütlesi düştükçe kıvam arttırıcı özelliği de negatif etkilenmektedir. Ayrıca, tahıllardan elde edilen beta glukanın düşük molekül kütlesi düştükçe biyolojik aktivitesi de düşmektedir. (Zeković vd. 2008, Maheshwari vd. 2017,2019, Gauder vd. 2020). Sıcak su ekstraksiyonun uzun ekstraksiyon süresi, yüksek sıcaklıkta ekstraksiyonun gerçekleşmesi, polisakkaritlerin bozunması gibi dezavantajları vardır (Feng vd. 2020).

3) **Soxhlet Ekstraksiyonu:** Geçmişten günümüze kullanılan ekstraksiyon yöntemlerinden biri de Soxhlet ekstraksiyonudur. Soxhlet ekstraksiyonu, Şekil 3.8’de gösterilen Soxhlet cihazında gerçekleştirilmektedir.



Şekil 3.8 Soxhlet ekstraksiyon cihazı (Buyuktuncel 2012)

Soxhlet ekstraksiyonu, genellikle katı ya da yarı katı örneklerin organik bileşiklerini ekstrakte etmek için kullanılmaktadır. Soxhlet ekstraksiyon cihazı; ısıtma, ekstraktör - sifonlama ve yoğunlaştırma olmak üzere üç ana bölümden oluşmaktadır. Isıtma bölümünde, ısıtıcı kullanılarak çözücünün kaynama noktası sıcaklığına kadar ısıtılmakta ve ekstraksiyon süresi boyunca çözücü bu sıcaklıkta tutulmaktadır. Isıtma bölümünde buharlaşan çözücü yoğunlaştırma bölümünde soğutucuyla yoğunlaştırılmaktadır. Yoğunlaşan çözücü ekstraktörün içine dolmaktadır. Ekstraktör ve sifonlama bölümünde örnekten çözücü kullanılarak istenilen organik bileşik ekstrakte edilmektedir ve sifonlama işlemi gerçekleşmektedir. Örnek kuru olmalıdır ve filtre kağıdının içine ya da selülozdan yapılmış ekstraktör kartuşunun içine koyulduktan sonra ekstraktörün içine yerleştirilmektedir. Yoğunlaşan çözücü ektraktörün içine akmakta ve örnekten istenen organik bileşik ekstrakte edilmektedir. Çözücü sifon yapılacak yere kadar dolmakta ve sifon kısmına gelince çözücü haznesine geri akmaktadır. Sifonlama sayesinde örnek taze çözücüyle birkaç defa temas etmektedir. Çevrim sayısı da istenen organik bileşiğin çözücüde çözünülebilirliğine ve örneğe nüfuz etmek için gerekli çözücü kapasitesine bağlıdır. Kullanılan örneğe göre çözücü seçilmelidir. Genellikle kullanılan çözücünün hacmi 100 – 500 mL'dir. Ekstraksiyon süresi genellikle 6 – 24 saat arasında değişmektedir. Soxhlet

ekstraksiyon yönteminin belirli aralıklarla taze çözücünün örneğe nüfuz etmesi, düşük maliyetli yöntem olması, kolay ve uygulanabilir bir yöntem olması gibi avantajları olmasına rağmen uzun ektraksiyon sürelerinde gerçekleşmesi ve büyük miktarda çözücü kullanılması gibi dezavantajları da vardır. Bu dezavantajları gidermek için yüksek basınçlı Soxhlet ekstraksiyonu, ultrasonik veya mikrodalga destekli Soxhlet ekstraksiyonu gibi yöntemler bulunmuştur (Buyuktuncel 2012, Moldoveanu ve David 2015). Soxhlet yöntemi, daha çok tahıllardan ve şapkalı mantarlardan beta glukan üretiminde kullanılmaktadır. Literatürde mayalardan beta glukan eldesinde bu yöntem kullanılmamıştır. Literatürdeki yapılan çalışmalarda su, etanol, petrol eteri gibi çözücüler, farklı ektsraksiyon süreleri (1 – 24 st) ve katı/çözücü oranları (25, 30 vb.) kullanılarak beta glukan üretiminin belli kısımlarında bu yöntem kullanılmıştır (Marconi vd. 2014, Gründemann vd. 2015, Nyman vd. 2016, Alzorqi vd. 2017, Yang vd. 2018).

4) **Ultrasonik destekli ekstraksiyon:** 19. yüzyılın sonunda keşfedilen ultrasonik dalgalar gıda, ilaç, kozmetik gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Belirli frekanstaki dalgalar (20 kHz ve üstündeki) kavitasyonla birlikte fazla sayıda baloncuk oluşturmaktadır. Oluşan baloncuklar sayesinde hücre duvarları mekanik olarak sarsılarak parçalanmaktadırlar. Parçalandıktan sonra çözücü ile istenilen bileşik ekstrakte edilmektedir. Katı örneklerden istenilen bileşiklerin ekstraksiyonu için ultrasonik su banyosu veya ultrasonik prob kullanılmaktadır. Ultrasonik su banyosunda hem daha çok örnek ekstrakte edilebildiği hem de daha ucuz olduğu için daha çok tercih edilmektedir. Ultrasonik dalganın frekansı, süresi, örnek miktarı, örneğin boyutu gibi faktörler ekstraksiyon verimini etkilemektedir. Beta glukanın yapısına zarar vermemesi, kısa zamanda etkili hücre duvarı parçalaması, daha az çözücü kullanılması gibi avantajlardan dolayı farklı kaynaklardan beta glukan üretiminde ultrasonik destekli ekstraksiyonun kullanımı artmaktadır. Literatürde farklı zamanlarda (15, 30, 45, 60 dk), farklı frekanslarda (20, 40) ve farklı kaynaklardan (arpa, buğday, yulaf, mantarlar, mayalar) ultrasonik destekli ekstraksiyon kullanılarak beta glukan

üretilmiştir (Du vd. 2014, Zhu vd. 2016, Sabuncu vd. 2016, Koçak 2019, Morales vd. 2019, Cui ve Zhu 2021).

Saflaştırma: Bu işlem beta glukanın saflığını arttırmak için yapılmaktadır. Ekstraksiyondan sonra hücre duvarında kalan proteinler, lipitler ve kitinler uzaklaştırılmaktadır (Sabuncu 2016, Zhu vd. 2016).

- ✓ İzoelektrik çöktürme
- ✓ Amonyum sülfatla çöktürme
- ✓ Etanolle çöktürme
- ✓ Anyon değişim kromatografisi
- ✓ Selüloz kolon kromatografisi
- ✓ Enzim
- ✓ Topaklaşma ve süzme
- ✓ Santrifüjleme

Kurutma: Beta glukanın küflenmemesi için kuru halde depolanmalı ve aktarılmalıdır. Sprey kurutma ve dondurarak kurutma kullanılan yöntemlerdendir (Errenst vd. 2021).

3.6.2 Mayadan beta glukan üretiminde kullanılan yöntemler

Mayalardan beta glukan eldesinde alkali asidik, ultrasonik destekli, enzimatik, sıcak su ekstraksiyonu vb. birçok yöntem uygulanmaktadır. Literatürde yapılan bazı çalışmalar aşağıdaki çizelge 3.7'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.7 Farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak mayalardan beta glukan üretimi

Kaynak	Ekstraksiyon	Verim	Beta Glukanın Saflığı	Referans
S. cerevisiae	Sıcak su - Enzimatik	% 25 - 26	% 92	Freimund vd. 2003
Atık *S. cerevisiae*	Otoliz - Sıcak su – Homojenizasyon - Enzimatik	% 11	% 93	Liu vd. 2008
Atık *S.cerevisiae*	Alkali, Alkali – Asidik, Sıcak su uygulaması	% 6.29 – 10.29	% 22.91 – 57.69	Yılmaz 2010
S. cerevisiae	Sıcak su - Asidik	-	% 15.5	Bzducha-Wrobel vd. 2014
Rhodotorula mucilaginosa	Alkali	% 25	-	Valasques Junior vd. 2014
S. cerevisiae	Alkali - Asidik	% 38.5	% 91	Khan vd. 2016
S. cerevisiae	Ultrasonik Destekli Alkali - Asidik	% 25	32.38 µg/mL	Sabuncu 2016
S. cerevisiae	Alkali	% 19	-	Tang vd. 2017
S. cerevisiae	Homojenizasyon – Otoliz – Alkali - Asidik	-	% 67.4	Dimopoulos vd. 2020

Freimund vd. (2003), *S. cerevisiae* mayasından beta glukan üretiminde sıcak alkali veya asidik ekstraksiyon dışında yeni bir yöntem geliştirmeyi amaçlamışlardır. Bu çalışmada, iki tane *S. cerevisiae* hücre duvarından beta glukan üretimi yapılmıştır. Hücre duvarlarından biri küçük ölçekte üretimde kullanılırken diğer hücre duvarı büyük ölçekte üretimde kullanılmıştır. Her iki hücre duvarına da sırasıyla sıcak su ekstraksiyonu ve enzimatik ekstraksiyon (proteaz enzimi) uygulandıktan sonra kalan çökeleğin bir kısmı asetonla muamele diğer kısmı etanolle muamale edilmiştir. Belirli analizler yapılarak yağ, protein, beta glukan, mannan ve glikoz içerikleri elde edilmiştir. Beta glukan verimi sonu asetonla muamele edilen hücre duvarında % 26 diğer hücre duvarında % 27 elde edilmiştir. Hem büyük ölçekte hem de küçük ölçekte üretilen beta glukan saflığı % 92 bulunmuş ve bu yöntemle de büyük ölçekte yüksek saflıkta beta

glukan üretilebileceğini kanıtlamışlardır. Liu vd. (2008), atık *S. cerevisiae* birkaç yöntemin birleşimi kullanılarak beta glukan eldesi amaçlanmıştır. Beta glukan eldesinde sırasıyla otoliz (pH 5.0, 24 st ve 55°C koşullarında), sıcak su ekstrakiyonu, yüksek basınçlı homojenizatörle homojenizasyon, organik çözücüyle muamale (aseton, izopropil alkol, bütil alkol, etanol, hekzan, metanol ve petrol eteri) ve enzimatik ekstraksiyon (proteaz) yöntemleri kullanılmıştır. Homojenizatörün basıncının hücre duvarı parçalanmasına etkisi de incelenmiştir. Sonuç olarak, 70 MPa basınca sahip homojenizatör kullanıldığında maya hücrelerinin % 95'inin parçalandığı, yağları en iyi izopropil alkolün giderdiği, % 11 (w/w) beta glukan verimi ve % 93 beta glukan saflığı elde edilmiştir. Asit veya alkali ekstraksiyon yapılmadan daha çevreci, büyük ölçekte daha kolay üretim yapılabilen ve daha ekonomik yöntem olduğu belirtilmektedir. Yılmaz (2010), atık ekmek mayasından beta glukan üretiminde çeşitli sodyum hidroksit normaliteleri (0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.50 N), ekstraksiyon süreleri (30, 60, 90 dk), ekstraksiyon sıcaklığı (65, 70, 80, 85, 90°C) ve yıkama sayıları denenerek hücre duvarından en yüksek protein atılımını sağlayan yöntem belirlenmiştir. Dolayısıyla, en yüksek beta glukan saflığını veren yöntem de bulunmuştur. Ayrıca, farklı yöntemlerde (patentteki alkali – asidik ekstraksiyon ve sıcak su ekstraksiyonu) incelenerek protein atılımı ve beta glukan üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Protein, yağ ve beta glukan analizleri yapılarak en uygun protein giderimi 0.5 N, 90°C sıcaklık, iki kez yıkama ve 60 dk ekstraksiyon koşullarında elde edilmiştir. Alkali ekstraksiyonun otolizle birlikte kullanımının etkisi de inclenmiş ve en yüksek beta glukan saflığı 0.5 N sodyum hidroksitte otolizlenip iki kez yıkanmış örnekte bulunmuştur (%57.69). En düşük beta glukan saflığı % 22.91 sadece otolizlenmiş numunede bulunmuştur. Bu parametrelerin dışında basıncında beta glukan eldesinde etkisi olduğu sonucuna varılmıştır. En düşük beta glukan verimi % 6.29 ve en yüksek verimi % 10.29 bulunmuştur.

Bzducha-Wrobel vd. (2014), farklı hücre duvarı parçalama yöntemleri kullanılarak ekmek mayasından beta glukan eldesinde hücre duvarının etkisi incelenmesi ve en iyi yönteminin veya yöntemlerin bulunması amaçlanmıştır. Bu amaçla, otoklavlama, otoliz, sonikasyon, boncuklarla homojenizasyon hücre parçalama yöntemleri ayrı ayrı ya da otoklav – sonikasyon, otoklav - boncuklarla homojenizasyon, otoliz – sonikasyon ve otoliz - boncuklarla homojenizasyon birleşik yöntemleri kullanılmıştır. Bu hücre duvarı

parçalama yöntemleri gerçekleşirken parçalanan organik bileşikler su veya tris HCl tampon çözeltisi ortamında ekstrakte edilmiştir. Parçalanan hücrelerin görüntülerine mikroskopta incelenmiş ve toplam sakkarit, beta glukan, protein, çözünen toplam miktarlarının belirlenmesi için belirli analizler yapılmıştır. En yüksek beta glukan saflığı (% 15.5) veren yöntem otoliz – sonikasyon hücre duvarı parçalama birleşik yöntemi bulunmuştur. Sabuncu (2016), *S. cerevisiae* mayasının farklı çoğalma koşullarının beta glukan içeriğine etkisi incelenmiş ve istatistiksel deney tasarımı (merkezi kompozit yöntemi) kullanılarak uygun çoğalma koşulları belirlenmiştir. Ayrıca, PID (Proportional–Integral–Derivative Control) kontrol algoritmalrıyla besi ortamının pH kontrolü sağlanarak beta glukan içeriğinin arttırılması amaçlanmıştır. Yapılan deneyler sonucunda en uygun besi ortamı koşulları 34.7 °C, pH 4.8 ve EDTA katkı maddeli bulunmuştur. Bu koşullarda en yüksek beta glukan içeriği (21.65 µg/mL) elde edilmiştir. Maya çoğaltma işleminden sonra ultrasonik destekli alkali – asidik yöntemi kullanılmıştır. Alkali kısmında 2 M sodyum hidroksit ve asidik kısmında % 3'lük asetik asit çözeltisi kullanılmıştır. Ultrasonik dalgalarla hücre duvarı parçalanırken sodyum hidroksit çözeltisiyle ekstraksiyon eş anlı olarak yapılmıştır. En yüksek beta glukan verimi ise 0.249 mg kuru beta glukan/yaş maya olarak hesaplanmıştır. Dimopoulos vd. (2020), beta glukan ve maya özütünün eldesinde homojenizasyonun etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. *S. cerevisiae* hücresine sırasıyla farklı basınçlarda (200, 500 ve 800 bar) homojenizasyon, pH 5.5, 52°C ve farklı sürelerde (2 – 48 st) otoliz, alkali - asidik yöntemleri uygulanmıştır. Alkali – asidik yöntem bazı örneklere uygulanmış bazılarına uygulanmamıştır. Bu durumunda etkisine bakılmıştır. Sonuç olarak, en yüksek beta glukan saflığı (% 67.4) 800 bar basınçlı homojenizasyon, otoliz süresinin 24 st olduğu ve otolizden sonra alkali – asidik ekstraksiyonun uygulandığı koşullarda bulunmuştur.

Özetlemek gerekirse, literatürdeki yapılan çalışmalarda görüldüğü üzere hem beta glukan veriminin ve saflığının optimum değerini bulmak hem de ekonomik, çevreci ve kolay uygulanan yöntemler geliştirmek için çeşitli hücre duvarı parçalama yöntemleri ve ekstraksiyon yöntemleri uygulanmıştır. Yeni yöntemlerin geliştirilmesinin yanı sıra özellikle mikroorganizmalarda etkili bir yöntem olduğu için yapılan çalışmaların çoğunda alkali – asidik ekstraksiyonu kullanıldığı görülmektedir.

3.6.3 Beta glukan verimi ve saflığı

Beta glukan verimi, literatürdeki yapılan çalışmalarda değişik birimlerde tanımlanmaktadır: % w/w, % g kuru beta glukan/ g kuru kaynak, % g kuru beta glukan/ g yaş kaynak, % g/L vb. Çalışmalarda en çok kullanılan birim ise % w/w'dur. Yapılan çalışmalarda genellikle kuru beta glukan ve kuru maya verimde kullanılmaktadır. Çünkü her beta glukan üretiminden sonra kalan yaş beta glukan miktarı içindeki su miktarı farklı olacağından aynı kaynaktan aynı yöntemle edilen beta glukanların verimlerinin çok farklı bulunmasına hem de elde etmemiz gereken beta glukan veriminden çok fazla değerler bulunmasına sebep olacaktır. Örneğin, *S. cerevisiae* mayasından elde edilebilecek beta glukan verimi % 8 – 16 arasında olmalıdır. Ancak, yaş maya kullanıldığında bu oran daha fazla bulunmaktadır ve sonuçları yanlış yorumlamamıza sebep olabilmektedir. Bu sebeplerden dolayı, bu tez çalışması kapsamında beta glukan verimi eşitlik 3.1'deki gibi tanımlanmıştır.

$$\%\,Verim = \frac{g\ kuru\ beta\ glukan}{g\ kuru\ maya}\ x\ \%\ 100 \qquad (3.1)$$

Farklı kaynaklardan farklı beta glukan üretim ymntemleriyle elde edilenler beta glukan içeren çökeleklerdir. Beta glukan dışında protein, yağ ve kitin gibi maddeler de çökelekte bulunmaktadır. Fenol veya antron – sülfürik asit ve enzimatik analiz yöntemleriyle elde edilen çökeleğin ne kadarının beta glukandan oluştuğu bulunmaktadır. Kullanılan yönteme göre beta glukanın saflığının birimi değişmektedir. Antron veya fenol – sülfürik asit yönteminde glikoz derişimi cinsinden (mg/mL, µg/mL, µg/µL vb.) veya enzimatik analiz yönteminde beta glukan saflığı yüzdelik olarak (%, % w/w) olarak verilmektedir. Bu tez kapsamında her iki yöntemde (antron – sülfürik asit ve enzimatik analiz) ile de beta glukan saflığı belirlendiği için iki farklı birim (% ve mg/mL) olarak verilmiştir.

3.6.4 Beta glukan üretiminde verim ve saflığı etkileyen parametreler

Beta glukan verimini etkileyen ilk parametre elde edildiği kaynaktır. Çünkü doğal kaynaklar kullanıldığı için en yüksek verim kaynakta bulunan maksimum beta glukan miktarı kadar elde edilebilmektedir. Ekstraksiyon yöntemleri de verimi kaynaklar kadar etkilediği için önemlidir. Mayalardan beta glukan üretimiyle ilgili literatürde yapılan çalışmalarda da görüldüğü üzere kullanılan çoğunun temeli katı – sıvı ekstraksiyon yöntemine dayanmaktadır. Farklı yöntemlerin beta glukan verimini etkileyen farklı parametreleri olsa da temel olarak optimize edilmesi parametreler katı – sıvı ekstraksiyonda verimi etkileyen parametreler olduğu görülmektedir. Katı – sıvı ekstraksiyonunda verimi etkileyen temel ve önemli parametreler; sıcaklık, süre, çözücü cinsi, pH, katı/çözücü oranıdır.

Beta glukanın saflığı, beta glukanın biyolojik aktivitesini ve kullanım alanlarını etkilediği için beta glukan üretiminde beta glukan verimi kadar önemlidir. Beta glukanın verimini etkileyen parametreler beta glukanın saflığını da etkilemektedir. Beta glukanın saflığını da elde edildiği kaynak, ekstraksiyon yöntemleri ve koşulları etkilemektedir. Çizelge 3.7'de özetlenen çalışmalardaki verim ve saflığın farklı olmasının sebebi de genellikle ekstraksiyon yöntemlerinin ve koşullarının biribirinden farklı olmasıdır.

Beta glukanın belirlenen ekstraksiyon yönteminde hem en yüksek verim ve saflık değerlerini elde etmek hem de elde edilen en yüksek değeri sağlayan koşullarda üretimi standartlaştırmak için belirlenen ekstraksiyon koşullarının optimize edilmesi gerekmektedir. Optimize edilecek ekstraksiyon parametreleri belirlenip istatistiksel deney tasarım yöntemleri (Box – Behnken, tam faktöriyel, merkezi kompozit, Plackett – Burman, Taguchi vb.) kullanılarak beta glukan veriminin ve saflığının optimum değerleri bulunmaktadır.

3.7 İstatistiksel Deneysel Tasarım

Bilimsel çalışmalarda çalışmayı etkileyen birçok parametre ve çalışma sonucu elde edilen birçok sonuç bulunmaktadır. Parametrelerin ve sonuçların kendi aralarındaki ilişkilerin, parametrelerle sonuçların birbirleriyle olan ilişkilerinin etkilerinin değerlendirilmesi; daha az bilimsel çalışma ile doğru ve anlamlı sonuçlara ulaşarak zamandan, enerjiden ve malzemeden tasarruf edilmesi için istatistiksel deneysel tasarım yöntemleri kullanılmaktadır. İstatistiksel deneysel tasarımı, bir bilimsel çalışmada belirlenen faktörlerin en az hatayla sonuçlara ulaşmak için yapılan tasarımdır. Faktörler, deneyde kontrol edilebilir bağımsız değişkendir. Yanıt ise deneyde elde edilmek istenen sonuçlardır ve bağımlı değişkenlerdir (Anonim 2021a).

İstatistiksel deneysel tasarımı, eleme, karakterizasyon ve optimizasyon amacıyla kullanılmaktadır. Eleme tasarımı, deneysel çalışmaya etki eden faktörlerin içinden en önemli olan faktörleri bulmayı sağlamaktadır (Anonymous 2021g). Optimizasyon, bilimsel çalışmadaki ya da prosesteki sınırlanan faktörlerin birbirleriyle olan ilişkisini ve faktörlerin yanıtların üzerindeki etkisini değerlendirip en iyi yanıtı veren faktörlerin bulunmasıdır (Koç ve Kaymak – Ertekin 2010). Literatürdeki birçok çalışmada istatistiksel deneysel tasarım yöntemlerini (Box – Behnken, tam faktöriyel, merkezi kompozit, Plackett – Burman, Taguchi, ortogonal, kesirli faktöriyel vb.) kullanarak elde etmek istenen optimum değerler bulunmaktadır. Du vd. (2014), arpadan beta glukan eldesinde hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonun belirli parametrelerini optimize etmek için Box – Behnken istatistiksel deneysel tasarım yöntemi kullanılmıştır. Yanıt olarak beta glukan verimi; faktörler olarak ekstraksiyon süresi, sıcaklığı ve çevrim sayısı belirlenmiştir. Gangopadhyay vd. (2015), arpadan beta glukan eldesinde ekstraksiyon yönteminin koşulları (sıcaklık, pH) merkezi kompozit tasarım kullanılarak optimize edilmiştir. Beta glukan verimi ve molekül kütlesi yanıt olarak belirlenmiştir. Gil-Ramírez vd. (2019), *Lentinula edodes* şapkalı mantarından beta glukan eldesinde mikrodalga destekli ekstraksiyonun sıcaklık ve süre koşulları tam faktöriyel tasarım kullanılarak optimize edilmiştir. Toplam karbondioksit içeriği ve polisakkarit verimi yanıt olarak belirlenmiştir. Zhao vd. (2013), mikroalglerden karbonhidrat eldesinde kullanılan ultrasonik destekli ekstraksiyonun koşulları (ultrasonik güç, ekstraksiyon

süresi, akış hızı ve hücre derişimi) kesirli faktöriyel tasarımı kullanılarak optimize edilmiştir. Glikoz verimi yanıt olarak belirlenmiştir. İstatistiksel deneysel tasarım, çeşitli paket programlar kullanılarak yapılmaktadır: Minitab, Design Expert, SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), SAS (Statistical Analysis System) vb.

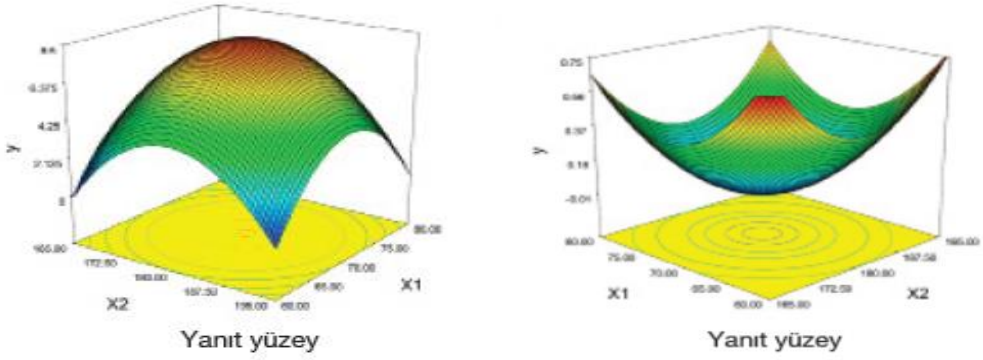
3.7.1 Yanıt yüzey yöntemi (RSM)

1951 yılında Box and Wilson tarafından bulunan yanıt yüzey yöntemi, süreç değişkenlerinin deneysel uzayını incelemek amacıyla deneysel çalışmanın yanıtı ve faktörleri arasındaki ilişkiyi belirlemek için kullanılan empirik modelleri kapsayan optimizasyon yöntemidir. Bu yöntem, az sayıda etkili deneme yapmayı sağlayan eleme, faktörlerin oluşturduğu yanıtın optimum noktaya yaklaşıp yaklaşmadığını belirleyen bölge araştırması ve optimum nokta çevresinde gerçek yanıt fonksiyonunun oluşturduğu eğriye uyumlu modelin bulunduğu ürünün optimizasyonu olmak üzere üç basamaktan meydana gelmektedir (Koç ve Kaymak – Ertekin 2010).

Yanıt ve faktör arasındaki matematiksel model tahmin edilmektedir (Koç ve Kaymak – Ertekin 2010). Yanıtın Taylor genişleme yüzey eğrisinin belirlendiği yanıt yüzey metodunda, eşitlik 3.2'de verilen Taylor denklemi kullanılmaktadır. Model parametrelerinin tahmin edilmesinde en küçük kareler yöntemi kullanılmaktadır. ANOVA analiziyle modelin uygunluğu ve modelin uyumsuzluğu test edilmektedir. Çalışmalarda kullanılan model anlamlı uyum eksikliği anlamsız olduğunda model geçerli olmaktadır (Akkuş ve Karabudak 2020).

$$Y = A + Bx_1 + Cx_2 + \cdots + Kx_1^2 + Lx_2^2 + \cdots + Px_1x_2 + Rx_1\,x_3 + \cdots \qquad (3.2)$$

Eşitlik 3.2'deki denklemde A,B,C,D… katsayılar ve x ise faktörlerdir (Akkuş ve Karabudak 2020). Yanıt yüzey yöntemiyle elde edilen grafiklere şekil 3.9 örnek olarak verilmiştir.



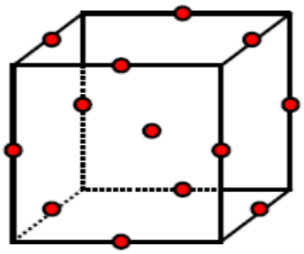
(a) (b)

Şekil 3.9 Maksimum noktayı (a) ve minimum noktayı (b) gösteren yanıt yüzey grafikleri (Koç ve Kaymak – Ertekin 2010)

Grafikteki tepe noktasının maksimum ve minimum olduğu grafikler gösterilmiştir. Box - Behnken ve merkezi kompozit tasarımlar birer yanıt yüzey yöntemleridir.

3.7.2 Box – Behnken tasarımı

Yanıt yüzey yöntemlerinden biri olan Box – Behnken tasarımı deneysel çalışmalarda en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Faktöriyel tasarımları içermeyen, yanıtı etkileyen değişkenlerin (faktörlerin) lineer, üstel ve ikili etkilerinin incelendiği karesel tasarımdır. Bu tasarım yönteminde, her bir faktör için minimum (-1), maksimum (1) ve merkez (0) olmak üzere üç seviyede yanıttaki değişim araştırılmaktadır. Box – Behnken tasarımında birinci ve ikinci dereceden model katsayılarında iyi bir şekilde tahmin yapılabilmektedir. Ancak, eksen noktaları mevcut olmadığı için bu tasarımda belirlenen faktör seviyelerinin alt ve üst sınırlarının dışına çıkılamamaktadır. Box – Behnken tasarımının geometrik gösterimi şekil 3.10'daki gibidir. Merkezi kompozit deneyinde daha fazla nokta bulunduğu için bu tasarım yöntemi merkezi kompozit tasarımına göre maddi ve zaman olarak daha ekonomiktir. Faktörlerin seviyeleri tahmin edilebiliyorsa bu tasarım kullanılmalıdır (Değirmencioğlu ve Yazgı 2006, Akkuş ve Karabudak 2020).



Şekil 3.10 Box – Behnken tasarımının geometrik gösterimi (Değirmencioğlu ve Yazgı 2006)

Literatürde Box – Behnken yöntemi kullanılarak optimizasyon yapan birçok çalışma bulunmaktadır. Alzorqi vd. (2017), *Ganoderma lucidum* şapkalı mantarından beta glukan eldesinde kullanılan ultrasonik destekli ekstraksiyonun koşulları (güç, süre, sıcaklık) Box – Behnken tasarımı kullanılarak optimize edilmiştir. Beta glukan verimi yanıt olarak belirlenmiştir. Wu vd. (2018), arpadan beta glukan eldesinde ekstraksiyon işleminden önce *Aspergillus niger* ve *Rhizopus oryzae* mantarlarının çoğalma ortamına arpa eklenerek beta glukanın ekstrakte edilebilmesini kolaylaştırmak amaçlanmıştır. Ekstraksiyon öncesi ön işlem olarak yapılmıştır. Fermentasyon ortamlarının koşulları (hacim, sıcaklık ve süre) Box – Behnken tasarımları kullanılarak optimize edilmiştir. % Beta glukan ekstrakte edilebilirliği yanıt olarak kullanılmıştır. Zhu vd. (2016), *Polygonum multiflorum* şapkalı mantarından ultrasonik destekli ekstraksiyon kullanılarak polisakkarit elde edilmiştir. Ekstraksiyon koşulları (güç, süre, sıcaklık ve çözücü/katı oranı) Box – Behnken tasarımı kullanılarak optimize edilmiştir. Ekstraksiyon verimi yanıt olarak belirlenmiştir.

Bu tez kapsamında *S. cerevisiae* mayasından beta glukan eldesinde kullanılan yöntemlerden biri ultrasonik destekli alkali – asidik ekstraksiyonudur. Bu yöntemin ekstraksiyon koşulları Box – Behnken tasarımı kullanılarak optimize edilmiştir. Ekstraksiyon sıcaklığı, süresi ve çözücü/katı oranı tasarımın faktörleri olarak belirlenirken yanıtları beta glukan verimi ve beta glukan saflığı olarak belirlenmiştir. Faktörler ve yanıtlar, kullanılan yöntemin hem katı – sıvı ekstraksiyon temeline dayanmasıyla birlikte katı – sıvı ekstraksiyonun verimi etkileyen parametrelerin hem de literatürde yapılan çalışmaların incelenmesiyle belirlenmiştir.

Literatürde birçok çalışmada şapkalı mantarlardan veya tahıllardan beta glukan eldesinde kullanılan ekstraksiyon yöntemlerinin koşullarının optimizasyonunda Box – Behnken tasarım kullanılmasına rağmen *S. cerevisiae* mayasından beta glucan eldesinde kullanılan ekstraksiyon yöntemlerinin koşullarının optimizasyonunda Box – Behnken tasarım yöntemi kullanılan bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında bu yöntem kullanılarak literatüre yenilik katılmış olacaktır.

3.7.3 Faktöriyel tasarım

Faktöriyel tasarım, araştırmalardaki faktörlerin eş zamanlı değiştiği temeline dayanan ve tarama amacıyla literatürde en çok kullanılan istatistiksel deneysel tasarım yöntemlerinden biridir. İki ve ikiden fazla faktörün ayrı ayrı ve birbirleri ile ilişkilerinin etkileri aynı zamanda incelenmektedir. Tam ve kesirli olmak üzere iki farklı faktöriyel tasarım vardır. Çok boyutlu tasarım yöntemi olan tam faktöriyel tasarımı, proseslerin düşük maliyetli ve yüksek kalitede olmasını sağladığı için yaygın olarak kullanılmaktadır. Tam faktöriyel tasarımının temel denklemi eşitlik (3.3)'te verilmiştir (Akkuş ve Karabudak 2020).

$$N = a^b \qquad (3.3)$$

N: Deney sayısı

a: Seviye sayısı

b: Faktör sayısı

Bu tez kapsamında *S. cerevisiae* mayasından beta glukan eldesinde kullanılan diğer bir yöntem otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyonudur. Bu yöntemin ekstraksiyon koşulları tam faktöriyel tasarımı kullanılarak optimize edilmiştir. Tampon/katı oranı ve otoliz süresi tasarımın faktörleri olarak belirlenirken yanıtları beta glukan verimi ve beta glukan saflığı olarak belirlenmiştir. Faktörler ve yanıtlar, literatürde yapılan çalışmaların incelenmesiyle belirlenmiştir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1 Ön Çalışmalar

4.1.1 Farklı ekstraksiyon yöntemlerinin beta glukanın verimine ve molekül kütlesine etkisinin incelenmesi

Bu ön çalışmada literatür araştırması sonucu keşfedilen ekstraksiyon yöntemlerinin beta glukanın veriminin ve molekül kütlelerinin üzerine etkisi olduğunu ön çalışmayla teyit etmektir. Bu amaç doğrultusunda katı besi ortamından alınan *S.cerevisiae* mayası sıvı besi ortamına aktarılıp 12 saat, 32°C ve 150 rpm koşullarında inkübatörde bekletilmiştir. 1/10 oranında ölçek büyütmesi yapılıp aynı koşullarda 8 saat daha inkübatörde bekletilmiştir. Mikroorganizmalı besi ortamı santrifüjlenip çöken maya hücreleri dört eşit parçaya bölünmüştür. İki tanesine otoliz ultrasonik destekli asidik diğer iki tanesine ultrasonik destekli alkali – asidik ekstraksiyonu yöntemi uygulanmıştır. Otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyon yönteminde; eşit kütleye ayrılan maya hücreleri sodyum fosfat tamponuna aktarılmıştır ve 50°C, 24 st ve 200 rpm koşullarında inkübe edilmiştir. Otoliz işleminden sonra ultrasonik su banyosunda hücreyi parçalayan enzimlerin inaktive olması için 85°C ve 15 dk bekletilirken sonikasyon işlemi de yapılmıştır. Santrifüjleme ve saf suyla yıkama yapılmıştır. % 3'lük asetik asitle ve etanolle muamele edilmiş ve etüvde kurutulmuştur. Diğer iki eşit kütleye bölünen maya hücrelerine uygulanan ultrasonik destekli alkali – asidik ekstraksiyon yönteminde maya hücreleri sıcak su banyosunda sırasıyla 2M NaOH ve % 3'lük asetik asit çözeltilerinde bekletilmiştir. Etanolle muamele edilmiş ve kurutulmuştur. Bu iki yöntem optimizasyon deneyleri bölümlerinde daha detaylı anlatılmıştır. Kurutulan örneklerin verimi g kuru beta glukan/g yaş maya üzerinden verilmiştir. Beta glukanların karakterizasyonu için de FTIR analizi yapılmıştır.

Beta glukanların molekül kütlesi Ubbelohde yöntemiyle bulunmuştur. Bu yöntemdeki Mark – Houwing katsayıları mayadan elde edilen beta glukan için literatürde yoktur. Bu sebeple, mayadan elde edilen beta glukanın yapısına en çok benzeyen selüloz nitratın

katsayıları kullanılarak yaklaşık molekül kütlesi hesaplanmıştır. Çözücü olarak tetrahidrofuran (THF) kullanılmıştır.

4.1.2 Kuru ve yaş mayanın beta glukan ektstraksiyonuna etkisinin incelenmesi

Biyoreaktörde çoğaltılan *S.cerevisiae* mayasının ekstraksiyonda önce kuru veya yaş olmasının beta glukan ekstraksiyonuna ve verimine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, biyoreaktörde 1/10 ölçek büyütmeyle çoğaltılan maya santrifüjlendikten sonra dört eşit parçaya bölünmüştür. İki eşit maya kütlesine hemen ultrasonik destekli alkali – asidik ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır. Öteki iki maya kütlesi kurutulduktan sonra ultrasonik destekli alkali – asidik ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır. Beta glukanların karakterizasyonu için de FTIR analizi yapılmıştır.

4.1.3 Ticari ve laboratuvarda üretilen mayaların beta glukan verimlerinin ve saflıklarının karşılaştırılması

Ticari üretilen mayalar (Pak Maya) ile laboratuvarda ürettiğimiz mayanın beta glukan verimlerinin ve saflıklarının karşılaştırılması amaçlanmıştır. Ticari olarak satılan Pak maya instant ve Pak maya aktif 1'er g tartıldıktan sonra mayalara ultrasonik destekli alkali – asidik ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır. Laboratuvarda EDTA ekli besi ortamında 1/10 ölçek büyütme ile çoğaltılan maya hücreleri kurutulduktan sonra ultrasonik destekli alkali – asidik ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır. Beta glukan saflıklarını belirlemek için antron – sülfürik asit analizi ve beta glukanların karakterizasyonunu belirlemek için FTIR analizi yapılmıştır.

Yapılan ön çalışmalardan sonra hem standart üretim yöntemiyle üretilmesinden dolayı mayanın içeriğinin üretimlerde aynı olması ve tez kapsamında yapılacak ekstraksiyonlar için yeterli miktarda maya üretimi ve kurutulmasını sağlayacak alt yapı olmadığı için bu aşamadan sonra deneylerde kaynak olarak ticari maya kullanılmıştır.

4.2 Ultrasonik Destekli Alkali – Asidik Ekstraksiyonu

4.2.1 *S.cerevisiae* mayasından beta glukan üretiminde ekstraksiyonda kullanılan farklı alkali çözücülerin beta glukan üretimine etkisinin incelenmesi

Alkali asidik ekstraksiyonu yönteminde hücre duvarı parçalama ve ekstraksiyon basamaklarının her ikisinde de kullanılan çözücü türünün seçimi öncelikle belirlenmesi gereken proses değişkenidir. Bu amaçla, bu yöntemde yaygın şekilde çözücü olarak kullanılan sodyum hidroksitin yanı sıra farklı bazik çözeltilerin yapılacak çalışmalarda sodyum hidroksitin yerine alkali olarak kullanılıp kullanılamayacağı araştırılmıştır. Bu kapsamda literatürde ekstraksiyonda en çok kullanılan ve en yüksek verim elde edilen NaOH derişimlerindeki pH değerlerinde (pH 10 ve 12) K_2CO_3 ve $Ca(OH)_2$ çözeltileri ekstraksiyonda çözücü olarak kullanılmıştır (Yılmaz 2010, Kim ve White 2013, Du vd. 2014, Sabuncu 2016, Tang vd. 2017).

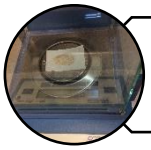
Kullanılacak alkali çözücülerin pH değerleri 10 ve 12 olarak ayarlanmıştır. Ticari mayadan 1'er g örnek tartılmıştır. Farklı pH değerlerine sahip farklı alkali çözücüler tartılan örneklere eklenerek 0.008 v/w oranında süspansiyon oluşturmuştur. 90°C'deki ultrasonik su banyosunda 15 dk sonikasyonla birlikte 1 saat süspansiyonlar bekletilmiştir. Santrifüjleme ve saf suyla yıkamadan sonra 0.008 v/w oranında % 3'lük asetik asit çözeltisi çökeleklere eklenmiştir ve 85°C ve 1 saat su banyosunda bekletilmiştir. Santrifüjleme, saf suyla ve mutlak etanolle yıkama ve kurutma işlemlerinden sonra kuru beta glukan elde edilmiştir. Bu ekstraksiyon yönteminde standart olarak kullanılan 2 M NaOH çözeltisiyle de bu deney yapılmıştır ve numunenin ismi kontrol olarak adlandırılmıştır. Kurutulduktan sonra havanda beta glukanların parçacık boyutu küçültülmüştür. Beta glukan saflıklarını belirlemek için antron – sülfürik asit analizi ve beta glukanların karakterizasyonunu belirlemek için FTIR analizi yapılmıştır.

4.2.2 Ultrasonik destekli alkali-asidik ekstraksiyon yönteminin koşullarının optimizasyonu

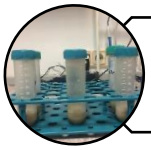
Literatürde yapılan çalışmalar incelenerek mayalardan beta glukan eldesinde en çok kullanılan ekstraksiyon yöntemlerinden biri olan alkali-asidik ekstraksiyon yönteminin çözücü/katı oranının, ekstraksiyon süresinin ve sıcaklığının Box-Behnken istatistiksel deney tasarımı kullanılarak optimizasyonu yapılmıştır. Üç seviyeli, üç faktörlü, iki yanıtlı ve üç tekrarlı deney tasarım matrisksi oluşturularak deney sayısı ve her bir deneyin hangi koşullarda yapılacağı belirlenmiştir. Oluşturulan tasarım matriksi çizelge 4.1'de verilmiştir. Ultrasonik destekli alkali-asidik ekstraksiyon yönteminin basamakları şekil 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Ultrasonik destekli alkali-asidik ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu için oluşturulan Box – Behnken deney tasarım matrisi

Deney No	Çözücü/Katı Oranı (mL/mg)	Ekstraksiyon Sıcaklığı (°C)	Ekstraksiyon Süresi (dk)
1	0.006	55	60
2	0.01	55	60
3	0.006	95	60
4	0.01	95	60
5	0.006	75	30
6	0.01	75	30
7	0.006	75	90
8	0.01	75	90
9	0.008	55	30
10	0.008	95	30
11	0.008	55	90
12	0.008	95	90
13	0.008	75	60
14	0.008	75	60
15	0.008	75	60
16	0.008	75	60
17	0.008	75	60

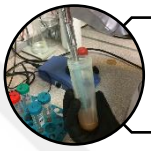


1 g kuru maya tartılmıştır.



Tartılan maya hücrelerine 2 M NaOH çözeltisinden 0.006, 0.008 veya 0.01 v/w oranlarında eklenerek falkon tüplerinde süspansiyon oluşturulmuştur.

Önceden 55°C, 75°C veya 95°C'ye ısıtılmış ultrasonik su banyosunda 15 dk sonikasyonla birlikte 30 dk, 60 dk veya 90 dk falkon tüpleri bekletilmiştir.



1.Mikroskopta hücre duvarının incelenmesi için rastgele seçilen bir falkondan yaklaşık 1 mL örnek alınmıştır.

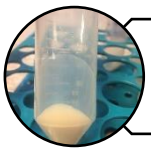
5860 rpm, 4°C ve 15 dk santrifüjleme - saf suyla yıkama - 5860 rpm, 4°C ve 5 dk santrifüjleme işlemleri yapılmıştır.

Çökelek kısımlarına 0.008 v/w oranında % 3'lük asetik asit eklenmiştir. 85°C sıcaklıktaki ultrasonik su banyosunda bekletilmiştir.

5860 rpm, 4°C ve 15 dk santrifüjleme - saf suyla yıkama - 5860 rpm, 4°C ve 5 dk santrifüjleme işlemleri yapılmıştır.

Falkon tüplerindeki her bir çökelek mutlak etanolle yıkanmıştır.

5860 rpm, 4°C ve 15 dk koşullarında santrifüjleme yapılmıştır.



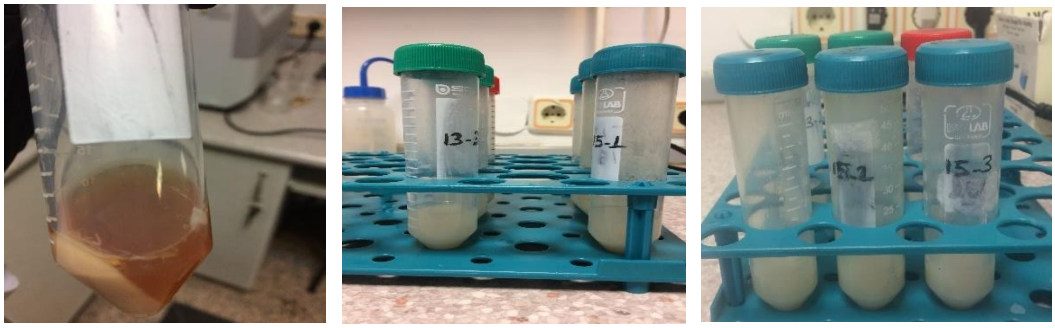
Yaş beta glukan elde edilmiştir.

Şekil 4.1 Ultrasonik destekli alkali – asidik ekstraksiyon yönteminin basamakları

Yaş beta glukanlar elde edildikten sonra etüvde kurutulmuştur. Kurutulan beta glukanlar havanda öğütülerek beta glukanların parçacık boyutu küçültülmüştür. Hücre duvarlarının parçalanma durumunu incelemek için binoküler mikroskop kullanılmıştır ve hücre duvarlarının fotoğrafları çekilmiştir. Beta glukan saflıklarını belirlemek için antron – sülfürik asit analizi ve beta glukanların karakterizasyonunu belirlemek için FTIR analizi yapılmıştır.

4.2.3 Ultrasonik destekli alkali-asidik ekstraksiyonu yöntemi için elde edilen optimum koşulların denenmesi

Ultrasonik destekli alkali-asidik ekstraksiyonu yönteminin Box – Behnken istatistiksel deneysel tasarımı kullanılarak bulunan optimum değerlerle üç tekrarlı deney yapılmıştır. Şekil 4.1'de verilen deney basamakları alkali ekstraksiyon kısmında optimum bulunan 0.007 v/w, 95°C ve 30 dk değerleri için tekrar yapılmıştır. Elde edilen beta glukanın miktarı analizlere yetebilmesi için 60 g maya ekstraksiyon için kullanılmıştır. Bu deneyde hücre duvarının parçalanma durumuna mikroskopta bakılmamıştır. Protein analizi yapılabilmesi için alkali ve etanol kısımlarından sonra süpernatant kısmından örnekler alınmıştır. Ekstraksiyon yönteminde uygulanan alkali, asidik ve etanol işleminden sonraki örneklerin görüntüsü şekil 4.2'de verilmiştir.



(a) (b) (c)

Şekil 4.2 Ekstraksiyon yöntemindeki alkali (a), asidik (b) ve etanol (c) muamelesi sonrası örnekler

Alkali muameleden sonra süpernatantın daha koyu renkli ve daha yoğun bir sıvı olduğu görülmektedir. Bu durumda, safsızlıkların en çok giderildiği kısım bu aşama olduğu tahmin edilebilmektedir.

Beta glukanlar etüvde kurutulduktan sonra Ankara Üniversitesi YEBİM'de (Yer Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi) Retsch markalı tungten karbitten yapılmış bilyalarla 600 rpm hızında 30 sn öğütülerek beta glukanların parçacık boyutu küçültülmüştür. Beta glukan saflıklarını belirlemek için antron – sülfürik asit analizi ve enzimatik beta glukan analizi, beta glukanların karakterizasyonunu belirlemek için FTIR analizi ve ekstraksiyon yapılırken alkali ve etanol kısımlarından sonra süpernatant kısmından alınan örneklerdeki protein giderim miktarını belirlemek için Bradford analizi yapılmıştır.

4.3 Otoliz Ultrasonik Destekli Asidik Ekstraksiyonu

4.3.1 Otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyonunda kullanılan tampon çözeltisini belirleme

Otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyonu, alkali çözücü kullanılmadığı için çevreye zarar vermeyen ve kolay bir ekstraksiyon yöntemidir. Literatürde bu ekstraksiyon yöntemine benzer uygulamalar mevcuttur (Nauremon vd. 2013, Bzducha – Wrobel vd. 2014, Takalloo vd. 2020). Bu yöntemin ilk basamağı otolizdir ve otolizde tampon çözeltisi önemlidir. Bu kapsamda farklı katkı maddeleri sodyum fosfat tamponuna katılarak beta glukan verimi ve saflığı üzerine etkisine bakılmıştır.

Tartılan mayalar, sodyum fosfat tamponuna, sodyum klorür içeren sodyum fosfat tamponuna (TN) ve EDTA içeren sodyum fosfat tamponuna (TE) eklenip 55°C, 120 rpm ve 24 st koşullarında inkübatörde otoliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Otoliz işleminden sonra ultrasonik su banyosunda hücreyi parçalayan enzimlerin inaktive olması için 85°C sıcaklıkta ve 15 dk boyunca bekletilirken sonikasyon işlemi de yapılmıştır. Santrifüjleme ve saf suyla yıkama yapılmıştır. % 3'lük asetik asitle ve

etanolle muamele edilmiş ve etüvde kurutulmuştur. Ekstraksiyon yönteminin detaylı bilgisi şekil 4.3'te verilmiştir. Kuruyan beta glukanlar havanda öğütülerek beta glukanların parçacık boyutu küçültülmüştür. Beta glukanın saflıklarını belirlemek için antron – sülfürik asit analizi ve beta glukanların karakterizasyonunu belirlemek için FTIR analizi yapılmıştır.

4.3.2 Otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu

Literatürde yapılan çalışmalar incelenerek mayalardan beta glukan eldesinde kullanılan ekstraksiyon yöntemlerinden biri olan otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyonun tampon/katı oranının ve tampon süresinin tam faktöriyel istatistiksel deney tasarımı kullanılarak optimizasyonu yapılmıştır. İki seviyeli, iki faktörlü, iki yanıtlı ve üç tekrarlı deney tasarım matrisi oluşturularak deney sayısı ve her bir deneyin hangi koşullarda yapılacağı belirlenmiştir. Oluşturulan tasarım matriksi çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyonun koşullarının optimizasyonu için oluşturulan tam faktöriyel deney tasarım matrisi

Deney No	Tampon/Katı Oranı (mL/mg)	Tampon Süresi (st)
1	0.01	24
2	0.01	48
3	0.1	24
4	0.1	24
5	0.1	48
6	0.1	48
7	0.055	36
8	0.01	24
9	0.01	24
10	0.055	36
11	0.01	48
12	0.055	36
13	0.1	48
14	0.01	48
15	0.1	24

% 3 g/mL oranında sodyum klorür içeren sodyum fosfat tamponun pH değeri 5,4 olarak ayarlanmıştır. 0.01 ve 0.1 v/w oranında mayaya eklenmiştir.

➢Erlenlerdeki süspansiyonlar inkübatörde 24, 36 ve 48 st boyunca 55°C sıcaklık ve 200 rpm karıştırma hızında otoliz gerçekleştirilmiştir.

➢Otoliz işlemini gerçekleştiren enzimlerin aktifliklerini durdurmak için 85°C sıcaklıktaki su banyosunda 15 dk bekletilmiştir. Bu işlem gerçekleşirken eş anlı 15 dk boyunca ultrasonik su banyosunda sonikasyonda yapılmıştır.

5860 rpm, 4°C ve 15 dk santrifüjleme - saf suyla yıkama - 5860 rpm, 4°C ve 5 dk santrifüjleme işlemleri yapılmıştır.

Çökeleklere 0.008 v/w oranında %3'lük asetik asit eklenmiştir. 85°C sıcaklıktaki su banyosunda 1 st bekletilmiştir.

5860 rpm, 4°C ve 15 dk santrifüjleme - saf suyla yıkama - 5860 rpm, 4°C ve 5 dk santrifüjleme işlemleri yapılmıştır.

Çökeleklere 0.008 v/w oranında mutlak etanol eklenip çökelekler yıkanmıştır.

Süspansiyonlar 5860 rpm hızında, 4°C sıcaklıkta ve 15 dk santrifüjlenmiştir.

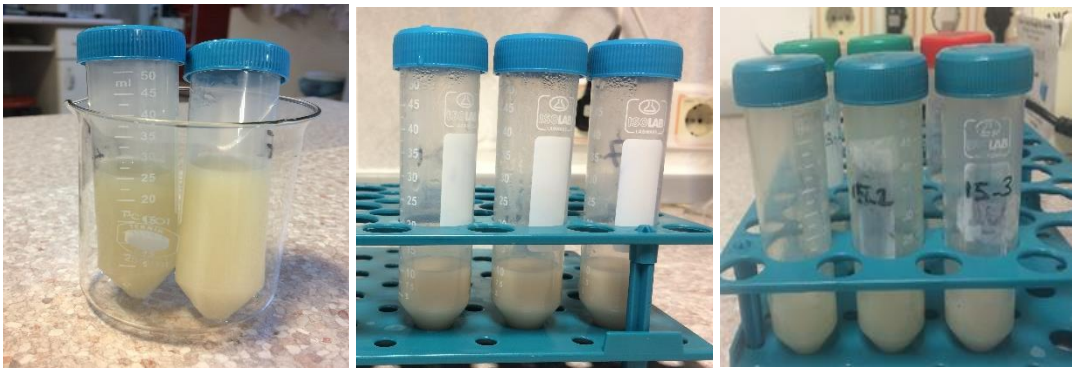
Yaş beta glukan elde edilmiştir.

Şekil 4.3 Otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyon yönteminin basamakları

Yaş beta glukanlar elde edildikten sonra etüvde kurutulmuştur. Kurutulan beta glukanlar havanda öğütülerek beta glukanların parçacık boyutu küçültülmüştür. Beta glukan saflıklarını belirlemek için antron – sülfürik asit analizi ve beta glukanların karakterizasyonunu belirlemek için FTIR analizi yapılmıştır.

4.3.3 Otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyonu yöntemi için elde edilen optimum koşulların denenmesi

Otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyonu yönteminin iki seviyeli tam faktöriyel istatistiksel deney tasarımı kullanılarak bulunan optimum değerlerle üç tekrarlı deney yapılmıştır. Şekil 4.3'te verilen deney basamakları otoliz kısmında optimum bulunan 0.01 v/w ve 48 st değerleri için tekrar yapılmıştır. Elde edilen beta glukanın miktarı analizlere yetebilmesi için 60 g maya ekstraksiyon için kullanılmıştır. Bu deneyde hücre duvarının parçalanma durumuna mikroskopta bakılmamıştır. Protein analizi yapılması için otoliz ve etanol kısımlarından sonra süpernatant kısmından örnekler alınmıştır. Ekstraksiyon yönteminde uygulanan otoliz, asidik ve etanol işleminden sonraki örneklerin görüntüsü şekil 4.4'te verilmiştir.



(a) (b) (c)

Şekil 4.4 Ekstraksiyon yöntemindeki otoliz (a), asidik (b) ve etanol (c) muamelesi sonrası
örnekler

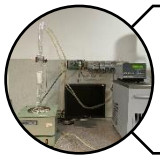
Beta glukanlar etüvde kurutulduktan sonra Ankara Üniversitesi YEBİM'de (Yer Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi) Retsch markalı tungten karbitten yapılmış

bilyalarla 600 rpm hızında 30 sn öğütülerek beta glukanların parçacık boyutu küçültülmüştür. Beta glukan saflıklarını belirlemek için antron – sülfürik asit analizi ve enzimatik beta glukan analizi, beta glukanların karakterizasyonunu belirlemek için FTIR analizi ve ekstraksiyon yapılırken alkali ve etanol kısımlarından sonra süpernatant kısmından alınan örneklerdeki protein giderim miktarını belirlemek için Bradford analizi yapılmıştır.

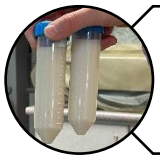
4.4 Soxhlet Ekstraksiyonu

Ucuz ve kolay uygulanmasının yanı sıra ekstrakte edilecek katının sürekli taze çözücüyle muamele edilmesinden dolayı üçüncü ekstraksiyon yöntemi olarak seçilmiştir. Bu yöntemin tahıllardan beta glukan ekstraksiyonu uygulaması olmasına rağmen mayadan ekstraksiyonu uygulaması bulunmamaktadır. Bu yönden maya ekstraksiyonunda literatürdeki ilk Soxhlet ekstraksiyonu uygulaması olacaktır. Ekstraksiyon yöntemlerini karşılaştırmak ve çözücünün etkisini ortadan kaldırmak için her iki ekstraksiyon yönteminde de 2 M sodyum hidroksit çözeltisi kullanılmıştır. Literatürdeki çalışmaların çoğunda farklı malzemeler için farklı çözücüler, farklı ekstraksiyon süreleri dolayısıyla farklı çevrim sayıları ve çözücü/katı oranları denenmiştir (De Castro vd. 2010, Marconi vd. 2014, Gründemann vd. 2015, Alzorqi vd. 2017, Rashid vd. 2019, Taofiq vd. 2019, Sun vd. 2020). Bu durumda, ekstraksiyon süresinin yani çevrim sayısının ve çözücü/katı oranının önemli olduğunu göstermektedir. Elimizdeki malzemenin biyolojik materyal olması, kullandığımız çözücünün kuvvetli bazik olması ve karşılaştırdığımız diğer ekstraksiyonda kullanılan zamandan çok farklı bir zaman seçmemek için ektsraksiyon süresi 3 st ve 6 st olarak denenmesine karar verilmiştir. Kullandığımız Soxhlet kartuşu 100 mL hacimde olduğundan en az 250 mL çözücü kullanmamız gerektiği için çözücü/katı oranı 0.025 v/w kullanılarak deney yapılmıştır. Bilyalı değirmende öğütülecek miktarda beta glukan üretmek için her bir deney seti dört tekrarlı yapılmıştır.

Tartılan 10 g maya ekstraktör kartuşuna koyulmuştur.



1.2 M NaOH çözeltisinden, 0.025 v/w oranında balona koyulmuştur. Sodyum hidroksit çözeltisinin kaynama noktasında (110°C) ekstraksiyon soxhlet cihazında sırasıyla 3 st ve 6 st ekstraksiyon yapılmıştır.

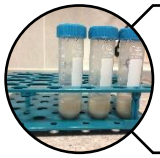


Ekstraksiyon kartuşundan alınan süspansiyon falkon tüpleri paylaştırılmıştır.

5860 rpm , 4°C ve 15 dk santrifüjleme - saf suyla yıkama - 5860 rpm, 4°C ve 5 dk santrifüjleme işlemleri yapılmıştır.

Çökeleklere 0.008 v/w oranında %3'lük asetik asit eklenmiştir. 85°C sıcaklıktaki su banyosunda 1 st bekletilmiştir.

5860 rpm , 4°C ve 15 dk santrifüjleme - saf suyla yıkama - 5860 rpm, 4°C ve 5 dk santrifüjleme işlemleri yapılmıştır.



Çökeleklere 0.008 v/w oranında mutlak etanol eklenmiştir ve vortekslenmiştir.

Süspansiyonlar 5860 rpm , 4°C ve 15 dk koşullarında santrifüjleme yapılmıştır.

Yaş beta glukan elde edilmiştir.

Şekil 4.5 Soxhlet ekstraksiyon yönteminin basamakları

Şekil 4.6 Beta glukan üretiminde kullanılan Soxhlet ekstraksiyonun deney sistemi

Beta glukanlar etüvde kurutulduktan sonra Ankara Üniversitesi YEBİM'de Retsch markalı tungten karbitten yapılmış bilyalarla 600 rpm hızında 30 sn öğütülerek beta glukanların parçacık boyutu küçültülmüştür. Beta glukan saflıklarını belirlemek için antron – sülfürik asit analizi ve enzimatik beta glukan analizi, beta glukanların karakterizasyonunu belirlemek için FTIR analizi ve ekstraksiyon yapılırken Soxhlet ekstraksiyonunda kullanılan çözücüden ve etanolle yıkama aşamasından sonraki santrifüjlenen örneğin süpernatant kısmından alınan örneklerdeki protein giderim miktarını belirlemek için Bradford analizi yapılmıştır.

4.5 Analizler

4.5.1 Antron – sülfürik asit yöntemi ile beta glukan analizi

Antron – sülfürik asit analiz yöntemi, glikoz derişimini ölçen türbidimetrik bir yöntemdir. Kolay ve hızlı bir yöntem olduğu için toplam karbonhidrat tayini yöntemlerinde çokça kullanılmaktadır. Antron ve sülfürik asit ile oluşturulan antron reaktif çözeltisi glikoz ile tepkimeye girerek sarı – yeşil arası bir renk vermektedir.

Glikozun derişimi arttıkça yeşil renk daha da belirgin olmaktadır. Bu yöntemle beta glukan analiz edilebilmesi için öncelikle beta glukanın glikoz yapıtaşlarına parçalanması gerekmektedir. Bu yöntemin basamakları şekil 4.7'de verilmiştir. Örneklerin analizi yapılmadan önce kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Şekil 4.8' de oluşturulan kalibrasyon grafiği verilmiştir.

12.5 mg beta glukan 2 M 100 mL NaOH çözeltisine eklenip 18 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Beta glukan glikoz yapıtaşlarına ayrılmıştır.

↓

18 saat sonunda çözelti manyetik karıştırıcıdan alınıp 5 kat suyla seyreltilmiştir.

↓

Test tüpüne 0.5 mL seyreltilmiş örnekten, 0.5 mL 4 M NaOH çözeltisinden ve 5 mL antron reaktifinden eklenmiştir.

↓

Yaklaşık 100°C sıcaklıktaki su banyosunda 10 dk örnekler bekletilmiştir.

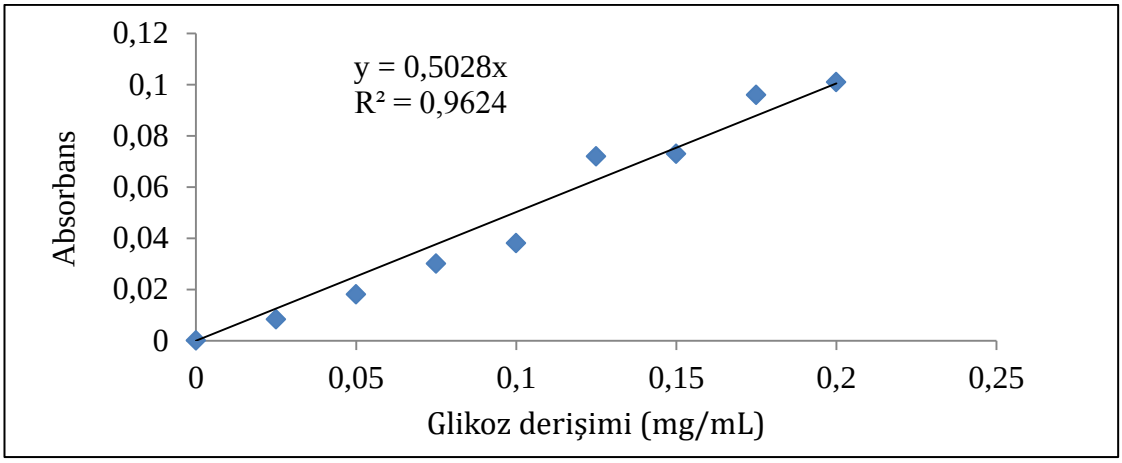
↓

Su banyosundan alınan örnekler buzlu su banyosunda soğutulmuştur.

↓

Örnekler soğur soğumaz 630 nm dalgaboyunda UV spektrofotometresinde absorbans değerleri ölçülmüştür.

Şekil 4.7 Antron – sülfürik asit yöntemi ile beta glukan analizinin aşamaları



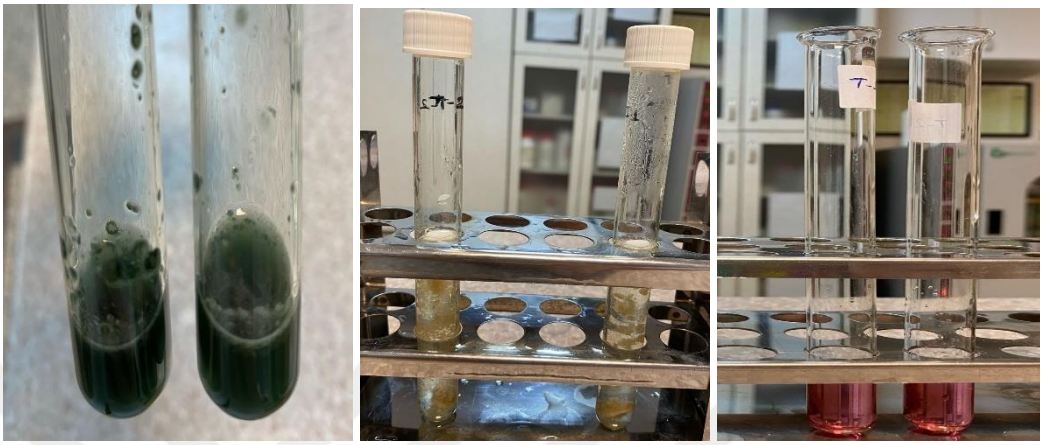
Şekil 4.8 Antron – sülfürik asit yönteminde oluşturulan kalibrasyon grafiği

4.5.2 Enzimatik analiz yöntemi ile beta glukan analizi

Beta glukan saflığını bulmak için literatürde en çok kullanılan analiz yöntemi enzimatik analiz yöntemidir. Bu yöntemin temeli de antron – sülfürik asit analiz yöntemi gibi glikoz derişimini ölçmeye dayanmaktadır. Ancak, yöntemde glukanı parçalayan enzimle beta glukan örneği glikoz yapıtaşına ayrıldığı için beta glukan saflığının bulunmasında daha güvenilir bir yöntemdir. Bu yöntem iki aşamadan oluşmaktadır.

a) **Toplam glukan ölçümü:** Yaklaşık 90 mg beta glukan örneği ve 2 mL sülfürik asit (H_2SO_4) deney tüpüne eklenip 2 st buz banyosunda bekletilmiştir. 2 st sonra deney tüpüne sırasıyla 4 ve 6 mL saf su eklenmiştir. Deney tüpleri yaklaşık 100°C sıcaklıktaki su banyosuna koyulduktan sonra tüplerin kapakları kapatılıp 2 st bekletilmiştir. Deney tüpleri su banyosundan alınıp oda sıcaklığına gelene kadar soğutulmuştur (şekil 4.9). Oda sıcaklığına gelen tüplerin kapağı açılmıştır. Tüp 100 mL hacimli balon jojeye aktarılmış ve ardından balon jojeye çözeltinin üzerine 8 M NaOH çözeltisinden 6 mL eklenmiştir. Balon joje toplam hacim 100 mL olacak şekilde pH değeri 4.5 olan sodyum asetat tamponuyla tamamlanmıştır ve iyice çalkalanmıştır. Ependorf tüplere örnek alınıp 5 dk mikrofüj cihazında 13000 rpm ve 5 dk koşullarında santrifüjlenmiştir. Test tüpüne süpernatant kısmından 0.1 mL ve exo-1,3-β-glukanaz + β-glukosidaz enzim karışımından 0.1 mL eklenmiştir. Tüp 40°C sıcaklıkta 1 st bekletilmiştir.

Tüplere 3 mL GOPOD reaktifinden eklenmiştir. Tüp 40°C sıcaklıkta 20 dk bekletilmiştir. 510 nm dalga boyunda UV spektrofotometresinde çözeltinin absorbansı ölçülmüştür.



(a) (b) (c)

Şekil 4.9 Buz banyosunda bekletme (a), sıcak su banyosunda bekletme (b), GOPOD reaktifi eklenip bekletme (c) işleminden sonra örnekler

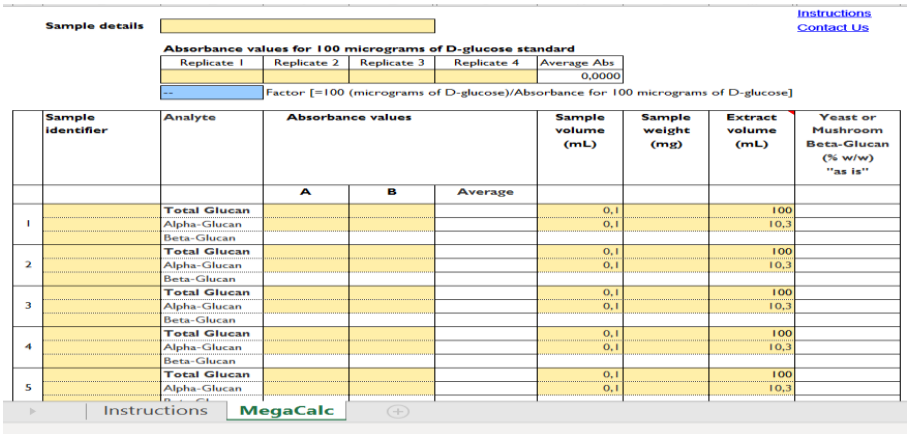
b) **Alfa glukanın ölçümü:** Yaklaşık 100 mg beta glukan örneği ve 1.7 M NaOH çözeltisinden 2 mL deney tüpüne eklenmiştir ve buz banyosunda manyetik karıştırıcıda 20 dk karıştırılmıştır. Tüpe pH değeri 3.8 olan sodyum asetat tamponundan 8 mL eklenip amiloglikosidaz + invertaz enzim karışımından 0.2 mL eklenmiştir. Su banyosunda 40°C sıcaklıkta 30 dk bekletilmiştir. Beta glukan örneğinde % 10'dan daha az alfa glukan varsa; 30 dk sonra tüp su banyosundan alınıp tüpteki çözeltiden 2 mL alınmıştır. 13000 rpm hızında 5 dk mikrofüjde santrifüjlenmiştir. Test tüpüne süpernatanttan 0.1 mL ve 0.1 mL pH değeri 4.5 olan sodyum asetat tamponundan ve 3 mL GOPOD reaktifinden eklenmiştir. Tüp 40°C sıcaklıkta 20 dk bekletilmiştir. 510 nm dalga boyunda UV spektrofotometresinde çözeltinin absorbansı ölçülmüştür. Beta glukan örneğinde % 10'dan daha fazla alfa glukan varsa; tüpteki çözelti 100 mL hacimli balon jojeye aktarılmıştır. Saf suyla balon jojenin hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır. İyice çalkalandıktan sonra ependorfa çözelti koyulup 13000 rpm hızında 10 dk mikrofüjde santrifüjlenmiştir. Test tüpüne süpernatanttan 0.1 mL ve 0.1 mL pH

değeri 4.5 olan sodyum asetat tamponundan ve 3 mL GOPOD reaktifinden eklenmiştir. Tüp 40°C sıcaklıkta 20 dk bekletilmiştir (şekil 4.11). 510 nm dalga boyunda UV spektrofotometresinde çözeltinin absorbansı ölçülmüştür.

Hem toplam glukanın hem de alfa glukanın absorbansı, tartılan örnek miktarları gibi bilgiler Megazyme firmasının sitesindeki excel dosyasındaki programa girildiğinde beta glukan saflığı yüzde olarak hesaplatılmıştır. Dosyanın görüntüsü şekil 4.11'de verilmiştir.

(a) (b)

Şekil 4.10 Alfa glukan ölçümünde enzim ekleme (a), GOPOD reaktifi eklenip bekletme işleminden (b) sonra örnekler



Sample details

Instructions
Contact Us

Absorbance values for 100 micrograms of D-glucose standard

Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Replicate 4	Average Abs
				0,0000

-- Factor [=100 (micrograms of D-glucose)/Absorbance for 100 micrograms of D-glucose]

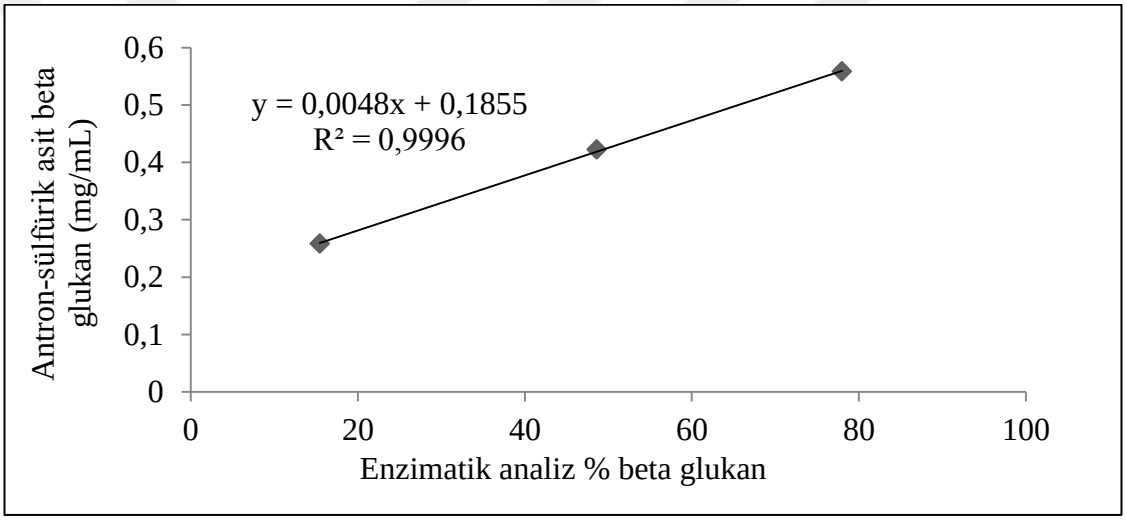
	Sample identifier	Analyte	Absorbance values			Sample volume (mL)	Sample weight (mg)	Extract volume (mL)	Yeast or Mushroom Beta-Glucan (% w/w) "as is"
			A	B	Average				
1		Total Glucan				0,1		100	
		Alpha-Glucan				0,1		10,3	
		Beta-Glucan							
2		Total Glucan				0,1		100	
		Alpha-Glucan				0,1		10,3	
		Beta-Glucan							
3		Total Glucan				0,1		100	
		Alpha-Glucan				0,1		10,3	
		Beta-Glucan							
4		Total Glucan				0,1		100	
		Alpha-Glucan				0,1		10,3	
		Beta-Glucan							
5		Total Glucan				0,1		100	
		Alpha-Glucan				0,1		10,3	

Instructions MegaCalc

Şekil 4.11 Beta glukan saflığını hesaplayan program (https://www.megazyme.com/beta-glucan-assay-kit-yeast-mushroom 2021)

4.5.3 Antron – sülfürik asit analiz ile enzimatik analiz yönteminin karşılaştırılması

Antron – sülfürik asit analizi ve enzimatik analiz beta glukan saflığını belirlerken kullanılan analiz yöntemleridir. Antron – sülfürik asit analiz yöntemi daha hızlı ve kolay uygulanırken enzimatik analiz daha doğru ve kesin sonuçlar vermektedir. Hem daha hızlı hem daha kesin sonuç veren yöntem için bu iki analiz arasında kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur. Bu grafik sayesinde antron – sülfürik asit yöntemi ile bulunan beta glukan saflığının enzimatik karşılığı hesaplanabilmektedir. Grafik şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.12 İki farklı analiz yöntemi arasındaki kalibrayon grafiği

4.5.4 Bradford analiz yöntemi

Çözeltideki protein derişiminin belirlendiği analiz hassas, ucuz, hızlı ölçülen ve doğruluğu yüksek olmalıdır. Protein analizinde kullanılan yöntemlerden biri de Bradford analizidir. Bradford analizi, Bradford reaktifi proteinle kompleks oluşturup renk vermektedir. Bu kompleksin UV spektrofotometrede absorbansı ölçülüp örnek çözeltideki protein derişiminin bulunmasını sağlamaktadır. Bradford reaktifi ise commassie brilliant blue boyasının asidik çözeltisidir. Bradford analiz yöntemi, tek reaktifli olması, reaksiyon hızlılığı, yüksek protein – boya kompleks kararlılığı ve yüksek tekrarlanabilir olması avantajlarıdır (Becker vd. 1996).

Mayanın hücre duvarından ekstraksiyon ile proteinler giderilmektedir. Bu proteinler süpernatantta bulunmaktadır ve buradaki proteinlerin derişimi belirlenmiştir. Çünkü giderilen protein derişimi ne kadar yüksekse saflığında o kadar yüksek olması beklenmektedir. Yöntemin basamakları şekil 4.13'teki gibidir.

Örnek çözeltilerden 1 mL alınıp mikrofüjde santrifüjlenmiştir.

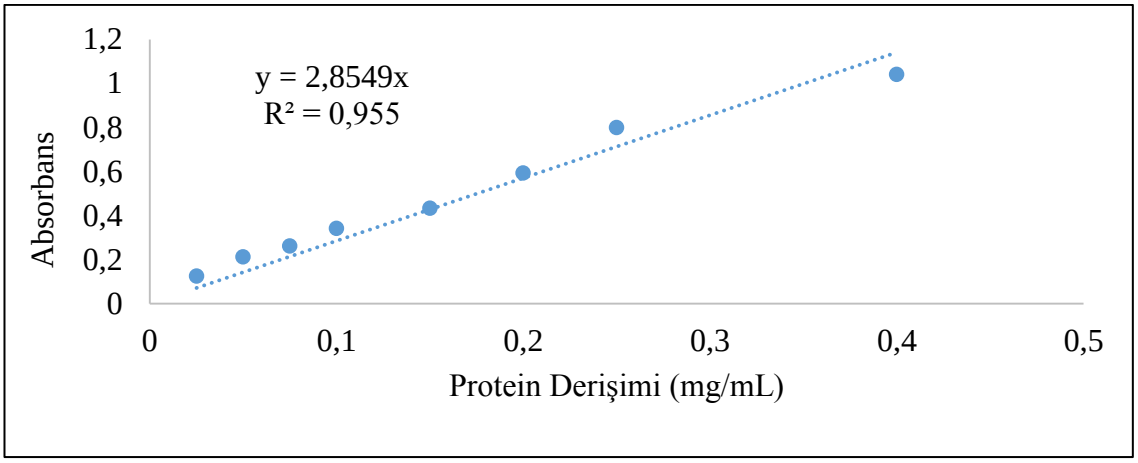
Örneğin süpernatant kısmından 20 µL alınıp test tüpüne koyulmuştur.

Ekstraksiyonda hangi çözücü kullanıldıysa o çözücüden 100 µL ve di sudan 80 µL test tüpe eklenmiştir.

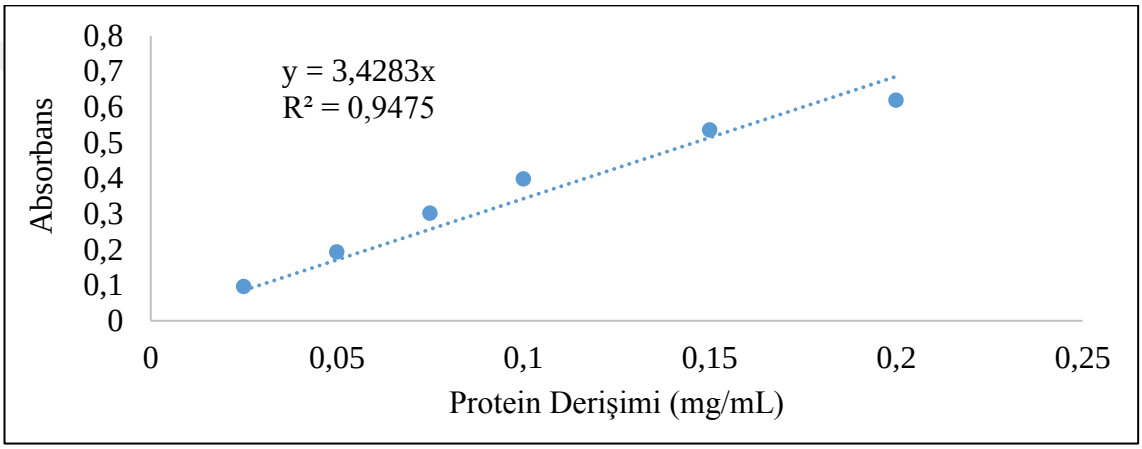
2 mL test tüpe Bradford reaktifi eklenip 5 dk beklendikten sonra 595 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede absorbans ölçülmüştür.

Şekil 4.13 Bradford analiz yönteminin basamakları

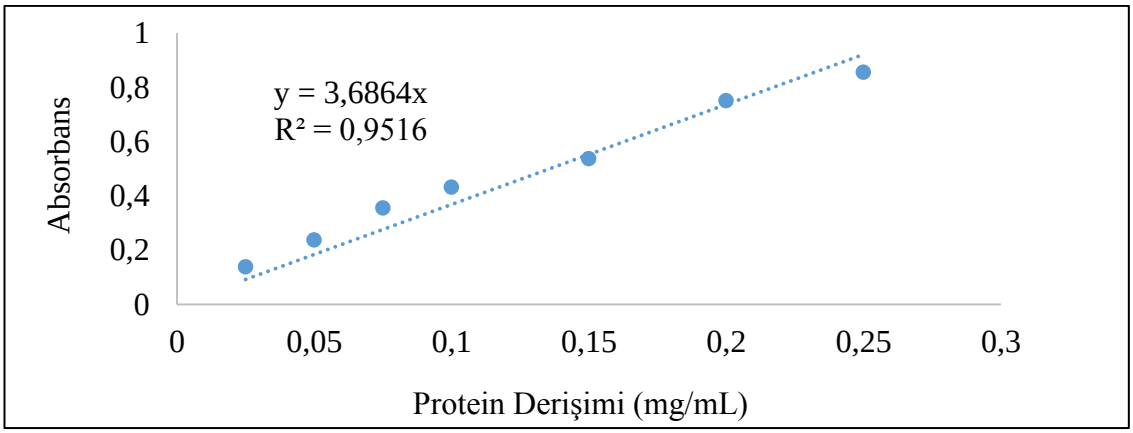
Örneklerin protein analizleri yapılmadan ekstraksiyonda kullanılan farklı her bir çözücü için kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Grafikler şekil 4.14'te gösterilmiştir.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.14 Alkali (a), etanol (b), tampon (c) çözücüleri için oluşturulan kalibrasyon grafikleri

Şekil 4.15'in a kısmındaki fotoğrafın sağ tarafındaki mavi örnekler ultrasonik destekli alkali – asidik ekstraksiyon yöntemindeki alkali aşamasından sonra alınan süpenatant örneğidir.

(a) (b)

Şekil 4.15 Ekstraksiyon yöntemlerinin alkali (a) ve etanol (b) aşamasından sonra alınan örnekler

Her iki fotoğrafın en solundaki iki tüp kör çözeltileridir. Şekil 4.15'in b kısmındaki fotoğraftaki örnekler otoliz ultrasonik destekli asidik ve ultrasonik destekli alkali – asidik ekstraksiyon yöntemlerinin son aşaması olan mutlak etanolle yıkama sonrası alınan süpernatant örnekleridir. Fotoğraflarda da görüldüğü üzere ilk aşamadan sonra protein giderimi daha fazladır. Bradford reaktifi ne kadar yüksek derişimli proteinle kompleks oluştururs o kadar daha mavi renk olmaktadır.

4.5.5 FTIR

Beta glukanlar, glikozların beta glikozidik bağlarla birbirine bağlanmasıyla oluşmaktadır.

FTIR analizlerinde beta glukanın yapısı karakterize edilmektedir. En önemli bakılacak bağ beta glikozidik bağın yapısı olan C – O – C bağıdır. Bu bağın pik verdiği dalga sayısı önemlidir. Bu bağ 1050 – 1300 cm^{-1} aralığında pik vermektedir (Sabuncu vd. 2016). FTIR analizlerinde Sigma markalı referans beta glukan ile örneklerin pikleri karşılaştırılmıştır.

4.5.6 Statik ışık saçılımı (SLS)

Statik ışık saçılımı polimerlerin molekül kütlelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemdir. 30 – 150° açılar arasında çoklu ölçüm yapabilen SLS yönteminin temeli optik heterojenitedir. Lazer kaynağı mevcuttur. SLS yönteminde polimerin seyreltik çözeltisinden geçen ışık saçılıma uğramaktadır. Bu yöntemde örneğin farklı derişimlerinde çözeltileri hazırlanmaktadır. Hazırlanacak çözeltilerin derişimi örnek derişimini ölçebilecek değerlerde olmalıdır. Çözeltilerin kırılma indisleri belirlenmektedir (Tansık 2019).

Bu tez kapsamında üretilen beta glukan örneklerinin molekül kütlesi analizi ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC) ile yaptırılmıştır. Ancak cihazda sadece THF çözücüsüyle hazırlanan örnekler analiz edilebildiğinden ve analiz yapılabilecek derişimde beta glukan örneğinin THF çözücüsünde çözünememesi nedeniyle beta glukan örneklerinin molekül kütlesinin belirlenmesi amacıyla yöntemde değişiklik yapılmıştır. Farklı ektraksiyon yöntemleriyle elde edilen beta glukanların molekül kütlesi analizi ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda Statik Işık Saçılımı (SLS)) ile yaptırılmıştır Beta glukan örnekleri 40, 30, 20 ve 10 mg/mL derişimlerinde DMSO çözücüsü kullanılarak hazırlanmıştır.

5. BULGULAR VE TARTIŞMA

5.1 Ön Çalışmalar

5.1.1 Farklı ekstraksiyon yöntemlerinin beta glukanın verimine ve molekül kütlesine etkisinin incelenmesi

Otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyonundan elde edilen beta glukan verimleri ultrasonik destekli alkali-asidik ekstraksiyondan elde edilen beta glukan verimlerinden daha yüksek bulunmuştur (çizelge 5.1).

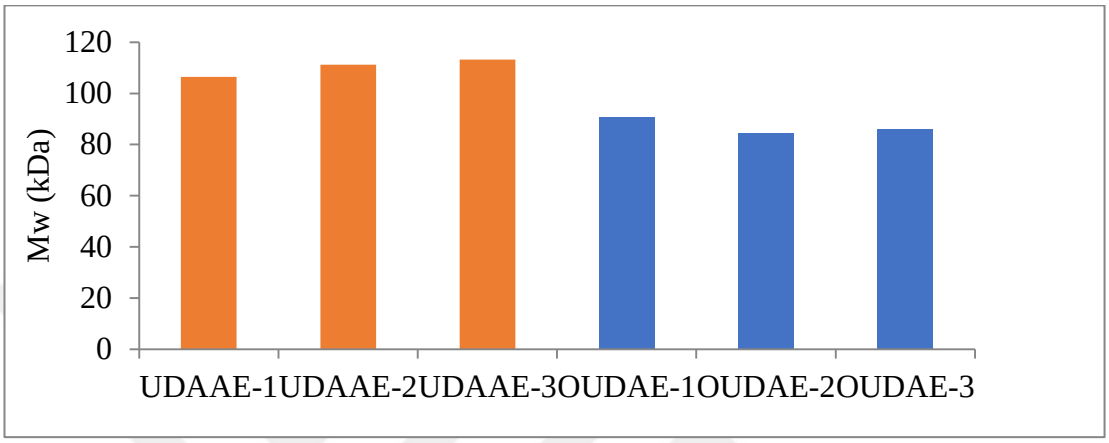
Çizelge 5.1 Farklı ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen beta glukan verimlerinin karşılaştırılması

Ekstraksiyon Yöntemi	Beta Glukan Verimi (%)
UDAAE-1	15.00
UDAAE-2	6.10
UDAAE-3	4.86
OUDAE-1	17.08
OUDAE-2	7.74
OUDAE-3	12.78

(UDAAE: Ultrasonik destekli alkali-asidik ekstraksiyonu, OUDAE: Otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyonu)

Bu sonucun ultrasonik alkali-asidik ekstraksiyonunda bir tane hücre duvarı parçalama yöntemi kullanılırken otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyonunda iki tane hücre duvarı parçalama yöntemi kullanılmasından dolayı olduğu tahmin edilmektedir. Ancak, beta glukan saflıkları incelenemediği için otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyon daha iyi bir yöntem denememektedir. Çünkü safsızlığı yüksek olduğu için de verim daha yüksek bulunmuş olabilmektedir. Ayrıca, ilk deneylerde elde edilen beta glukan verimleri diğer deneylerdeki elde edilen beta glukan verimlerinden fazla çıkmasının sebebi, ilk deneyde mayaların çoğalma aşamasındaki üstel evrenin süresi (10 saat) diğer deneylerdeki mayaların çoğalma aşamasındaki üstel evrenin süresinden (8 saat) daha

fazla olmasıdır. Üstel evrenin süresi uzadıkça da hücre yaşlanmakta ve hücre duvarı kalınlaşmaktadır. Bu sayede, hücre duvarındaki beta glukan miktarı da artmaktadır. Farklı ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen beta glukanların molekül kütleleri şekil 5.1'de verilmiştir.

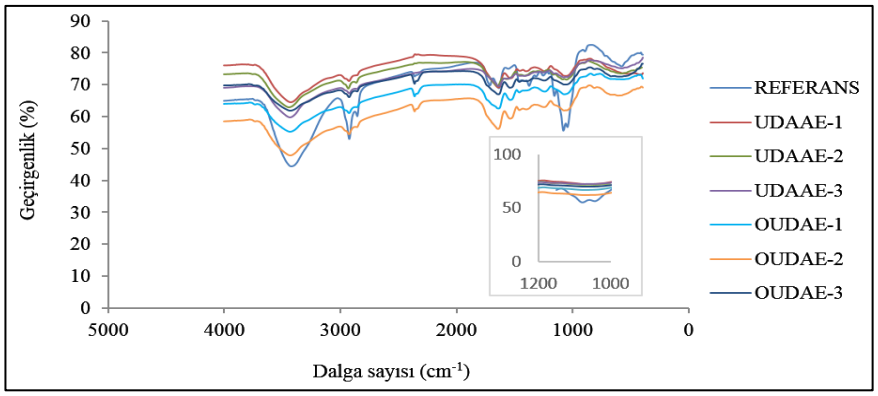


(UDAAE: Ultrasonik destekli alkali-asidik ekstraksiyonu, OUDAE: otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyonu)

Şekil 5.1 Farklı ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen beta glukanların molekül kütleleri

Otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyonun molekül kütlesi değerleri diğer yönteme göre daha düşük bulunmuştur. Bunun sebebi, otoliz aşamasında beta glukanı parçalayan enzimlerin de aktifleşmesi ve beta glukanı parçalamasıdır.

Referans beta glukan ile farklı ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen beta glukanların FTIR analizleri yapılmıştır ve şekil 5.2'de gösterilen spektrumlarının benzer olduğu görülmüştür.



Şekil 5.2 Farklı ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen beta glukanların FTIR spektrumları

Hem referans hem de elde edilen beta glukan örnekleri; protein bölgesinde yaklaşık 1635 cm^{-1} dalga sayısında, C-O bağını içeren polisakkarit bölgesinde 1000 –1200 cm^{-1} dalga sayısı arasında, C-H bağının olduğu bölgede yaklaşık 2900 cm^{-1} dalga sayısında ve OH bağının olduğu bölgede yaklaşık 3400 – 3450 cm^{-1} dalga sayısı arasında pik vermiştir. Ayrıca, yaklaşık 2400 cm^{-1} dalga sayısında da ortamın neminden dolayı oluşan karbondioksit pik vermiştir. Şekil 5.2'nin içindeki küçük grafik referansın ve örneklerin sadece beta glikozidik bağını oluşturan C-O bağının pikleri gösterilmiştir.

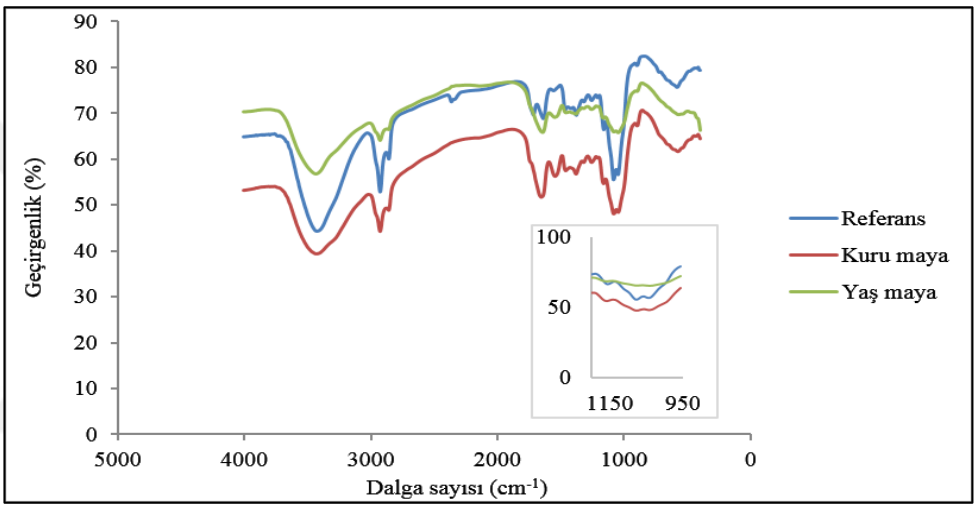
5.1.2 Kuru ve yaş mayanın beta glukan ektstraksiyonuna etkisinin incelenmesi

Elde edilen beta glukanlarla çoğaltılan mayalarla ilgili verim ve miktar bilgileri çizelge 5.2'de verilmiştir.

Çizelge 5.2 Beta glukan ve maya verimi ve miktarı

Örnekler	Mayanın yaş kütlesi (g)	Mayanın kuru kütlesi (g)	Yaş beta glukan (g)	Kuru beta glukan (g)	Beta glukan verimi (g b.g. /g maya)
Yaş maya	1.67	-	0.4406	0.0543	0.26
Yaş maya	1.65	-	0.5308	0.0487	0.32
Kuru maya	1.67	0.279	0.3996	0.0326	0.12
Kuru maya	1.66	0.295	0.3476	0.0226	0.08

Beta glukan verimleri incelendiğinde yaş mayadan elde edilen beta glukan veriminin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ancak, mayadan elde edilecek maksimum beta glukan verimi % 16'dır. Yaş mayadan elde edilen beta glukan verimi daha yüksek çıkmıştır. Bunun sebebi, içerdiği su miktarıdır. Bu sebeple de bundan sonraki deneylerde kuru mayadan ekstraksiyon yapılmasının daha iyi olacağı belirlenmiştir. Referans beta glukan ile yaş ve kuru mayadan elde edilen beta glukanların FTIR analizleri yapılmıştır ve şekil 5.3'te gösterilen spektrumlarının benzer olduğu görülmüştür.



Şekil 5.3 Elde edilen beta glukanların FTIR spektrumları

Hem referans hem de elde edilen beta glukan örnekleri; protein bölgesinde yaklaşık 1600 - 1650 cm^{-1} dalga sayısı aralığında, C-O bağını içeren (beta glikozidik) polisakkarit bölgesinde 900 –1100 cm^{-1} dalga sayısı arasında, C-H bağının olduğu bölgede yaklaşık 2900 cm^{-1} dalga sayısı civarında ve OH bağının olduğu bölgede yaklaşık 3400 – 3425 cm^{-1} dalga sayısı arasında pik vermiştir. Ayrıca, yaklaşık 2400 cm^{-1} dalga sayısında da ortamın neminden dolayı oluşan karbondioksit pik vermiştir. Şekil 5.3'ün içindeki küçük grafik referansın ve örneklerin sadece beta glikozidik bağını oluşturan C-O bağının pikleri gösterilmiştir.

5.1.3 Ticari ve laboratuvarda üretilen mayaların beta glukan verimlerinin ve saflıklarının karşılaştırılması

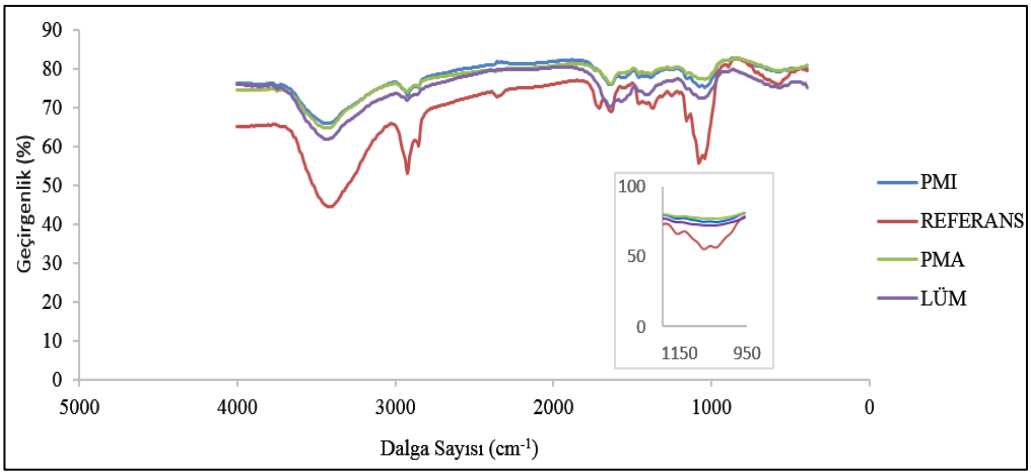
Ticari ve laboratuvarda üretilen mayadan elde edilen beta glukanların verimleri ve saflıkları çizelge 5.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 5.3 Ticari ve laboratuvarda üretilen mayadan elde edilen beta glukanların verimleri ve saflıkları

Örnek Adı	Beta glukan verimi (%)	Beta glukan saflığı (µg/mL)
Pak Maya Aktif	14.62	98.3
Pak Maya Instant	14.75	100.6
Laboratuvarda Üretilen Maya	18.73	53

Yapılan bir çalışmada, mayaların besi ortamına farklı katkı besi ortamı katılarak çoğaltılıp bu mayalardan elde edilen beta glukanların verimleri incelenmiştir ve en yüksek beta glukan verimi EDTA içeren besi ortamında çoğaltılan mayadan elde edilmiştir (Sabuncu 2016). Bu nedenle, laboratuvarda üretilen mayalar, EDTA içeren besi ortamında çoğaltılmıştır ve en yüksek beta glukan verimi laboratuvarda üretilen mayadan elde edilmiştir. Pak maya aktiften ve pak maya instanttan elde edilen beta glukan verimleri birbirine benzer bulunmuştur. Bunun sebebi de her ikisinde üretilen mayaların benzer üretim koşullarında ve standartlarda üretilmesi olabildiği düşünülmektedir. Ancak, antron-sülfürik asit yöntemi ile bulunan beta glukan saflıkları incelendiğinde pak mayadan elde edilen çökeleklerin beta glukan saflığı daha yüksek olduğu görülmüştür. Beta glukan saflığının yüksek olması, ekonomik olması ve beta glukan verimininde iyi olması sebebiyle diğer deneylerde kaynak olarak pak maya aktif kullanılması uygun bulunmuştur. Kullanılan antron – sülfürik asit analiz kalibrasyonunun yenilenmesine karar verilmiştir.

FTIR spektrumları incelendiğinde hem ticari hem de laboratuvarda üretilen mayadan elde edilen çökeleklerde beta glikozidik bağı olduğu görülmüştür (şekil 5.4).



(PMI: Pak maya instant; PMA: Pak maya aktif; LÜM: Laboratuvarda üretilen maya)

Şekil 5.4 Farklı üretilen mayalardan elde edilen beta glukanların FTIR spektrumları

Hem referans hem de elde edilen beta glukan örnekleri; protein bölgesinde yaklaşık 1635 cm^{-1} dalga sayısında, C-O bağını içeren polisakkarit bölgesinde 1000 –1100 cm^{-1} dalga sayısı arasında, C-H bağının olduğu bölgede 2900 cm^{-1} dalga sayısı civarında ve OH bağının olduğu bölgede yaklaşık 3400 – 3450 cm^{-1} dalga sayısı arasında pik vermiştir. Şekil 5.4'ün içindeki küçük grafik referansın ve örneklerin sadece beta glikozidik bağını oluşturan C-O bağının pikleri gösterilmiştir.

5.2 Ultrasonik Destekli Alkali – Asidik Ekstraksiyonu

5.2.1 Alkali çözücülerin beta glukan üretimine etkisi

Beta glukan elde edilmesinde kullanılan ultrasonik destekli alkali-asidik ekstraksiyonunda farklı alkali çözücüler kullanılarak beta glukan verimine ve içeriğine etkisi incelenmiştir. Zayıf, orta ve kuvvetli alkali çözücüler kullanılmıştır. Kontrol olarak 2 M NaOH (yaklaşık pH 13.5) kullanılmıştır. Bu koşullarda elde edilen beta glukanların verimleri ve saflıkları çizelge 5.4 ve çizelge 5.5'te verilmiştir.

Çizelge 5.4 Farklı alkali çözücüler kullanılarak S.*cerevisiae* mayasından elde edilen beta glukanların verimleri ve saflıkları (pH 10)

Örnek adı	Beta glukan verimi (%)	Beta glukan saflığı (mg/mL)
$K_2CO_{3,1}$	50.35	0.26
$K_2CO_{3,2}$	50.41	0.32
$K_2CO_{3,3}$	50.86	0.36
$NaOH_1$	62.91	0.20
$NaOH_2$	62.70	0.21
$NaOH_3$	62.59	0.16
$Ca(OH)_{2,1}$	61.44	0.31
$Ca(OH)_{2,2}$	60.74	0.36
$Ca(OH)_{2,3}$	61.54	0.29
Kontrol	13.72	0.66

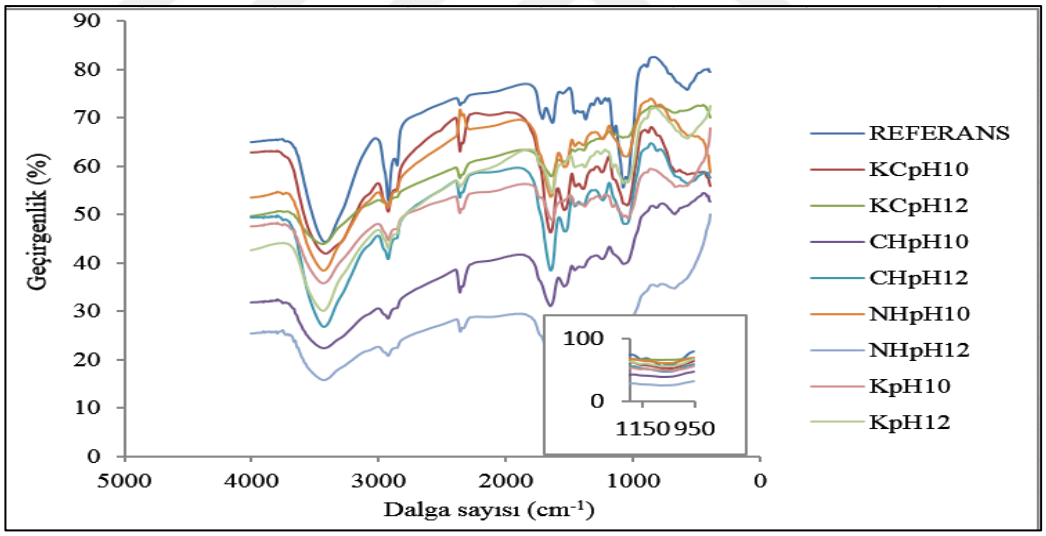
Çizelge 5.5 Farklı alkali çözücüler kullanılarak *S.cerevisiae* mayasından elde edilen beta glukanların verimleri ve saflıkları (pH 12)

Örnek adı	Beta glukan verimi (%)	Beta glukan saflığı (mg/mL)
$K_2CO_{3,1}$	52.37	0.24
$K_2CO_{3,2}$	52.25	0.13
$K_2CO_{3,3}$	50.88	0.22
$NaOH_1$	58.95	0.28
$NaOH_2$	58.19	0.27
$NaOH_3$	58.44	0.25
$Ca(OH)_{2,1}$	62.01	0.19
$Ca(OH)_{2,2}$	61.76	0.22
$Ca(OH)_{2,3}$	64.25	0.18
Kontrol	13.23	0.66

Maya hücresinde doğal olarak bulunan beta glukan miktarı % 8-16'dır. Ancak, çizelge 5.4 ve 5.5 incelendiğinde kontrol dışındaki örneklerin beta glukan verimleri olması gerekenden fazla çıkmıştır. Bunun sebebi, kontrol dışındaki örneklerde beta glukan dışındaki moleküllerin (protein, yağ gibi) hücre duvarından tam olarak giderilememesidir. Dolayısıyla, beta glukan saflıklarının düşük olduğunu göstermektedir. Bu sonucu da yapılan antron-sülfürik asit yöntemiyle belirlenen beta glukan saflıkları desteklemektedir. Hem verim hem de saflık olarak en iyi sonucu 2 M NaOH ile yapılan ekstraksiyonla elde edilen beta glukan örnekleri verdiği için 2 M NaOH ile deneylere devam edilmiştir. pH 10 değerinde potasyum karbonat pH

12'dekine göre verim ve saflık olarak daha iyi sonuç vermiştir. Kalsiyum karbonatta ise pH verimi etkilememiş ama pH arttıkça saflık düşmüştür. Potasyum karbonat ve kalsiyum karbonat suda tam olarak çözünen kimyasallar olmadığı için bu sonuçlar elde edilmiş olabilir. pH 12 değerini elde edebilmek için daha fazla malzeme kullanılmasına rağmen belli bir çözünme değeri olduğu için tam çözünmediğinden ekstraksiyon verimli olmamış olabilir. Kalsiyum karbonat çözeltisinde çökme olduğu gözle görülmüştür. Sodyum hidroksitte pH arttıkça ekstraksiyonun daha etkili olduğu sonuçlarda görülmüştür.

FTIR spektrumları karşılaştırıldığında referans beta glukanla farklı alkali çözücüler kullanılarak elde edilen beta glukan örneklerinin FTIR spektrumlarının benzer olduğu ve beta glukanı oluşturan beta glikozidik bağının olduğu dalga sayısında pik verdiği görülmektedir (şekil 5.5).



(KCpH10: pH değeri olan 10 K_2CO_3 çözeltisiyle elde edilen beta glukan örnekleri, KCpH12: pH değeri olan 12 K_2CO_3 çözeltisiyle elde edilen beta glukan örnekleri; CHpH10: pH değeri olan 10 $Ca(OH)_2$ çözeltisiyle elde edilen beta glukan örnekleri, CHpH12: pH değeri olan 12 $Ca(OH)_2$ çözeltisiyle elde edilen beta glukan örnekleri; NHpH10: pH değeri olan 10 NaOH çözeltisiyle elde edilen beta glukan örnekleri, NHpH12: pH değeri olan 12 NaOH çözeltisiyle elde edilen beta glukan örnekleri; KpH10 ve KpH12: Hem pH 10 deneylerinde hem de pH 12 deneylerinde kontrol olarak 2 M NaOH çözeltisiyle elde edilen beta glukan örnekleri)

Şekil 5.5 Farklı çözücüler kullanılarak elde edilen beta glukanların FTIR spektrumları

Hem referans hem de elde edilen beta glukan örnekleri; protein bölgesinde yaklaşık 1600 - 1670 cm^{-1} dalga sayısı arasında, C-O bağını içeren polisakkarit bölgesinde 1000 –1100 cm^{-1} dalga sayısı arasında, C-H bağının olduğu bölgede 2900 - 2940 cm^{-1} dalga sayısı aralığında ve OH bağının olduğu bölgede yaklaşık 3350 – 3480 cm^{-1} dalga sayısı arasında pik vermiştir. Ayrıca, yaklaşık 2400 cm^{-1} dalga sayısında da ortamın neminden dolayı oluşan karbondioksit pik vermiştir. Şekil 5.5'in içindeki küçük grafik referansın ve örneklerin sadece beta glikozidik bağını oluşturan C-O bağının pikleri gösterilmiştir.

5.2.2 Ultrasonik destekli alkali-asidik ekstraksiyonun koşullarının optimizasyonu

Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde mayalardan beta glukan eldesinde en çok kullanılan ekstraksiyon yöntemlerinden biri alkali-asidik ekstraksiyonu olduğu için bu tez çalışmasında kullanılan ekstraksiyon yöntemlerinden biri olarak seçilmiştir. Yöntemdeki hangi ekstraksiyon koşulları ve bu koşulların alt, üst ve merkez noktaları literatürde daha önce yapılan çalışmalar incelenerek belirlenmiştir. Bu sebeple, Box-Behnken istatistiksel deneysel tasarım yöntemi, ultrasonik destekli alkali-asidik ekstraksiyon yönteminin optimizasyonunda kullanılmıştır. Üç faktörlü, üç seviyeli, iki yanıtlı ve üç tekrarlı deney tasarım matrisi Design Expert paket programında oluşturulmuştur ve elde edilen sonuçlar çizelge 5.6'da verilmiştir

Çizelge 5.6 Ultrasonik destekli alkali-asidik ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu ile elde edilen sonuçlar

Deney No	Çözücü/Katı Oranı (mL/mg)	Ekstraksiyon Sıcaklığı (°C)	Ekstraksiyon Süresi (dk)	Beta Glukan Verimi (%)	Beta Glukan Saflığı (mg/mL)
1	0.006	55	60	19.76	0.115
2	0.01	55	60	16.69	0.34
3	0.006	95	60	12.39	0.35
4	0.01	95	60	13.21	0.365
5	0.006	75	30	16.04	0.24
6	0.01	75	30	16.75	0.275
7	0.006	75	90	13.52	0.45
8	0.01	75	90	12.87	0.36
9	0.008	55	30	23.84	0.135
10	0.008	95	30	13.09	0.46
11	0.008	55	90	17.51	0.305
12	0.008	95	90	11.70	0.375
13	0.008	75	60	16.17	0.27
14	0.008	75	60	13.64	0.46
15	0.008	75	60	13.72	0.35
16	0.008	75	60	13.56	0.335
17	0.008	75	60	15.07	0.21

Beta glukan üretiminde uygulanan ultrasonik destekli alkali-asidik ekstraksiyon yönteminin koşulları Box – Behnken istatistiksel deney tasarım yöntemi kullanılarak optimize edilmiştir. Optimizasyon için kullanılan Design Expert programına ekstraksiyon koşullarının minimum ve maksimum değerleri girilerek deneysel tasarım tablosu oluşturulmuştur. Tasarım yönteminde faktörler; çözücü/katı oranı, ekstraksiyon sıcaklığı ve süresidir. Tasarım yönteminin yanıtları; beta glukan verimi ve saflığıdır. Deneyler merkezi noktada beş tekrarlı yapılmıştır. Beta glukan verimi için ANOVA tablosu çizelge 5.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.7 Beta glukan verimi için ANOVA tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	df	Ortalama Kare	F - değeri	p - değeri	
Model	140.83	9	15.65	10.65	0.0025	anlamlı
A – Çözücü/Katı Oranı	0.5995	1	0.5995	0.4081	0.5433	
B – Ekstraksiyon Sıcaklığı	93.91	1	93.91	63.93	< 0.0001	
C – Ekstraksiyon Süresi	24.92	1	24.92	16.97	0.0045	
AB	3.78	1	3.78	2.58	0.1526	
AC	0.4624	1	0.4624	0.3148	0.5923	
BC	6.10	1	6.10	4.15	0.0810	
A^2	0.4578	1	0.4578	0.3117	0.5941	
B^2	8.37	1	8.37	5.70	0.0483	
C^2	2.02	1	2.02	1.38	0.2792	
Artık	10.28	7	1.47			
Uyum Eksikliği	4.96	3	1.65	1.24	0.4048	anlamsız
Saf Hata	5.32	4	1.33			
Toplam	151.11	16				

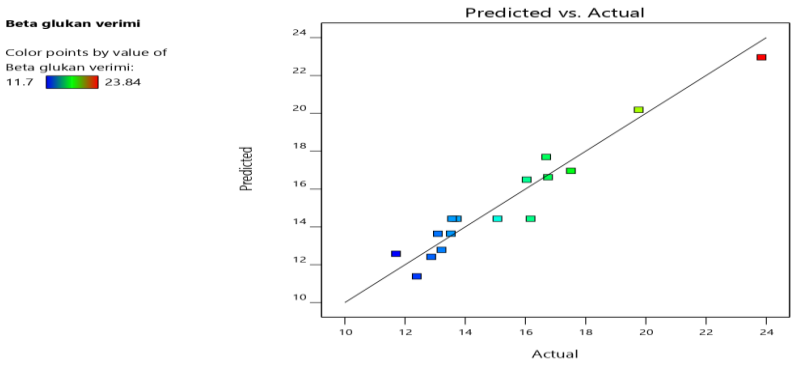
Modelin F değeri modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. B, C ve B^2 model terimlerinin p değerleri 0.05'ten küçük olduğu için anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, ekstraksiyon sıcaklığı ve süresi model terimlerinin beta glukan veriminin üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Uyum eksikliği değeri anlamlı olmadığı bulunmuştur. Modelin anlamlı ve uyum eksikliğinin anlamsız olması seçilen modelin uyumlu ve geçerli olduğunu göstermiştir. Ayrıca, modelin R^2 değeri de 0.9320 olarak bulunmuştur. R^2 değerinin 1 değerine yakın olması regresyon modelinin uyumunun iyi olduğunu kanıtlamıştır. Kodlanmış ve gerçek değerler cinsinden yanıt ve faktörlerin arasındaki matematiksel ilişkiyi veren regresyon model denklemleri eşitlik (3.4) ve (3.5) 'te verilmiştir.

$$\text{Beta glukan verimi} = 14.43 - 0.2738*A - 3.43*B - 1.77*C + 0.9725*AB - 0.3400*AC + 1.23*BC - 0.3298*A^2 + 1.41*B^2 + 0.6927*C^2 \quad (3.4)$$

$$\begin{aligned}\text{Beta glukan verimi} = {} & 70.36208 - 301.31250*\text{çözücü/katı oranı} \\ & - 1.01816*\text{ekstraksiyon sıcaklığı} \\ & - 0.260242*\text{ekstraksiyon süresi} \\ & + 24.31250*\text{çözücü/katı oranı}*\text{ekstraksiyon sıcaklığı} \\ & - 5.66667*\text{çözücü/katı oranı}*\text{ekstraksiyon süresi} \\ & + 0.002058*\text{ekstraksiyon sıcaklığı}*\text{ekstraksiyon süresi} \\ & - 82437.500*\text{çözücü/katı oranı}^2 \\ & + 0.003526*\text{ekstraksiyon sıcaklığı}^2 \\ & + 0.000770*\text{ekstraksiyon süresi}^2\end{aligned} \quad (3.5)$$

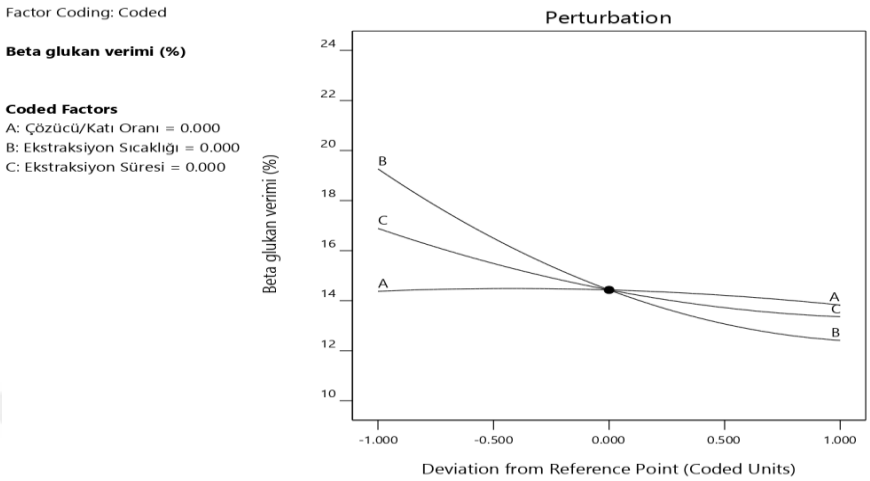
Beta glukan veriminin kodlanmış faktörlerle oluşturulan denklemi eşitlik 3.4'te verilmiştir. Faktörlerin en düşük kod değeri -1 ve en yüksek kod değeri +1'dir. Faktörlerin gerçek değerleri ile oluşturulan denklem eşitlik 3.5'te verilmiştir. Kodlanmış denklem faktör katsayılarını karşılaştırarak faktörlerin göreceli etkisini tanımlamak için daha kullanışlıdır. Kodlanmış faktörlerle oluşturulan eşitlik 3.4'te de görüldüğü gibi ekstraksiyon sıcaklığının (B) ve ekstraksiyon süresinin (C) karesel etkisi, çözücü/katı oranı (A) ve ekstraksiyon sıcaklığının birlikte etkisi ve ekstraksiyon sıcaklığının ve süresinin birlikte etkisi beta glukan verimi üzerine etkisi pozitifken çözücü/katı oranının, ekstraksiyon sıcaklığının ve ekstraksiyon süresinin, çözücü/katı oranın karesinin ve çözücü/katı oranı (A) ve ekstraksiyon süresinin birlikte etkisi beta glukan verimine etkisi negatiftir.

Eşitlik 3.3 kullanılarak beta glukan veriminin tahmini değerleri hesaplanırken beta glukanın gerçek değerleri, deney tasarım koşullarına göre yapılan deneyler sonucunda elde edilmiştir. Elde edilen değerler lineer çizgiye ne kadar yakın olurlarsa modelin o kadar uyumlu ve iyi olduğunu göstermektedir. Beta glukan veriminin gerçek değerleri lineer çizginin etrafında toplanması uyumlu olduğunu göstermektedir (şekil 5.6). Aynı zamanda R^2 değeri ne kadar 1'e yakınsa o kadar gerçek ve tahmini değerler birbirine uyumlu demektir. Bu çalışmada da R^2 değeri 1 değerine yakın olduğu için gerçek ve tahmini değerler birbirine uyumlu bulunmuştur.



Şekil 5.6 Beta glukan veriminin tahmini değerlerine karşı gerçek değerlerinin grafiği

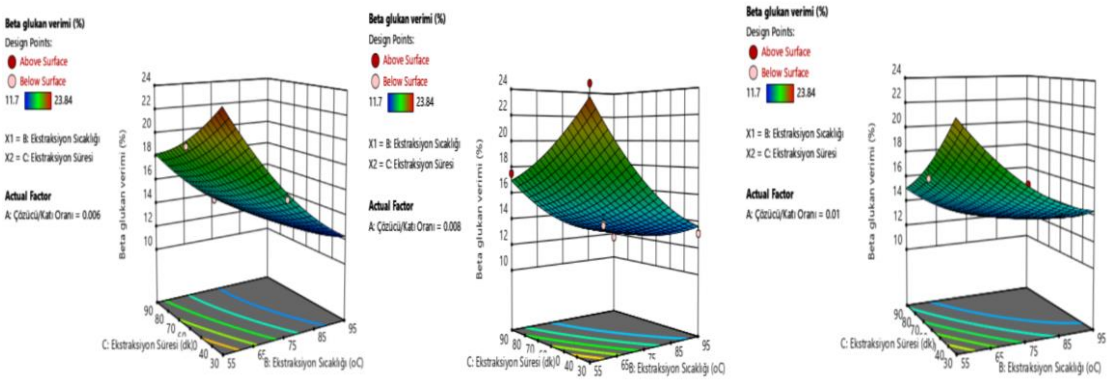
Tasarım alanındaki tüm faktörlerin beta glukan saflığına olana etkilerini karşılaştıran pertürbasyon grafiği şekil 5.7'de verilmiştir.



Şekil 5.7 Faktörlerin beta glukan verimi üzerindeki etkisini gösteren pertürbasyon grafiği

Pertürbasyon grafiği incelendiğinde minimumdan maksimum değere gidildikçe ekstraksiyon sıcaklığının ve ekstraksiyon süresinin beta glukan verimini azalttığı çözücü/katı oranın beta glukan verimini etkilemediği görülmüştür.

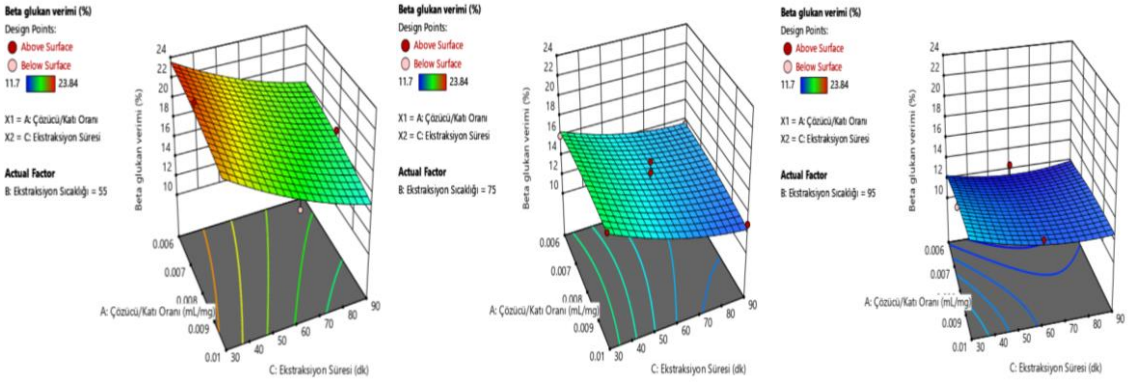
Her bir çözücü/katı oranı için beta glukan verimine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri şekil 5.8'de verilmiştir.



Şekil 5.8 Farklı çözücü/katı oranı kullanmanın beta glukan verimine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri

Grafikler ayrı ayrı incelendiğinde çözücü/katı oranı 0.006 v/w olduğunda beta glukan veriminin en yüksek olduğu değer yaklaşık % 23.42 ve bu değere karşılık gelen ekstraksiyon sıcaklığı 55°C ve süresi 30 dk olduğu bulunmuştur. Çözücü/katı oranı 0.008 v/w olduğunda beta glukan veriminin en yüksek olduğu değer yaklaşık % 22.93 ve bu değere karşılık gelen ekstraksiyon sıcaklığı 55°C ve süresi 30 dk olduğu ve çözücü/katı oranı 0.01 v/w olduğunda ise beta glukan veriminin en yüksek olduğu değer yaklaşık % 21.69 ve bu değere karşılık gelen ekstraksiyon sıcaklığı 55°C ve süresi 30 dk olduğu bulunmuştur. Yanıt yüzey grafiklerden bulunan değerlerde de görüldüğü gibi farklı çözücü/katı oranlarının beta glukan verimi üzerinde fazla etkilemediği görülmüştür.

Her bir ekstraksiyon sıcaklığının beta glukan verimine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri şekil 5.9'da verilmiştir.

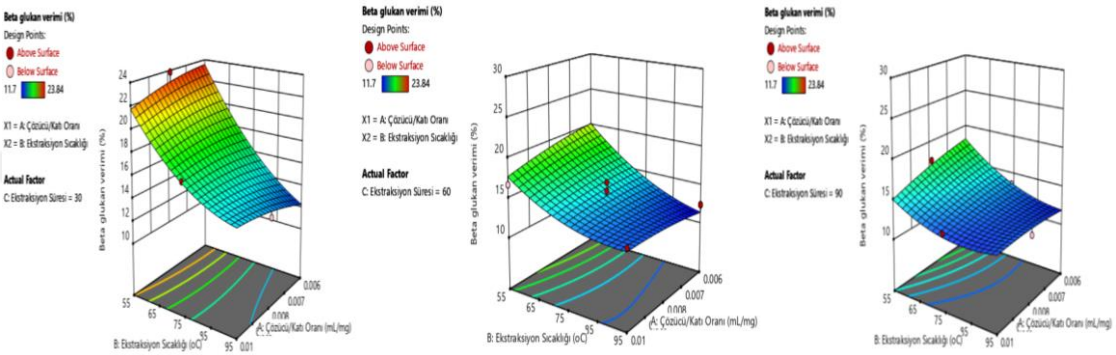


Şekil 5.9 Ekstraksiyon sıcaklığının beta glukan verimine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri

Grafikler ayrı ayrı incelendiğinde ekstraksiyon sıcaklığı 55°C olduğunda beta glukan veriminin en yüksek olduğu değer yaklaşık % 23.47 ve bu değere karşılık gelen ekstraksiyon süresi 30 dk çözücü/katı oranının 0.006 v/w olduğu bulunmuştur. Ekstraksiyon sıcaklığı 75°C olduğunda beta glukan veriminin en yüksek olduğu değer yaklaşık % 16.87 ve bu değere karşılık gelen ekstraksiyon süresi 30 dk çözücü/katı oranının 0.008 v/w olduğu ve ekstraksiyon sıcaklığı 95°C olduğunda beta glukan veriminin en yüksek olduğu değer yaklaşık 0.1433 ve bu değere karşılık gelen ekstraksiyon süresi 30 dk çözücü/katı oranının 0.01 v/w olduğu bulunmuştur.

Yanıt yüzey grafiklerden bulunan değerlerde de görüldüğü gibi ekstraksiyon sıcaklığının değişmesinin beta glukan verimini etkilediği görülmüştür. En yüksek beta glukan verimi 55°C, 30 dk ve 0.006 v/w çözücü/katı oranında bulunmuştur.

Her bir ekstraksiyon süresinin beta glukan verimine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri şekil 5.10'da verilmiştir.



Şekil 5.10 Ekstraksiyon süresinin beta glukan verimine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri

Grafikler ayrı ayrı incelendiğinde ekstraksiyon süresi 30 dk olduğunda beta glukan veriminin en yüksek olduğu değer yaklaşık % 23.43 ve bu değere karşılık gelen ekstraksiyon sıcaklığı 55°C ve çözücü/katı oranı 0.006 v/w olduğu bulunmuştur. Ekstraksiyon süresi 60 dk olduğunda beta glukan veriminin en yüksek olduğu değer yaklaşık % 20.12 ve bu değere karşılık gelen ekstraksiyon sıcaklığı 55°C ve çözücü/katı oranı 0.006 v/w olduğu ve ekstraksiyon süresi 90 dk olduğunda beta glukan veriminin en yüksek olduğu değer yaklaşık % 18.20 ve bu değere karşılık gelen ekstraksiyon sıcaklığı 55°C ve çözücü/katı oranı 0.006 v/w olduğu bulunmuştur. Yanıt yüzey grafiklerden bulunan değerlerde de görüldüğü gibi ekstraksiyon süresinin değişmesinin beta glukan verimini etkilediği görülmüştür. En yüksek beta glukan verimi 55°C, 30 dk ve 0.006 v/w koşullarında bulunmuştur.

Beta glukan saflığı için yapılan ANOVA istatistiksel analizinin sonuçları çizelge 5.8'de verilmiştir.

Çizelge 5.8 Beta glukan saflığı için ANOVA tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	df	Ortalama Kare	F - değeri	p - değeri	
Model	0.1067	9	0.0119	7.47	0.0341	anlamlı
A – Çözücü/Katı Oranı	0.0160	1	0.0160	10.05	0.0338	
B – Ekstraksiyon Sıcaklığı	0.0536	1	0.0536	33.80	0.0044	
C – Ekstraksiyon Süresi	0.0014	1	0.0014	0.8538	0.4078	
AB	0.0110	1	0.0110	6.95	0.0578	
AC	0.0020	1	0.0020	1.28	0.3210	
BC	0.0163	1	0.0163	10.25	0.0329	
A^2	0.0044	1	0.0044	2.76	0.1718	
B^2	0.0005	1	0.0005	0.2905	0.6185	
C^2	0.0004	1	0.0004	0.2713	0.6299	
Artık	0.0063	4	0.0016			
Uyum Eksikliği	0.0027	2	0.0014	0.7548	0.5699	anlamsız
Saf Hata	0.0036	2	0.0018			
Toplam	0.1131	13				

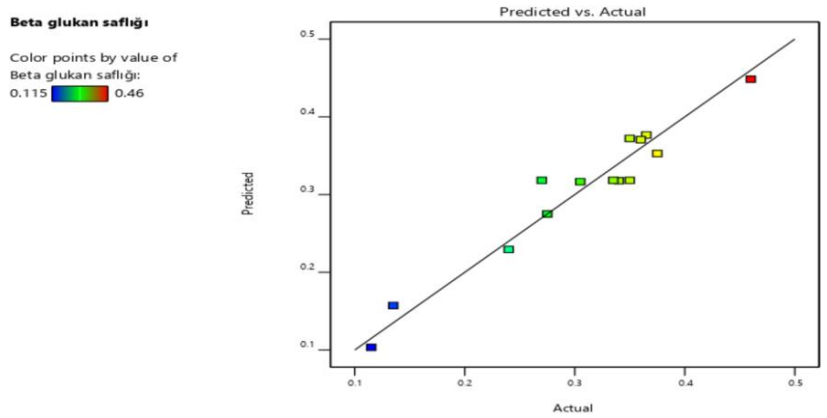
Modelin F değeri modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. A, B ve BC model terimlerinin p değerleri 0.05'ten küçük olduğu için anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, çözücü/katı oranı, ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon sıcaklığı ve süresinin birlikte etkileşimi model terimlerinin beta glukan veriminin üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Uyum eksikliği değeri anlamlı olmadığı bulunmuştur. Modelin anlamlı ve uyum eksikliğinin anlamsız olması seçilen modelin uyumlu ve geçerli olduğunu göstermiştir. Ayrıca, modelin R^2 değeri de 0.9439 olarak bulunmuştur. R^2 değeri 1 değerine yakın olması regresyon modelinin uyumunun iyi olduğunu kanıtlamıştır. Kodlanmış ve gerçek değerler cinsinden yanıt ve faktörlerin arasındaki matematiksel ilişkiyi veren regresyon model denklemleri eşitlik (3.6) ve (3.7) 'de verilmiştir.

$$\text{Beta glukan saflığı} = 0.3183 + 0.0547*A + 0.0819*B + 0.0159*C - 0.0525*AB + 0.0319*AC - 0.0638*BC - 0.0382*A^2 + 0.0124*B^2 - 0.0120*C^2 \quad (3.6)$$

Beta glukan saflığı = - 1.73521 + 246.82292 * çözücü/katı oranı
+ 0.016320 * ekstraksiyon sıcaklığı
+ 0.005847 * ekstraksiyon süresi
- 1.31250 * çözücü/katı oranı * ekstraksiyon sıcaklığı
+ 0.531250 * çözücü/katı oranı * ekstraksiyon süresi
- 0.000106 * ekstraksiyon sıcaklığı * ekstraksiyon süresi
-9557.29167 * çözücü/katı oranı ^{2}
+ 0.000031 * ekstraksiyon sıcaklığı^2
- 0.000013 * ekstraksiyon süresi^2 (3.7)

Beta glukan saflığının kodlanmış faktörlerle oluşturulan denklemi eşitlik 3.6'da verilmiştir. Faktörlerin en düşük kod değeri -1 ve en yüksek kod değeri +1'dir. Faktörlerin gerçek değerleri ile oluşturulan denklem eşitlik 3.7'de verilmiştir. Faktör katsayılarını karşılaştırarak faktörlerin göreceli etkisini tanımladığı için kodlanmış denklem daha kullanışlıdır. Kodlanmış faktörlerle oluşturulan eşitlik 3.6'da da görüldüğü gibi ekstraksiyon sıcaklığının (B) ve ekstraksiyon süresinin (C), çözücü/katı oranı (A), çözücü/katı oranı ile ekstraksiyon sıcaklığının birlikte etkisi ve ekstraksiyon sıcaklığının karesinin etkisi beta glukan saflığı üzerine etkisi pozitifken çözücü/katı oranı ile ekstraksiyon sıcaklığının birlikte etkisi, ekstraksiyon süresi ile sıcaklığının birlikte etkisi, çözücü/katı oranının karesel ve ekstraksiyon süresinin karesinin beta glukan saflığına etkisi negatiftir.

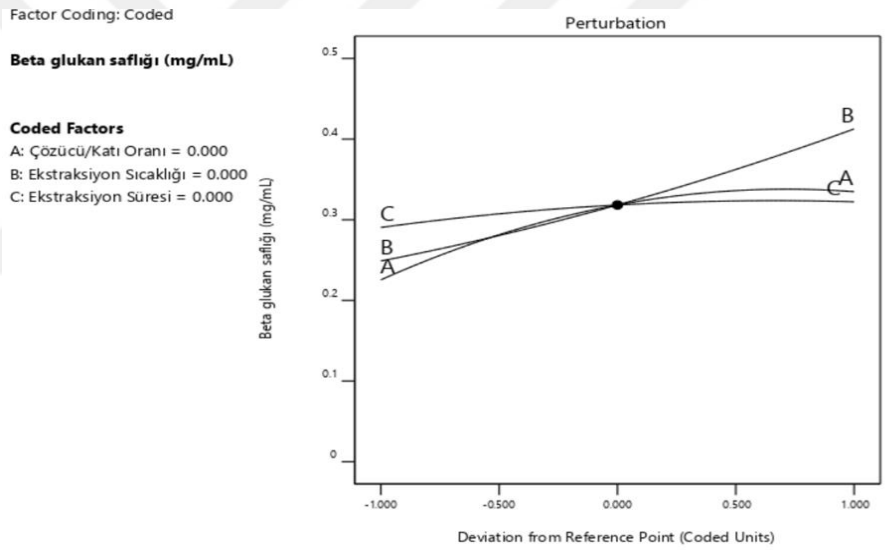
Beta glukan saflığının tahmini değerlerine karşı gerçek değerlerinin grafiği şekil 5.11'de verilmiştir.



Şekil 5.11 Beta glukan saflığının tahmini değerlerine karşı gerçek değerlerinin grafiği

Eşitlik 3.5 kullanılarak beta glukan saflığının tahmini değerleri hesaplanırken beta glukanın gerçek değerleri, deney tasarım koşullarına göre yapılan deneyler sonucunda elde edilmiştir. Elde edilen değerler lineer çizgiye ne kadar yakın olurlarsa modelin o kadar uyumlu ve iyi olduğunu göstermektedir. Beta glukan saflığının gerçek değerleri lineer çizginin etrafında toplanması uyumlu olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada da R^2 değeri 1 değerine yakın olduğu için gerçek ve tahmini değerler birbirine uyumlu bulunmuştur.

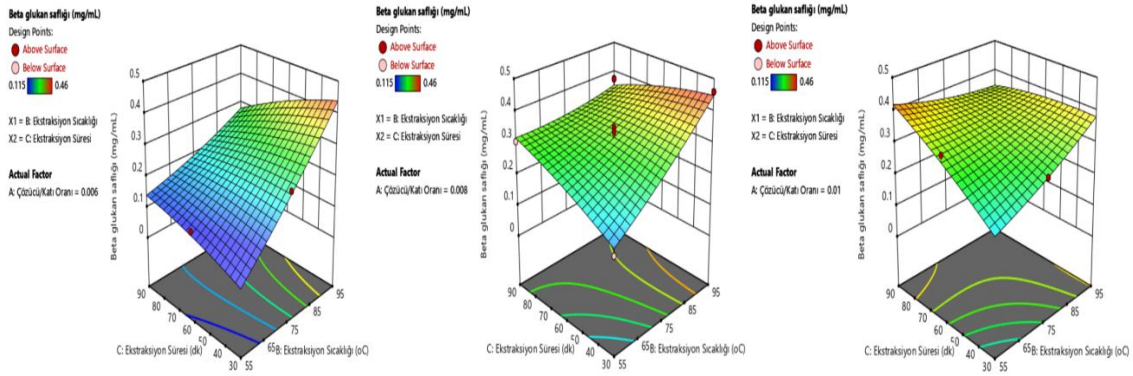
Tasarım alanındaki tüm faktörlerin beta glukan saflığına olana etkilerini karşılaştıran pertürbasyon grafiği şekil 5.12'de verilmiştir.



Şekil 5.12 Faktörlerin beta glukan saflığı üzerindeki etkisini gösteren pertürbasyon grafiği

Referans noktası merkez nokta olan pertürbasyon grafiği incelendiğinde ekstraksiyon sıcaklığı beta glukan saflığı üzerinde en çok etki eden faktör olduğu görülmektedir. Çözücü/katı oranı (A) ve ekstraksiyon süresi (C) faktörlerinin beta glukan saflığı üzerine etkilerinin birbirine yakın ama ekstraksiyon sıcaklığına göre az etkisi olduğu tespit edilmiştir. Ekstraksiyon sıcaklığı ve çözücü/katı oranı arttığında beta glukan saflığı artarken ekstraksiyon sıcaklığının beta glukan saflığını pek değiştirmediği görülmüştür.

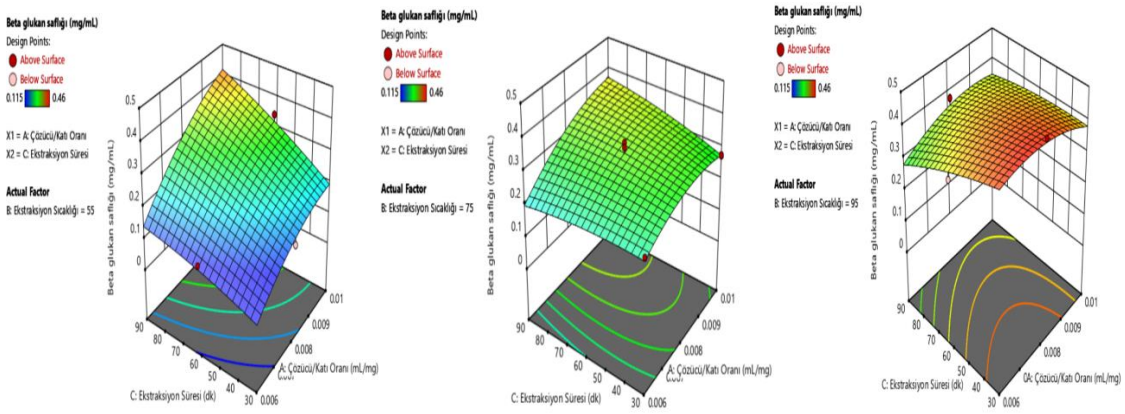
Her bir çözücü/katı oranı için beta glukan saflığına etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri şekil 5.13'te verilmiştir.



Şekil 5.13 Çözücü/katı oranının beta glukan saflığına etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri

Grafikler ayrı ayrı incelendiğinde çözücü/katı oranı 0.006 v/w olduğunda beta glukan saflığının en yüksek olduğu değer yaklaşık 0.44 mg/mL ve bu değere karşılık gelen ekstraksiyon sıcaklığı 95°C ve ekstraksiyon süresi 30 dk olduğu bulunmuştur. Çözücü/katı oranı 0.008 v/w olduğunda beta glukan saflığının en yüksek olduğu değer yaklaşık 0.45 mg/mL ve bu değere karşılık gelen ekstraksiyon sıcaklığı 95°C ve ekstraksiyon süresi 30 dk olduğu ve çözücü/katı oranı 0.01 v/w olduğunda beta glukan saflığının en yüksek değeri yaklaşık 0.42 mg/mL ve bu değere karşılık gelen ekstraksiyon sıcaklığı 55°C ve ekstraksiyon süresi 90 dk olduğu bulunmuştur. Yanıt yüzey grafiklerden bulunan değerlerde de görüldüğü gibi çözücü/katı oranının değişmesinin beta glukan saflığını az etkisinin olduğu görülmüştür. En yüksek beta glukan verimi 95°C, 30 dk ve 0.008 v/w çözücü/katı oranında bulunmuştur.

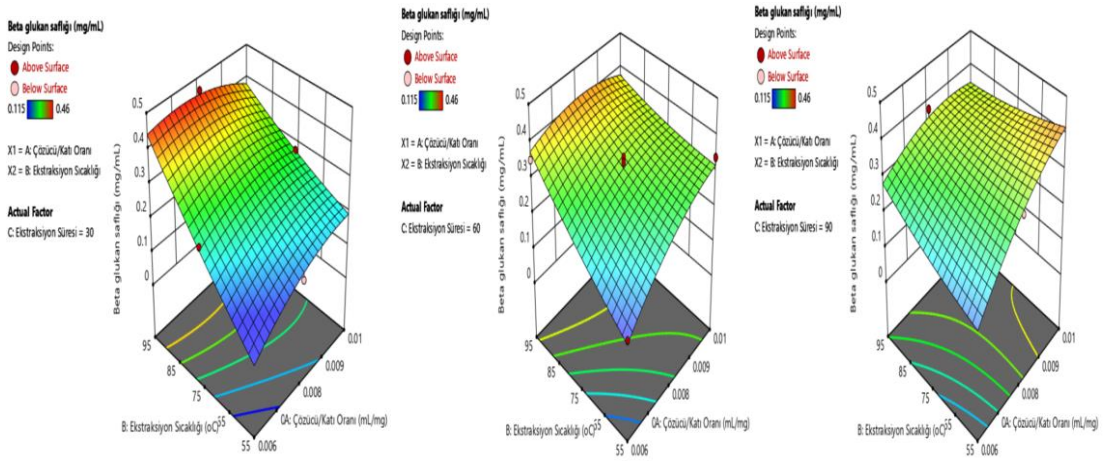
Her bir ekstraksiyon sıcaklığının beta glukan saflığına etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri şekil 5.14'te verilmiştir.



Şekil 5.14 Ekstraksiyon sıcaklığının beta glukan saflığına etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri

Grafikler ayrı ayrı incelendiğinde ekstraksiyon sıcaklığı 55°C olduğunda beta glukan saflığının en yüksek olduğu değer yaklaşık 0.42 mg/mL ve bu değere karşılık gelen ekstraksiyon süresinin 90 dk ve çözücü/katı oranı 0.01 v/w olduğu bulunmuştur. Ekstraksiyon sıcaklığı 75°C olduğunda beta glukan saflığının en yüksek olduğu değer yaklaşık 0.37 mg/mL ve bu değere karşılık gelen ekstraksiyon süresinin 89 dk ve çözücü/katı oranı 0.01 v/w olduğu belirlenmiştir. Ekstraksiyon sıcaklığı 95°C olduğunda beta glukan saflığının en yüksek olduğu değer yaklaşık 0.45 mg/mL ve bu değere karşılık gelen ekstraksiyon süresinin 30 dk ve çözücü/katı oranı 0.007 v/w olduğu bulunmuştur. Yanıt yüzey grafiklerden bulunan değerlerde de görüldüğü gibi ekstraksiyon sıcaklığının değişmesinin beta glukan saflığını etkilediği görülmüştür. Genel olarak sıcaklığın artması beta glukan saflığını arttırmıştır. En yüksek beta glukan verimi 95°C, 30 dk ve 0.007 v/w çözücü/katı oranında bulunmuştur.

Her bir ekstraksiyon süresinin beta glukan saflığına etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri şekil 5.15’te verilmiştir.

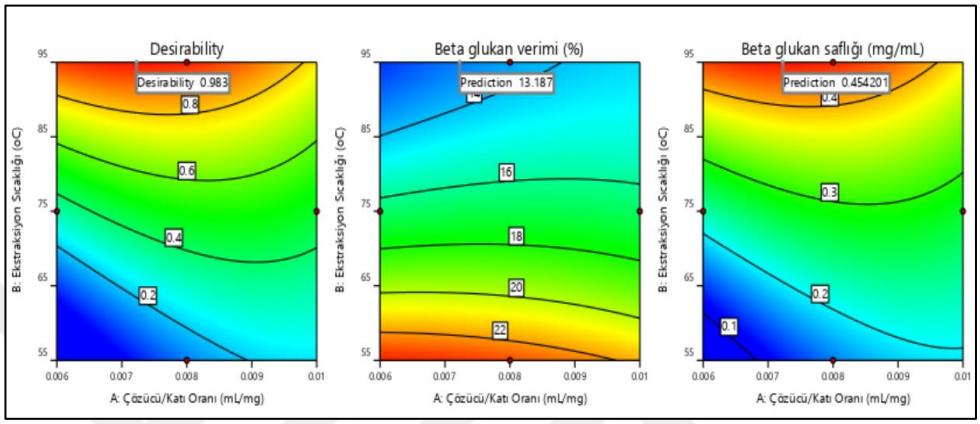


Şekil 5.15 Ekstraksiyon süresinin beta glukan saflığına etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri

Grafikler ayrı ayrı incelendiğinde ekstraksiyon süresi 30 dk olduğunda beta glukan saflığının en yüksek olduğu değer yaklaşık 0.45 mg/mL ve bu değere karşılık gelen ekstraksiyon sıcaklığı 95°C ve çözücü/katı oranı 0.007 v/w olduğu bulunmuştur. Ekstraksiyon süresi 60 dk olduğunda beta glukan saflığının en yüksek olduğu değer yaklaşık 0.41 mg/mL ve bu değere karşılık gelen ekstraksiyon sıcaklığı 95°C ve çözücü/katı oranı 0.008 v/w olduğu belirlenmiştir. Ekstraksiyon süresi 90 dk olduğunda beta glukan saflığının en yüksek olduğu değer yaklaşık 0.42 mg/mL ve bu değere karşılık gelen ekstraksiyon sıcaklığı 55°C ve çözücü/katı oranı 0.01 v/w olduğu bulunmuştur. Yanıt yüzey grafiklerden bulunan değerlerde de görüldüğü gibi ekstraksiyon süresinin değişmesinin beta glukan saflığını daha az etkilediği görülmüştür. En yüksek beta glukan saflığı 95°C, 30 dk ve 0.007 v/w çözücü/katı oranında bulunmuştur.

Beta glukan *S.cerevisiae* ekmek mayasının hücresinin % 8 – 16'sını oluşturmaktadır. Ekstraksiyon yöntemleri sonucunda 1 g ekmek mayasından elde edilebilecek maksimum beta glukan miktarı 0.16 g olmalıdır. Farklı faktörlerin beta glukan verimleri üzerine etkilerini gösteren grafiklerdeki en yüksek verimler 0.16 g değerinden yüksek çıkmıştır. Bu durum, elde edilen örneklerdeki beta glukanın yanı sıra mannoprotein, kitin, alfa glukan gibi maddelerinde olduğu yani beta glukan saflıklarının düşük olduğunu göstermektedir. Sağlık açısından değerlendirildiğinde beta glukanın saflığının

düşük olmasının negatif etkilere yol açacağından saflık yanıtı verim yanıtından daha önemli olmasına sebep olmuştur. Böylelikle, verimin 0.16 g ve saflığının yüksek olması sonucuna varılmıştır. Bu koşulları sağlayan optimum değerleri bulmak için her iki yanıtı da birlikte değerlendiren istenebilirlik fonksiyonu kullanılmıştır. Bu fonksiyonla ilgili grafik şekil 5.16'da verilmiştir.

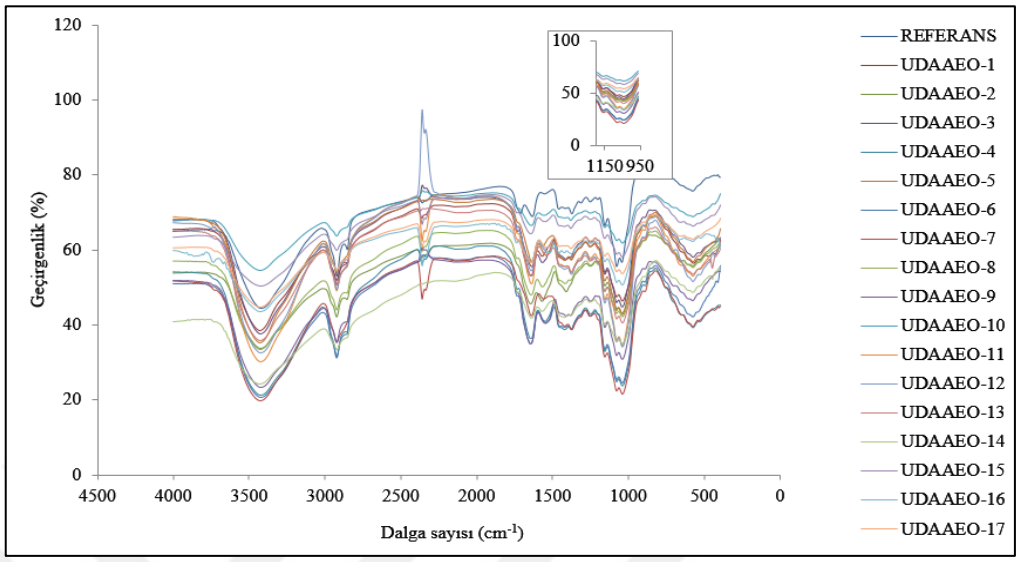


Şekil 5.16 Ultrasonik destekli alkali-asidik ekstraksiyonunun istenebilirlik fonksiyonu yaklaşımıyla optimum değerlerinin belirlenmesi

İstenebilirlik fonksiyonu, tüm yanıtların boyutsuz tek bir fonksiyon altında toplanarak istenilen sonuçları verecek şekilde maksimize edilmesidir (Koç ve Kaymak – Ertekin 2010). Bu fonksiyon sayesinde yanıtlar birlikte değerlendirilerek ekstraksiyonun her iki yanıt için de ortak optimum değerleri belirlenmiştir. Bu fonksiyon kullanılırken beta glukan saflığı verimden daha önemli olduğu için saflığın maksimize edilmesi verimin deneyde elde edilen değerler aralığında olması seçenekleri seçilerek bu değerler elde edilmiştir. Bu fonksiyon kullanılarak elde edilen optimum değerlerin 0.007 v/w çözücü/katı oranı, 95°C ekstraksiyon sıcaklığı ve 30 dk ekstraksiyon süresi olduğu tespit edilmiştir. Bu koşullarda deney yapıldığında olası yanıtlar sırasıyla verim için % 13.187 ve saflık için 0.454 mg/mL'dir. Belirlenen optimum ekstraksiyon koşullarında tekrar deneyi yapılmıştır.

Referans beta glukanla optimizasyon sonucu elde edilen beta glukan örneklerinin şekil 5.17'deki FTIR spektrumları karşılaştırıldığında FTIR spektrumlarının benzer olduğu ve

beta glukanı oluşturan beta glikozidik bağının olduğu dalga sayısında pik verdiği görülmektedir.

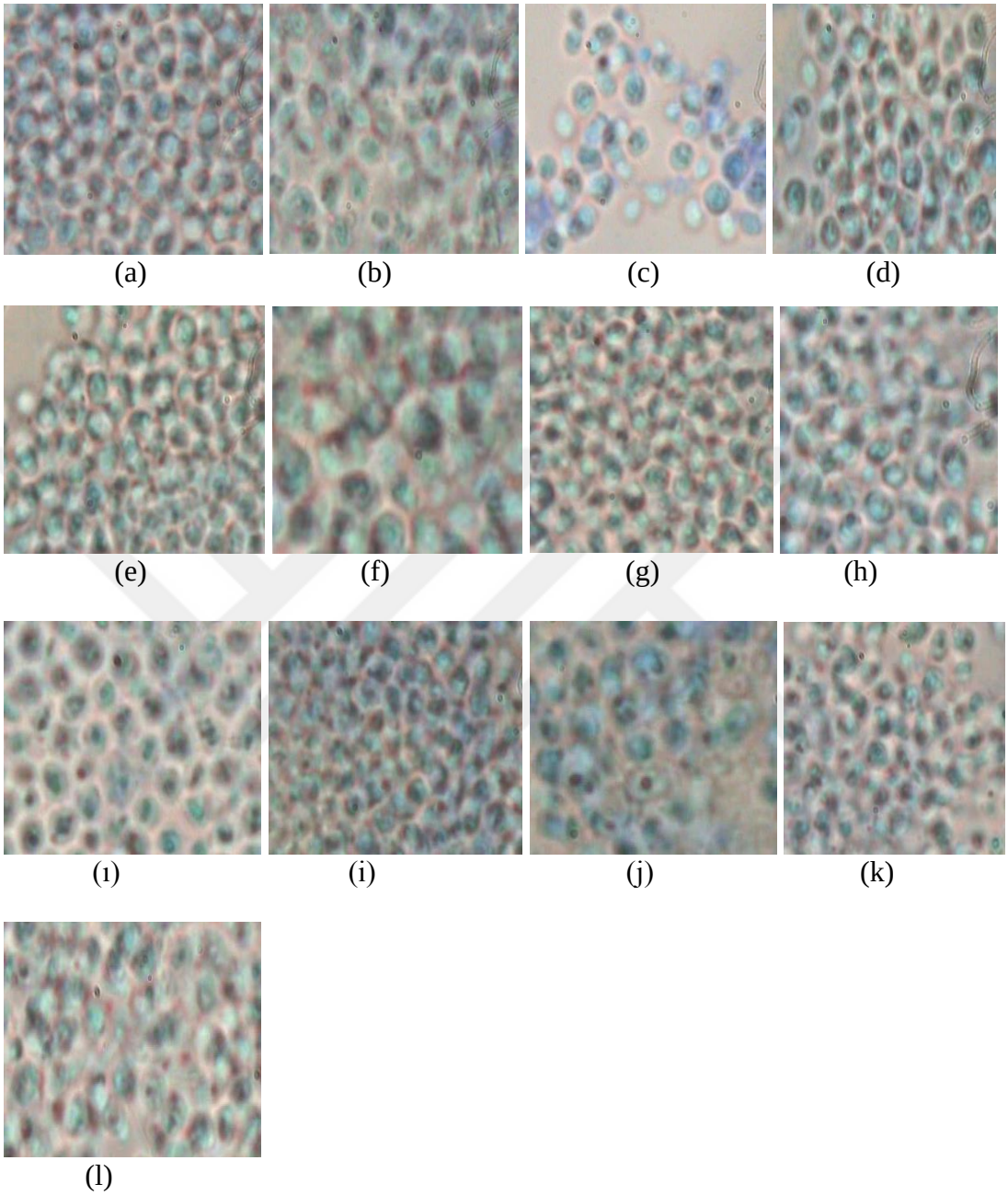


(UDAAEO: Ultrasonik destekli alkali asidik ekstraksiyonun optimizasyonu)

Şekil 5.17 Optimizasyon sonucu elde edilen beta glukanların FTIR spektrumları

Hem referans hem de elde edilen beta glukan örnekleri; protein bölgesinde yaklaşık 1600 - 1750 cm^{-1} dalga sayısı arasında, C-O bağını içeren polisakkarit bölgesinde 980 – 1040 cm^{-1} dalga sayısı arasında, C-H bağının olduğu bölgede 2830 - 2980 cm^{-1} dalga sayısı aralığında ve OH bağının olduğu bölgede yaklaşık 3400 – 3500 cm^{-1} dalga sayısı arasında pik vermiştir. Ayrıca, yaklaşık 2400 cm^{-1} dalga sayısında da ortamın neminden dolayı oluşan karbondioksit pik vermiştir. Şekil 5.17'nin içindeki küçük grafik referansın ve örneklerin sadece beta glikozidik bağını oluşturan C-O bağının pikleri gösterilmiştir.

Farklı ekstraksiyon koşullarından sonraki maya hücrelerinin görüntüleri mikroskopta incelenmiş ve çekilen fotoğraflar şekil 5.18'de gösterilmiştir.



Şekil 5.18 Farklı ekstraksiyon koşullarından sonraki maya hücrelerinin mikroskop görüntüleri

(a): 55°C, 0.008 v/w, 30 dk; (b): 55°C, 0.01 v/w, 60 dk; (c): 55°C, 0.008 v/w, 90 dk; (d): 55°C, 0.006 v/w, 60 dk; (e): 75°C, 0.006 v/w, 30 dk; (f): 75°C, 0.01 v/w, 30 dk; (g): 75°C, 0.008 v/w, 60 dk; (h): 75°C, 0.006 v/w, 90 dk; (ı): 75°C, 0.01 v/w, 90 dk; (i): 95°C, 0.006 v/w, 60 dk; (j): 95°C, 0.008 v/w, 90 dk; (k): 95°C, 0.008 v/w, 30 dk; (l): 95°C, 0.01 v/w, 60 dk

Mayanın hücre duvarının parçalanıp parçalanmadığını gözlemlemek için maya hücrelerinin ultrasonik destekli alkali aşamadan sonraki görüntüleri mikroskopta incelenmiştir. Maya hücreleri trypan blue çözeltisiyle boyanmıştır ve mikroskop altında görüntüleri incelenip fotoğrafları çekilmiştir. Parçalanan hücrelerin duvarları mavi renge boyanır. Yapılan bütün deneylerde hücre duvarının parçalandığı tespit edilmiştir.

5.2.3 Ultrasonik destekli alkali - asidik ekstraksiyonu yönteminin elde edilen optimum koşulların denenmesi

Optimum değerlerle yapılan ultrasonik destekli alkali-asidik ekstraksiyonundan elde edilen beta glukan örneğine yapılan analizlerin sonuçları çizelge 5.9'da verilmiştir.

Çizelge 5.9 Optimum koşullarla yapılan deneyler sonucu elde edilen örneklerin analiz sonuçları

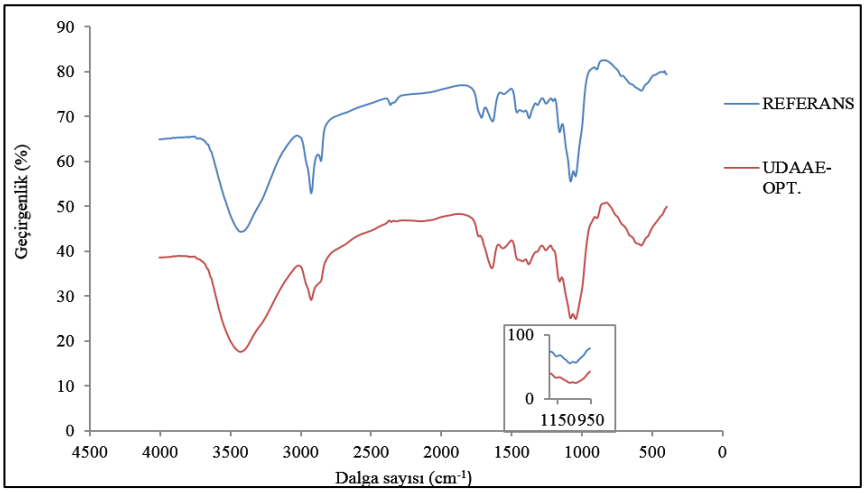
Örnek Adı	Verim (%)	Beta Glukan Saflığı (mg/mL)	Beta Glukan Saflığı (%)	Alkali aşamasından sonra ekstrakte edilen protein derişimi (mg/mL)	Etanolle yıkama aşamasından sonra ekstrakte edilen protein derişimi (mg/mL)
UDAAE – OPT.	12.86	0.422	48.6	4.21	0.169

(UDAAE – OPT.: Ultrasonik destekli alkali-asidik ekstraksiyonunun koşullarının optimum değerleri ile elde edilen örnek)

Mayalardan elde edilen beta glukan verimleri % 8 - 16 arasında değişmektedir. Elde edilen verim bu aralıktadır. Bu istenilen bir durumdur. İstenebilirlik fonksiyonuyla belirlenen optimum değerlerden beklenen yanıtlar sırasıyla verim için % 13.20 ve saflık için 0.454 mg/mL'dir. Deney sonucunda elde ettiğimiz verim ve saflık değerleri birbirine yakındır. Bu durum, hatanın düşük olduğunu ve optimum değerlerin doğru bir yaklaşımla belirlendiğini göstermektedir. Beta glukan saflığı iki farklı analizle bulunmuştur. Bu yöntemler; antron-sülfürik asit analiz yöntemi ve enzimatik beta glukan analizidir. Antron-sülfürik asit analizi glikoz derişimi üzerinden saflık elde

edilirken enzimatik analizde saflık yüzde olarak elde edilmektedir. Enzimatik beta glukan analizinde beta glukanaz enzimleriyle beta glukan saflığını belirlendiği için daha kesin ve doğru sonuçlar elde edilmektedir. Bu sebeple, beta glukan araştırmalarının çoğunda bu yöntem kullanılmaktadır. Antron-sülfürik asit analizi de daha kolay ve çabuk gerçekleştiği için kullanılmaktadır. Beta glukan saflığı enzimatik analizle % 48.6 olarak bulunmuştur. Bu sonuçta elde edilen beta glukanda safsızlıkların olduğunu göstermektedir. Enzimatik analiz yapılırken ölçülen alfa glukanların absorbansları yüksek bulunmuştur. Bu durum, hücre duvarından alfa glukanların tam olarak uzaklaştırılamadığını göstermektedir. Ayrıca, alfa glukan gibi kitin ve proteinlerde hücre duvarından tam olarak ekstrakte edilememiş olabilir. Hücre duvarından proteinlerin ekstrakte edilen miktarları da incelenmiştir. Bu sebeple, hem alkali hem de etanol aşamasından sonra sıvı örnekler alınmıştır ve Bradford yöntemiyle analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarından da görüldüğü üzere alkali aşamadan sonra hücre duvarından protein giderimi daha fazla olmuştur. Çünkü kuvvetli alkali ortamında hücre duvarındaki proteinler daha iyi ekstrakte edilmektedir. Son aşama olan etanolle yıkamada kalan proteinler giderilmiştir. Bu sebeple, derişimi daha düşüktür.

Referans beta glukanla optimum değerler kullanılarak ultrasonik destekli alkali-asidik ekstraksiyonundan elde edilen beta glukan örneğinin şekil 5.19'daki FTIR spektrumları karşılaştırıldığında her iki FTIR spektrumlarının benzer olduğu görülmüştür.



Şekil 5.19 Optimum koşullar kullanılarak elde edilen beta glukanın FTIR spektrumu

Hem referans hem de elde edilen beta glukan örnekleri; protein bölgesinde yaklaşık 1643 cm^{-1} dalga sayısında, C-O bağını içeren polisakkarit bölgesinde 1041 cm^{-1} dalga sayısında, C-H bağının olduğu bölgede 2924 cm^{-1} dalga sayısında ve OH bağının olduğu bölgede yaklaşık 3410 cm^{-1} dalga sayısında pik vermiştir. Şekil 5.19'un içindeki küçük grafik referansın ve örneklerin sadece beta glikozidik bağını oluşturan C-O bağının pikleri gösterilmiştir.

5.3 Otoliz Ultrasonik Destekli Asidik Ekstraksiyonu

5.3.1 Tampon çözeltinin ekstraksiyona etkisi

Elde edilen verimlerin hepsinde beta glukan verimi olması gereken değerden daha yüksek olduğu çizelge 5.10'da görülmekte ve bu durum beta glukan saflıklarını düşük olabileceğini düşündürmektedir.

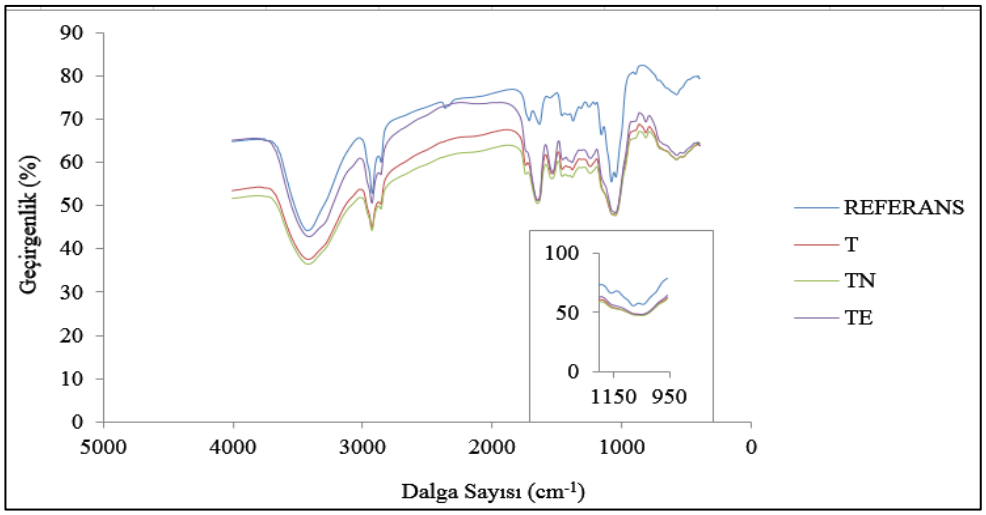
Çizelge 5.10 Farklı tampon çözeltileri kullanılarak otoliz destekli asidik ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen beta glukanların verimleri ve saflıkları

Örnekler	Beta Glukan Verimi (%)	Beta Glukan Saflığı (mg/mL)
T	28.26	0.374
TN	27.04	0.414
TE	31.12	0.348

(T: Sodyum fosfat tamponu; TN: Sodyum klorür içeren sodyum fosfat tamponu; TE: EDTA içeren sodyum fosfat tamponu)

Beta glukan saflıkları incelendiğinde en yüksek değerleri sodyum klorür içeren sodyum fosfat tamponu kullanılarak elde edilen beta glukan örneklerinde elde edilmiştir. Bunun sebebi, sodyum klorürün osmotik basınç değişimiyle mayanın hücre duvarının daha etkili parçalanmasını sağlamış olabildiği düşünülmektedir. Daha sonraki çalışmada bu çözelti kullanılmıştır.

Referans beta glukan ile örneklerin FTIR spektrumları karşılaştırıldığında birbiriyle benzer olduğu görülmüştür (şekil 5.20).



Şekil 5.20 Beta glukanların FTIR spektrumları

Hem referans hem de elde edilen beta glukan örnekleri; protein bölgesinde yaklaşık 1640 - 1770 cm^{-1} dalga sayısı arasında, C-O bağını içeren polisakkarit bölgesinde 1000 - 1050 cm^{-1} dalga sayısı arasında, C-H bağının olduğu bölgede 2924 cm^{-1} dalga sayısı aralığında ve OH bağının olduğu bölgede yaklaşık 3300 – 3400 cm^{-1} dalga sayısı arasında pik vermiştir. Şekil 5.20'nin içindeki küçük grafik referansın ve örneklerin sadece beta glikozidik bağını oluşturan C-O bağının pikleri gösterilmiştir.

5.3.2 Otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu

Beta glukan üretiminde uygulanan otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyon yönteminin koşulları tam faktöriyel istatistiksel deney tasarım yöntemi kullanılarak optimize edilmiştir. Optimizasyon için kullanılan Design Expert programına ekstraksiyon koşullarının minimum ve maksimum değerleri girilerek deneysel tasarım tablosu oluşturulmuştur. Deney numarası sırasına göre deneyler ve analizler yapılmıştır ve beta glukanların verimleri ve saflıkları bulunmuştur (çizelge 5.11).

Çizelge 5.11 Tam faktöriyel istatistiksel deneysel tasarımı ile belirlenen ekstraksiyon koşullarıyla yapılan deneylerin sonuçları

Deney No	Tampon/Katı Oranı (mL/mg)	Otoliz Süresi (st)	Beta Glukan Saflığı (mg/mL)	Beta Glukan Verimi (%)
1	0.01	24	0.160	30.42
2	0.01	48	0.220	28.43
3	0.1	24	0.205	35.29
4	0.1	24	0.125	33.82
5	0.1	48	0.195	31.19
6	0.1	48	0.200	31.01
7	0.055	36	0.070	35.30
8	0.01	24	0.210	26.46
9	0.01	24	0.190	28.03
10	0.055	36	0.095	31.99
11	0.01	48	0.225	25.44
12	0.055	36	0.080	36.25
13	0.1	48	0.225	33.56
14	0.01	48	0.300	24.66
15	0,1	24	0.170	34.15

Tasarım yönteminde faktörler; tampon/katı oranı ve ekstraksiyon süresidir. Tasarım yönteminin yanıtları; beta glukan verimi ve saflığıdır. İki faktörlü, iki seviyeli, iki yanıtlı ve üç tekrarlı deney tasarım matrisi Design Expert paket programında oluşturulmuştur. Beta glucan verimi için yapılan ANOVA istatistiksel analizinin sonuçları çizelge 5.12'deki gibidir.

Çizelge 5.12 Beta glukan verimi için ANOVA tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	df	Ortalama Kare	F - değeri	p - değeri	
Model	121.55	2	60.77	21.41	0.0002	anlamlı
A – Tampon/Katı Oranı	105.49	1	105.49	37.17	< 0.0001	
B – Ekstraksiyon Süresi	16.05	1	16.05	5.66	0.0366	
Eğilme	44.55	1	44.55	15.70	0.0022	
Artık	31.22	11	2.84			
Uyum Eksikliği	0.1045	1	0.1045	0.0336	0.8582	anlamsız
Saf Hata	31.12	10	3.11			
Toplam	197.32	14				

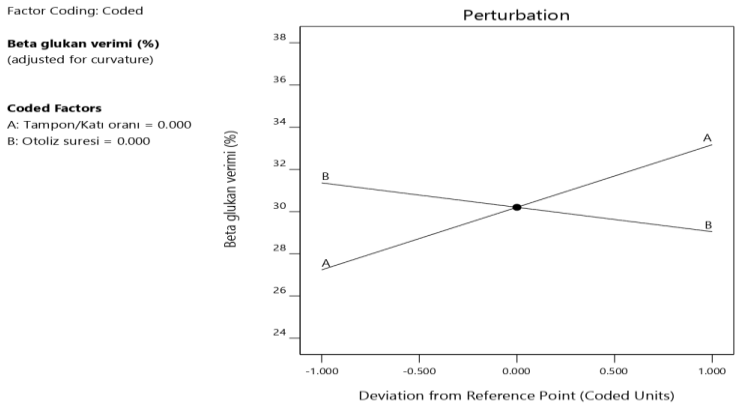
Modelin hem F hem de p değeri modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. A ve B model terimlerinin p değerleri 0.05'ten küçük olduğu için anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, tampon/katı oranı ve otoliz süresi model terimlerinin beta glukan veriminin üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Modelin anlamlı olması seçilen modelin uyumlu ve geçerli olduğunu göstermiştir. Ayrıca, modelin R^2 değeri de 0.7956 olarak bulunmuştur. R^2 değeri 1 değerine pek yakın olmaması regresyon modelinin uyumunun orta olduğunu kanıtlamıştır. Kodlanmış ve gerçek değerler cinsinden yanıt ve faktörlerin arasındaki matematiksel ilişkiyi veren regresyon model denklemleri eşitlik (3.8) ve (3.9)'da verilmiştir.

$$\text{Beta glukan verimi} = 30.21 + 2.97*A - 1.16*B \tag{3.8}$$

$$\text{Beta glukan verimi} = 30.05111 + 65.88889*\text{tampon/katı oranı} - 0.096389*\text{otoliz süresi} \tag{3.9}$$

Beta glukan veriminin kodlanmış faktörlerle oluşturulan denklemi eşitlik 3.8'te verilmiştir. Faktörlerin en düşük kod değeri -1 ve en yüksek kod değeri +1'dir. Faktörlerin gerçek değerleri ile oluşturulan denklem eşitlik 3.9'da verilmiştir. Kodlanmış denklem faktör katsayılarını karşılaştırarak faktörlerin göreceli etkisini tanımlamak için daha kullanışlıdır. Kodlanmış faktörlerle oluşturulan eşitlik 3.8'te de görüldüğü gibi tampon/katı oranının (A) etkisinin beta glukan verimi üzerine etkisi pozitifken otoliz süresi (B) ve tampon/katı oranı ve otoliz süresinin beta glukan verimine etkisi negatiftir.

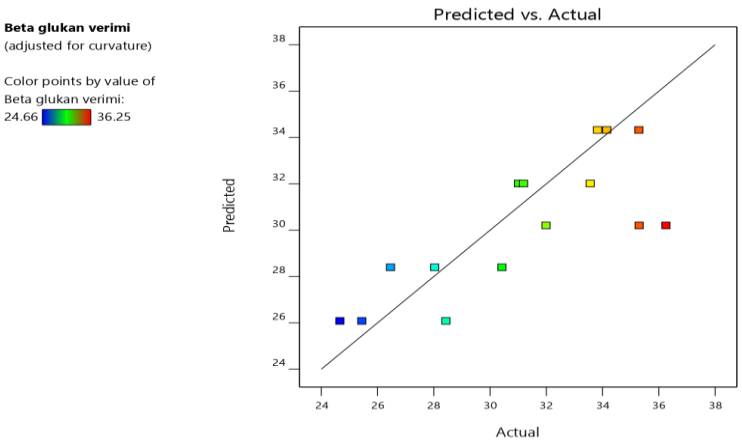
Tasarım alanındaki tüm faktörlerin beta glukan verimine olan etkilerini karşılaştıran pertürbasyon grafiği şekil 5.21'te verilmiştir.



Şekil 5.21 Faktörlerin beta glukan verimi üzerindeki etkisini gösteren pertürbasyon grafiği

Referans noktası merkez nokta olan pertürbasyon grafiği incelendiğinde hem otoliz süresi hem de tampon/katı oranı beta glukan verimi üzerinde etki eden faktörler olduğu görülmektedir. Tampon/katı oranı arttığında beta glukan verimi artarken otoliz süresi arttığında beta glukan veriminin düştüğü görülmüştür.

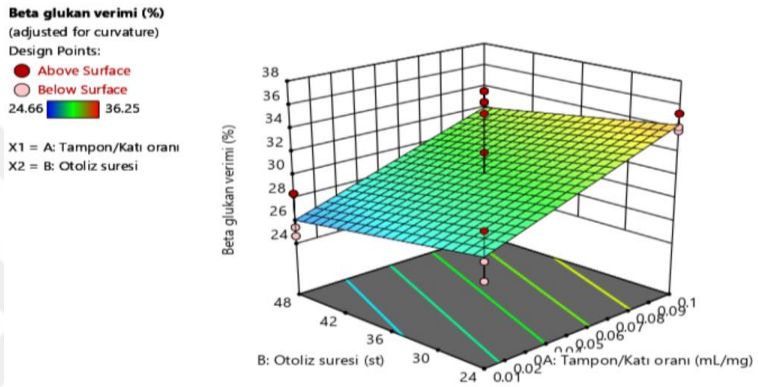
Eşitlik 3.8 kullanılarak beta glukan veriminin tahmini değerleri hesaplanırken beta glukanın gerçek değerleri, deney tasarım koşullarına göre yapılan deneyler sonucunda elde edilmiştir. Bu değerler göre şekil 5.22'deki grafik oluşturulmuştur.



Şekil 5.22 Beta glukan verimlerinin tahmini değerlerine karşı gerçek değerlerinin grafiği

Elde edilen değerler lineer çizgiye ne kadar yakın olurlarsa modelin o kadar uyumlu ve iyi olduğunu göstermektedir. Beta glukan saflığının gerçek değerlerinde bazı noktalar lineerden uzaktadırlar. R^2 değeri 1 değerine yakın olmaması da grafiğin bu şekilde olmasını desteklemektedir.

Otoliz süresinin ve tampon/katı oranın beta glukan verimine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği şekil 5.23'te verilmiştir.



Şekil 5.23 Otoliz süresinin ve tampon /katı oranının beta glukan verimine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri

Her bir ekstraksiyon süresinin ve tampon/katı oranının beta glukan verimi etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği şekil 5.23'te verilmiştir. Grafik incelendiğinde ekstraksiyon süresi 24 dk ve tampon/katı oranı 0.1 v/w olduğunda beta glukan veriminin en yüksek olduğu değer yaklaşık % 34.29' dur.

Beta glukan saflığı için yapılan ANOVA istatistiksel analizinin sonuçları çizelge 5.13'te verilmiştir.

Çizelge 5.13 Beta glukan saflığı için ANOVA tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	df	Ortalama Kare	F - değeri	p - değeri	
Model	0.0106	2	0.0053	6.02	0.0171	anlamlı
A – Tampon/Katı Oranı	0.0029	1	0.0029	3.24	0.0994	
B – Otoliz Süresi	0.0078	1	0.0078	8.80	0.0128	
Eğilme	0.0348	1	0.0348	39.52	< 0.0001	
Artık	0.0097	11	0.0009			
Uyum Eksikliği	0.0004	1	0.0004	0.3772	0.5528	anlamsız
Saf Hata	0.0093	10	0.0009			
Toplam	0.0551	14				

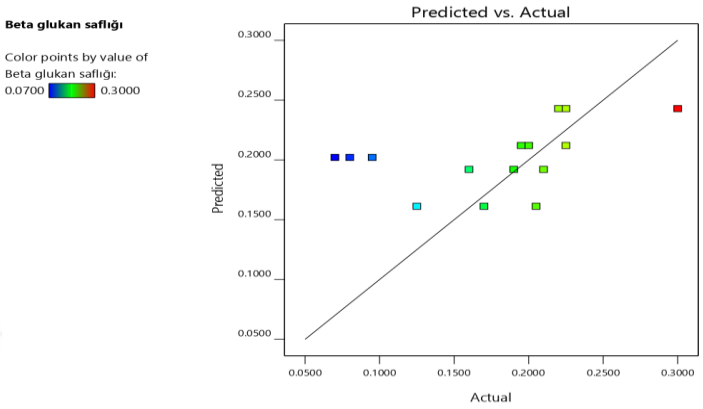
Modelin hem F hem p değeri modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. B model terimlerinin p değerinin 0.05'ten küçük olduğu için anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, ekstraksiyon süresi model teriminin beta glukan saflığı üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Modelin anlamlı olması ve uyum eksikliğinin anlamsız olması seçilen modelin uyumlu ve geçerli olduğunu göstermiştir. Ayrıca, modelin R^2 değeri de 0.5226 olarak bulunmuştur. Kodlanmış ve gerçek değerler cinsinden yanıt ve faktörlerin arasındaki matematiksel ilişkiyi veren regresyon model denklemleri eşitlik (3.10) ve (3.11)'de verilmiştir.

$$\text{Beta glukan saflığı} = 0.2021 - 0.0154*A + 0.0254*B \quad (3.10)$$

$$\text{Beta glukan saflığı} = 0.144676 - 0.342593* \text{ tampon/katı oranı} + 0.002118* \text{ otoliz süresi} \quad (3.11)$$

Eşitlik 3.10'da beta glukan saflığının kodlanmış faktörlerle oluşturulan denklemi verilmiştir. Faktörlerin en düşük kod değeri -1 ve en yüksek kod değeri +1'dir. Eşitlik 3.11'de faktörlerin gerçek değerleri ile oluşturulan denklem verilmiştir. Kodlanmış faktörlerle oluşturulan eşitlik 3.10'da da görüldüğü gibi otoliz süresinin (B) beta glukan saflığı üzerine etkisi pozitifken tampon/katı oranının (A) etkisinin beta glukan saflığına etkisi negatiftir.

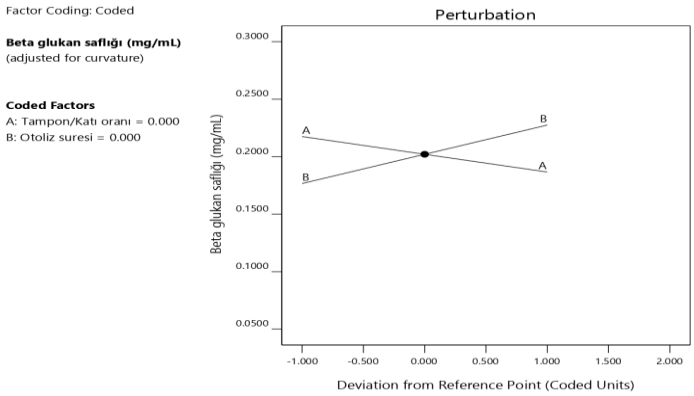
Eşitlik 3.10 kullanılarak beta glukan saflığının tahmini değerleri hesaplanırken beta glukanın gerçek değerleri, deney tasarım koşullarına göre yapılan deneyler sonucunda elde edilmiştir. Bu değerler göre şekil 5.24'teki grafik oluşturulmuştur.



Şekil 5.24 Beta glukan saflığının tahmini değerlerine karşı gerçek değerlerinin grafiği

Elde edilen değerler lineer çizgiye ne kadar yakın olurlarsa modelin o kadar uyumlu ve iyi olduğunu göstermektedir. Beta glukan saflığının gerçek değerlerinde bazı noktalar lineerden biraz uzak olsalar da genel olarak lineer çizginin etrafında toplanmıştır. R^2 değeri 1 değerine yakın olmaması da grafiğin bu şekilde olmasını desteklemektedir.

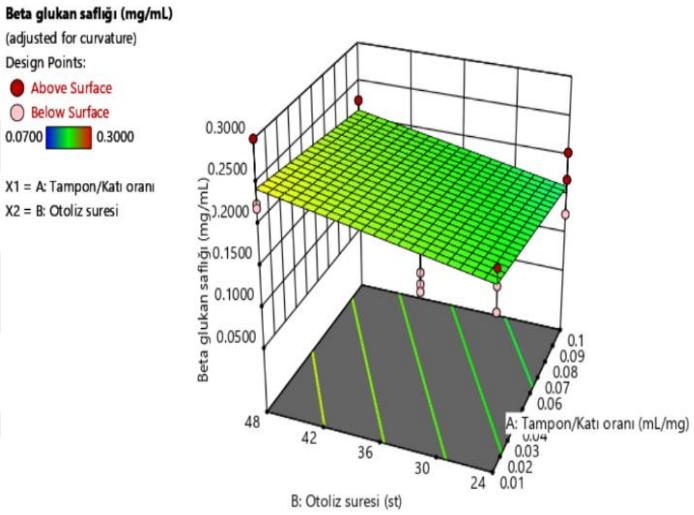
Tasarım alanındaki tüm faktörlerin beta glukan saflığına olana etkilerini karşılaştıran pertürbasyon grafiği şekil 5.25'te verilmiştir.



Şekil 5.25 Faktörlerin beta glukan saflığı üzerindeki etkisini gösteren pertürbasyon grafiği

Referans noktası merkez nokta olan pertürbasyon grafiği incelendiğinde hem ekstraksiyon süresi (A) hem de tampon/katı oranı (A) beta glukan saflığı üzerinde etki eden faktörler olduğu görülmektedir. Tampon/katı oranı arttığında beta glukan saflığı azalırken otoliz süresi arttığında beta glukan saflığının arttığı görülmüştür.

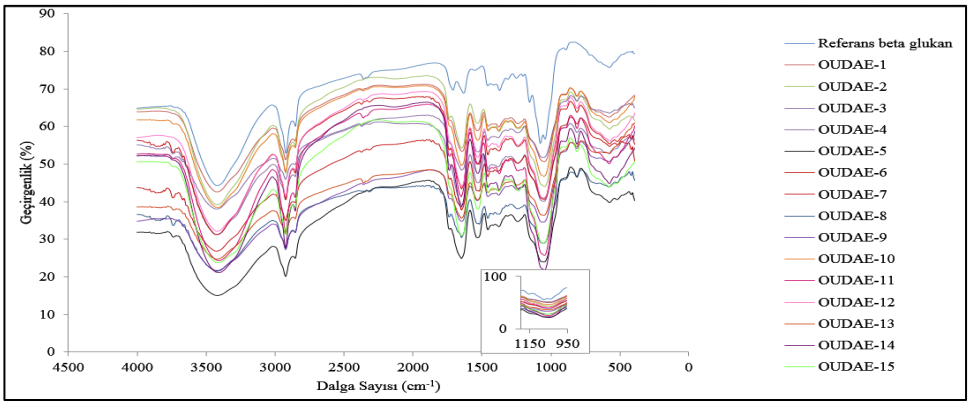
Otoliz süresinin ve tampon/katı oranın beta glukan saflığına etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği şekil 5.26'da verilmiştir.



Şekil 5.26 Otoliz süresinin ve tampon /katı oranının beta glukan saflığına etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği

Grafik incelendiğinde ekstraksiyon süresi 48 dk ve tampon/katı oranı 0.01 v/w olduğunda en yüksek beta glukan saflığı değeri bulunmuştur (yaklaşık 0.24 mg/mL).

Referans beta glukanla optimizasyon sonucu elde edilen beta glukan örneklerinin şekil 5.27'deki FTIR spektrumları karşılaştırıldığında her bir örneğin ve referansın FTIR spektrumlarının benzer olduğu görülmüştür.

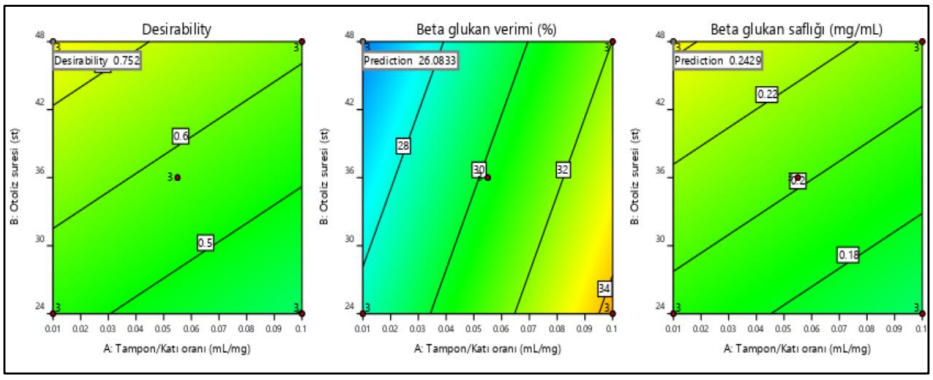


Şekil 5.27 Beta glukan örneklerinin FTIR spektrumları

(OUDAE: Otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyonu)

Hem referans hem de elde edilen beta glukan örnekleri; protein bölgesinde yaklaşık 1620 - 1680 cm^{-1} dalga sayısı arasında, C-O bağını (beta glikozidik bağı) içeren polisakkarit bölgesinde 1000 - 1100 cm^{-1} dalga sayısı arasında, C-H bağının olduğu bölgede 2900 - 2925 cm^{-1} dalga sayısı aralığında ve OH bağının olduğu bölgede yaklaşık 3400 – 3425 cm^{-1} dalga sayısı arasında pik vermiştir. Şekil 5.27'nin içindeki küçük grafik referansın ve örneklerin sadece beta glikozidik bağını oluşturan C-O bağının pikleri gösterilmiştir.

Faktörlerin optimum değerlerini bulmak için her iki yanıtı da birlikte değerlendiren istenebilirlik fonksiyonu kullanılmıştır. Bu fonksiyonla ilgili grafik şekil 5.28'de verilmiştir.



Şekil 5.28 Otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyonun istenebilirlik fonksiyonu yaklaşımıyla optimum değerlerinin belirlenmesi

İstenebilirlik fonksiyonu sayesinde yanıtlar birlikte değerlendirilerek ekstraksiyonun her iki yanıt için de ortak optimum değerleri belirlenmiştir. Bu fonksiyon kullanılırken beta glukan saflığı verimden daha önemli olduğu için saflığın maksimize edilmesi verimin belli bir aralıkta olması seçenekleri seçilerek bu değerler elde edilmiştir. Bu fonksiyon kullanılarak elde edilen optimum değerlerin 0.01 v/w tampon/katı oranı ve 48 st otoliz süresi olduğu tespit edilmiştir. Bu koşullarda deney yapıldığında olası yanıtlar sırasıyla verim için % 26.083 ve saflık için 0.243 mg/mL'dir. Bu değerlerde tekrar deney yapılmıştır.

5.3.3 Otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyonu yönteminin elde edilen optimum koşullarının denenmesi

Optimum değerlerle yapılan otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyonundan elde edilen beta glukan örneğine yapılan analizlerin sonuçları çizelge 5.14'te verilmiştir.

Çizelge 5.14 Optimum koşullarla yapılan deneyler sonucu elde edilen örneklerin analiz sonuçları

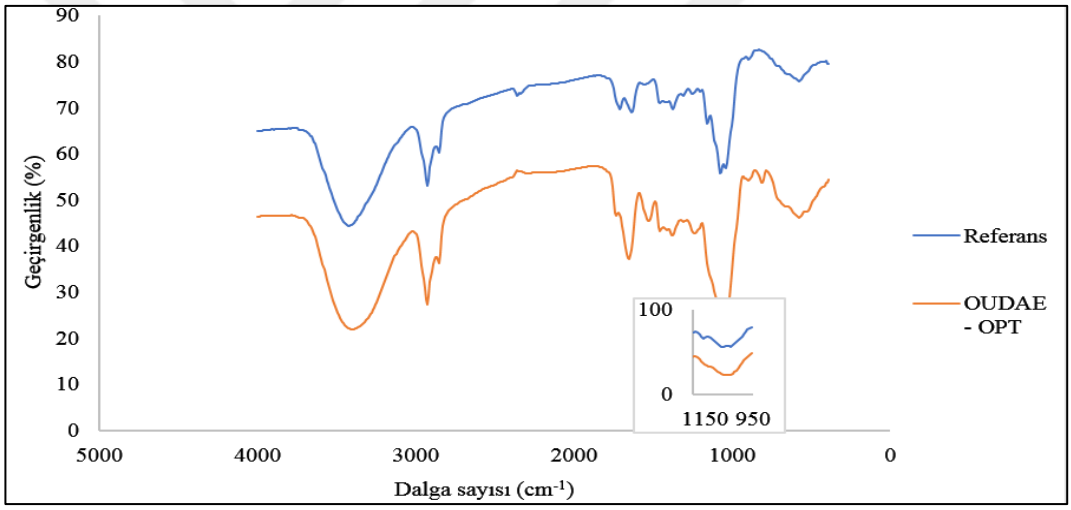
Örnek Adı	Beta Glukan Verimi (%)	Beta Glukan Saflığı (mg/mL)	Beta Glukan Saflığı (%)	Otoliz aşamasından sonra ekstrakte edilen protein derişimi (mg/mL)	Etanolle yıkama aşamasından sonra ekstrakte edilen protein derişimi (mg/mL)
OUDAE – OPT.	28.34	0.257	15.4	0.222	0.071

(OUDAE – OPT.: Otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyonunun koşullarının optimum değerleri ile elde edilen örnek)

Mayalardan elde edilen beta glukan verimleri % 8 – 16 arasında değişmektedir. Elde edilen verim bu aralıkta değildir. Bu durum, beta glukanın saflığının düşük olduğunu göstermektedir ve beta glukan saflık sonuçları da bu durumu desteklemektedir. İstenebilirlik fonksiyonuyla belirlenen optimum değerlerden beklenen yanıtlar sırasıyla verim için % 26.2 g ve saflık için 0.243 mg/mL'dir. Deney sonucunda elde ettiğimiz verim ve saflık değerleri birbirine yakındır. Teorik ve deneysel verim ve saflık sonuçları da birbirine yakındır. Bu durumda, hatanın düşük olduğunu ve optimum değerlerin doğru bir yaklaşımla belirlendiğini göstermektedir. Beta glukan saflığı iki farklı analizle

bulunmuştur. Bu yöntemler; antron-sülfürik asit analiz yöntemi ve enzimatik beta glukan analizidir. Beta glukan saflığı enzimatik analizle % 15.4 olarak bulunmuştur. Bu sonuçta elde edilen beta glukanda safsızlıkların yüksek olduğunu göstermektedir. Bu durum, hücre duvarından safsızlıkların iyi uzaklaştırılamadığını göstermektedir. Hücre duvarından proteinlerin ekstrakte edilen miktarları da incelenmiştir. Bu sebeple, hem otoliz hem de etanol aşamasından sonra sıvı örnekler alınmıştır ve Bradford yöntemiyle analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarından da görüldüğü üzere otoliz aşamasından sonra hücre duvarından protein giderimi daha fazla olmuştur.

Referans beta glukanla optimum değerlerle yapılan tekrar deneyi sonucu elde edilen beta glukan örneklerinin şekil 5.29'daki FTIR spektrumları karşılaştırıldığında her bir örnek ve referans beta glukanın FTIR spektrumlarının benzer olduğu görülmüştür.



Şekil 5.29 Beta glukan örneklerinin FTIR spekturumları

Hem referans hem de elde edilen beta glukan örneğinde sırasıyla protein bölgesinde yaklaşık 1651 cm^{-1} dalga sayısında, C-O bağını (beta glikozidik bağı) içeren polisakkarit bölgesinde 1049 cm^{-1} dalga sayısında, C-H bağının olduğu bölgede 2924 cm^{-1} dalga sayısında ve OH bağının olduğu bölgede yaklaşık 3410 – 3379 cm^{-1} dalga sayında pik vermiştir.

5.4 Soxhlet ekstraksiyonu

Soxhlet ekstraksiyon süresinin değişmesinin beta glukan üretimi üzerindeki etkilerini incelemek için yapılan deneyde elde edilen analiz sonuçları ve verimler çizelge 5.15'te verilmiştir.

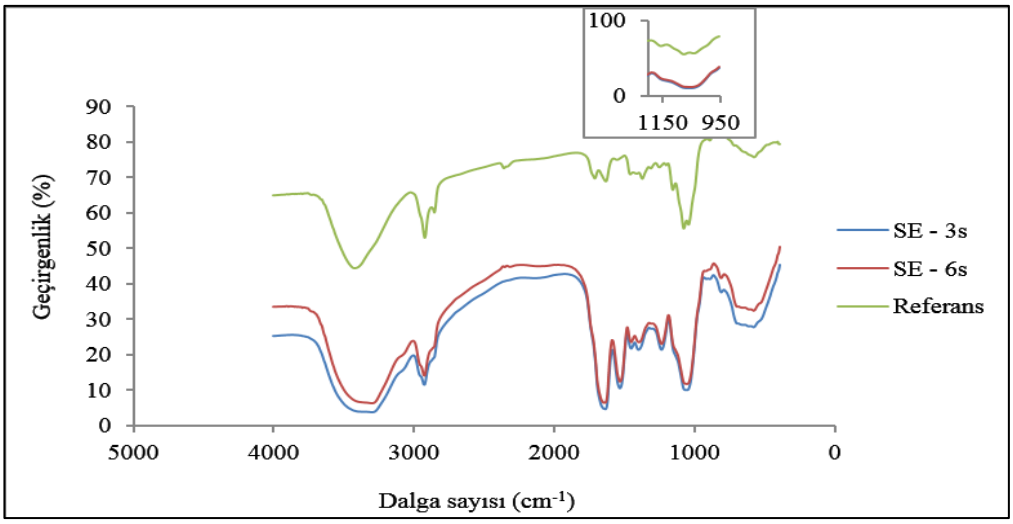
Çizelge 5.15 Farklı ekstraksiyon süreleri ile yapılan Soxhlet ekstraksiyonundan elde edilen örneklerin analiz sonuçları

Örnek Adı	Beta Glukan Verimi (%)	Beta glukan saflığı (mg/mL)	Beta glukan saflığı (%)	Alkali aşamasından sonra ekstrakte edilen protein derişimi (mg/mL)	Etanolle yıkama aşamasından sonra ekstrakte edilen protein derişimi (mg/mL)
SE – 3 s	52.33	0.119	8.1	0.560	0.203
SE – 6 s	49.15	0.134	9.2	0.664	0.211

(SE – 3s: 3 saat ekstraksiyon süresi ile yapılan Soxhlet ekstraksiyonundan elde edilen örnek; SE – 6s: 3 saat ekstraksiyon süresi ile yapılan Soxhlet ekstraksiyonundan elde edilen örnek)

Beta glukan verimleri her iki yöntemde de % 8 – 16 değerleri arasından fazla çıkmıştır. Bu durumda, beta glukan örneklerinin saflıklarının düşük olduğu anlamına gelmektedir ki beta glukan saflıklarını belirlemek için yapılan antron-sülfürik asit analizi ve enzimatik beta glukan analizi sonuçları bu görüşü desteklemektedir. Çevrim sayısı değiştikçe ekstraksiyon süresi de değişecektir. Ekstraksiyon süresi 3 saat ve 6 saat olduğunda elde edilen beta glukanların analiz sonuçları birbirine yakın olduğu için ekstraksiyon süresi dolayısıyla çevrim sayısının değişiminin beta glukan üretiminde anlamlı bir etkisi olmadığı anlaşılmıştır. Bradford yöntemiyle elde edilen analiz sonuçlarına göre alkali aşamadan sonra giderilen proteinin derişimi etanolle yıkama aşamasından sonra giderilen protein derişiminden daha yüksek bulunmuştur.

Referans beta glukanla farklı ekstraksiyon süreleri ile yapılan Soxhlet ekstraksiyonundan elde edilen örneklerin FTIR spektrumlarının benzer olduğu görülmüştür (şekil 5.30).



(SE – 3s: 3 saat ekstraksiyon süresi ile yapılan Soxhlet ekstraksiyonundan elde edilen örnek; SE – 6s: 3 saat ekstraksiyon süresi ile yapılan Soxhlet ekstraksiyonundan elde edilen örnek)

Şekil 5.30 Beta glukan örneklerinin FTIR spektrumları

Hem referans hem de elde edilen beta glukan örnekler protein bölgesinde yaklaşık 1630 - 1651 cm^{-1} dalga sayısı arasında, C-O bağını (beta glikozidik bağı) içeren polisakkarit bölgesinde 1049 cm^{-1} dalga sayısında, C-H bağının olduğu bölgede 2924 cm^{-1} dalga sayısında ve OH bağının olduğu bölgede yaklaşık 3350 – 3420 cm^{-1} dalga sayısı arasında pik vermiştir.

5.5 Ekstraksiyon Yöntemlerinin Molekül Kütlesine Etkisi

Ultrasonik destekli alkali asidik ekstraksiyon yönteminin ve otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyon yönteminin optimum koşullarında elde edilen beta glukan örneklerinin molekül kütleleri ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda statik ışık saçılımı analiziyle ölçülmüş ve hesaplanmıştır. Örnekler 30 ile 150 derece arasında 10'ar derecelik farkla, her açıda ölçüm süresi 10 saniye olacak şekilde 3'er tekrarla çalışılmıştır. Analiz sonuçları çizelge 5.16'da verilmiştir.

Çizelge 5.16 Beta glukan örneklerinin statik ışık saçılımı analiz sonuçları

Örnek Adı	M_w (kDa)	A_2 (mol/dm^3/g^2)	Rg (nm)	dn/dc (mL/g)
UAAE	62.66 (± 31.7 %)	1.486 x 10^{-8} (± 541 %)	137.8 (± 5.9e-14 %)	0.110
OUDAE	531.2 (± 2.77 %)	4.638 x 10^{-8} (± 3.45 %)	147.1 (± 0.38 %)	0.073
SE – 3s	124.2 (± 10.2 %)	-1.909 x 10^{-8} (± 78.3 %)	150.1 (± 5.7e-14 %)	0.107
SE – 6s	96.23 (± 5.85 %)	6.675 x 10^{-8} (± 17.7 %)	165.5 (± 0.064 %)	0.213

Örneklerin kırılma indisleri dn/dc, dönme yarıçapları Rg, ikinci viral katsayısıları A_2 ve M_W molekül kütleleridir. Örneklerin molekül kütleleri incelendiğinde en yüksek molekül kütlesi otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyonu ile elde edilen beta glukan örneğinde (531.2 kDa) en düşük molekül kütlesi ise ultrasonik destekli alkali asidik ekstraksiyonu ile elde edilen beta glukan örneğinde (62.66 kDa) bulunmuştur. Bu durum, sodyum hidroksit çözeltisinin beta glukanı da parçaladığını göstermektedir. Çünkü, ultrasonik destekli alkali asidik ekstraksiyonu ve Soxhlet ekstraksiyonu yöntemlerinde çözücü olarak sodyum hidroksit kullanılmıştır. Otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyonunda sodyum klorür içeren sodyum fosfat tamponu kullanılmıştır. Soxhlet ekstraksiyonunda mayayla çözücü tam olarak temas edemediği için UDAAE ile elde edilen beta glukanın kütlesinden daha yüksek bulunduğu tahmin edilmektedir.

6. SONUÇ

Bağışıklık sistemimizi kuvvetlendirerek günlük yaşamımızı daha da kolaylaştıran beta glukanın gıda takviyesi olarak hem tek başına kullanıldığında hem de ilaçlarla birlikte kullanıldığında yan etkisinin olmaması, çevre dostu ve toksik olmaması, elde edildiği kaynağa göre özelliklerinin değişmesinden dolayı farklı birçok alanda kullanım alanının olması, atık ürünlerden de elde edilebilmesi (atık arpa, bira veya ekmek mayası vb.) ve biyolojik kaynaklardan üretildiği için araştırmacıların dikkatini çekmekte ve her geçen gün beta glukanla ilgili yeni çalışmalar yapılmakta ve yeni kullanım alanları keşfedilmektedir.

Beta glukanın saflığını, verimini ve molekül kütlesini kaynaktan beta glukan eldesinde kullanılan ekstraksiyon yönteminin değiştirdiği bilgisi temelinde bu tez çalışmasında *S. cerevisiae* mayasından beta glukan eldesinde ekonomik ve uygulaması kolay olan farklı ekstraksiyon yöntemleri belirlenmiş ve ekstraksiyon koşulları istatistiksel deneysel tasarımlar kullanılarak optimize edilmiştir. Bu ekstraksiyon yöntemleri beta glukan verimi ve saflığı üzerine değerlendirilmiştir.

Yapılan ön çalışmalarla kullanılacak ekstraksiyon yöntemleri belirlenmiş ve bu yöntemlerden elde edilen beta glukanların yaklaşık olarak molekül kütleleri bulunarak ekstraksiyonun molekül kütlesine etkisi kanıtlanmıştır. Mayanın kuru veya yaş olmasının etkisine bakılarak ileriki çalışmalarda verim açısından daha doğru sonuçlar verdiği için kuru mayayla çalışılmıştır. Tez çalışmasına laboratuvarda mayayı çoğaltıp beta glukan ekstrakte edilse de yeterli miktarda maya üretimi ve kurutulmasını sağlayacak alt yapı olmadığı için ön çalışmalardan sonra deneylerde kaynak olarak ticari maya (Pak maya) kullanılmıştır.

Üç farklı ekstraksiyon yöntemi belirlenmiştir. Bu yöntemlerin ilki ultrasonik destekli alkali – asidik ekstraksiyonudur. Bu yöntem, beta glukan kaynaklarından beta glukan eldesinde çok kullanılmaktadır. Ultrasonik dalgalarla mayanın hücre duvarı parçalanırken alkali çözücülerle hücre duvarı bileşenleri ekstrakte edilmektedir.

Ekstraksiyon yönteminin alkali kısmında genellikle kuvvetli bazlar kullanılmakta ve bu kullanım çevreye zarar vermektedir. Bu sebeple, zayıf, orta ve kuvvetli bazların farklı pH değerlerinde beta glukan elde edilmiştir. Ancak, beta glukan saflıklarına ve verimlerine bakıldığında en yüksek değeri kuvvetli baz olan sodyum hidroksit çözeltisi kullanımında bulunmuştur. Literatür araştırmalarıyla belirlenen ekstraksiyon koşulları (ekstraksiyon sıcaklığı, süresi ve çözücü/katı oranı) Box – Behnken deneysel tasarımıyla optimize edilmiştir. İstenebilirlik fonksiyonuyla her iki yanıt birlikte değerlendirilip ekstraksiyonun optimum koşulları belirlenmiştir. Değerlendirilirken beta glukan verimi yapılan deneyler sonucunda elde edilen verim aralığında beta glukan saflığı ise maksimum olacak şekilde ayarlanmıştır. Ekstraksiyonun optimum koşulları 0.007 v/w, 95°C ve 30 dk; yanıtları ise beta glukan verimi % 13.184 ve beta glukan saflığı 0.454 mg/mL olarak bulunmuştur. Belirlenen optimum koşullarda tekrar deneyi yapılmıştır. Optimum koşullarda beta glukan verimi % 12.86 ve 0.422 mg/mL ve % 48.6 beta glukan saflıkları bulunmuştur. Verim olması gereken aralıkta olmasına rağmen (% 8-16) saflık beklenilenden düşük elde edilmiştir. Bu durum, hücre duvarındaki alfa glukanın, kitinin ve proteinlerin tam olarak giderilemediğini göstermiştir. Teorik ve deneysel verim ve saflık sonuçları da birbirine yakın olduğu için optimum değerlerin doğru bir yaklaşımla belirlendiği teyit edilmiştir.

Mayadan beta glukan eldesinde ikinci kullanılan yöntem otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyonudur. Bu ekstraksiyonda iki tane hücre duvarı parçalama yöntemi kullanılmıştır: otoliz ve sonikasyon. Alkali çözeltiler yerine tampon çözeltisi kullanıldığı için çevreye daha yararlı bir yöntemdir. Bu yöntemin önemli aşaması olan otolizin tampon çözeltisi belirlenmiştir. Katkı maddeli (NaCl ve EDTA) ve katkı maddesi ilavesiz tampon çözeltisiyle deney yapılmış ve en iyi verim ve saflığı sodyum klorür içeren sodyum fosfat tampon çözeltisi vermiştir. Bunun sebebi de sodyum klorürün hücreler üzerinde etkili olan osmatik basınçtan geldiği düşünülmektedir. Otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyon yönteminin koşulları (tampon/katı oranı ve otoliz süresi) iki seviyeli tam faktöriyel deneysel tasarımla optimize edilmiştir. İstenebilirlik fonksiyonuyla beta glukan verimi ve saflığı birlikte değerlendirilip ekstraksiyonun optimum koşulları belirlenmiştir. Değerlendirilirken beta glukan verimi yapılan deneyler sonucunda elde edilen verim aralığında beta glukan saflığı ise maksimum

olacak şekilde ayarlanmıştır. Optimum koşullar 48 st ve 0.01 tampon/katı oranı; yanıtları ise beta glukan verimi % 26.083 ve beta glukan saflığı 0.243 mg/mL olarak bulunmuştur. Bu koşullarda tekrar deneyi yapılmıştır. Beta glukan verimi % 28.34; beta glukan saflıkları ise % 15.4 ve 0.257 mg/mL bulunmuştur. Teorik ve deneysel verim ve saflık sonuçları da birbirine yakın olduğu için optimum değerlerin doğru bir yaklaşımla belirlendiği teyit edilmiştir.

Soxhlet ekstraksiyonu geleneksel yöntemlerden biridir ve tez kapsamında beta glukan eldesinde üçüncü olarak kullanılan yöntemdir. Bu yöntemle literatürde mayadan beta glukan eldesinde kullanılmamıştır. Bu sebeple, bu yöntem seçilmiştir. Burada ekstraksiyon yöntemini en çok etkileyen parametrelerden biri olan ekstraksiyon süresi tek faktörlü deneysel tasarımla optimize edilmiştir. Bu kapsamda, 3 st ve 6 st denemiştir. Bulunan sonuçlara göre iki farklı sürenin beta glukan verimi ve saflığı yakın bulunmuştur. Ekstraksiyon süresi 6 saat olan beta glukan örneğinin saflığı diğer örneğe göre daha iyi bulunmuştur. Bu koşulda elde edilen beta glukan verimi % 49.15 ve beta glukan saflığı 0.134 mg/mL ve % 9.2 olarak elde edilmiştir. Ekstraksiyon süresinin çok etkisi olmadığı ya da daha yüksek süreler çalışılarak denemesi gerektiği sonucu çıkarılabilir.

Ultrasonik destekli alkali asidik ekstraksiyonunda elde edilen beta glukan verimi, saflığı ve giderilen protein derişimleri diğer iki ekstraksiyon yöntemine göre daha yüksek bulunmuştur. Bunun sebebi, Soxhlet ekstraksiyonunda ultrasonik gibi hücre duvarı parçalama yönteminin uygulanamadığı için etkin hücre duvarı parçalamasının olmaması, mayanın ekstraksiyon kartuşu içinde olduğu için çözücünün katı malzemeyle tam olarak temas edememesi ve mayanın kartuşta yığın halinde bulunmasından dolayı yüzey alanının geniş olmamasıdır. Otoliz ultrasonik asidik ekstraksiyonunda da otoliz işleminde hücrenin parçalayıcı enzimlerinin tam aktifleşememesi, tampon çözeltinin yeterli olamaması ultrasonik destekli alkali asidik ekstraksiyon yönteminden daha düşük sonuçlar elde edilmesine sebep olabilir. Ultrasonik aşamadan sonra otoliz yapılması daha etkili olabilir. Yapılan analizler sonucu elde edilen beta glukan saflığı ve giderilen protein derişimleri ve elde edilen beta glukan verimleri yüksek olması, uygulaması daha kolay, ekstraksiyon süresinin kısa olmasından dolayı üç yöntem arasında en iyi yöntem

ultrasonik destekli alkali asidik ekstraksiyon yöntemi seçilmiştir. Dolayısıyla en iyi optimum koşullar 0.007 v/w, 95°C ve 30 dk; en iyi sonuçlar ise % 12.86 beta glukan verimi ve % 48.6 ve 0.422 mg/mL beta glukan saflıklarıdır.

İki farklı ekstraksiyon yöntemlerinin optimum ekstraksiyon koşullarında elde edilen beta glukan örnekleri ile Soxhlet ekstraksiyon yönteminin iki farklı ekstraksiyon süresiyle elde edilen beta glukan örneklerinin molekül kütleleri ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda SLS yöntemi kullanılarak analiz ettirilmiştir. Sodyum hidroksitin beta glukanı da parçalama ihtimalinden dolayı en düşük molekül kütlesi (62.66 kDa) ultrasonik destekli alkali asidik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen beta glukan için bulunurken en yüksek molekül kütlesi (531.2 kDa) otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen beta glukan için bulunmuştur. Mayadan elde edilen beta glukanın kullanım alanlarında çoğunlukla beta glukanın suda çözünebilmesi istendiği için diğer ekstraksiyon yöntemlerine göre daha düşük molekül kütlesine sahip beta glukan elde edilen ultrasonik destekli alkali asidik ekstraksiyon yöntemini tercih etmek daha mantıklı olacaktır.

Tez kapsamında ön çalışmalarda ilk molekül kütlesi deneyleri Ubbelohde yöntemi kullanılarak yapılmıştır ve mayadan elde edilen beta glukan için Mark-Houwing katsayıları bulunmadığı için bu tür beta glukanın dallanma yapısına en çok benzeyen selüloz nitratın katsayıları kullanılarak beta glukanların yaklaşık değerleri bulunmuştur. Bu yöntemle SLS yöntemiyle elde edilen beta glukan molekül kütleleri karşılaştırıldığında en yüksek ve en düşük beta glukan molekül kütleleri tam tersi ekstraksiyon yöntemlerinde elde edildiği tespit edilmiştir. Bir başka deyişle, Ubbelohde yöntemi ile en yüksek molekül kütlesi (113.2 kDa) ultrasonik destekli alkali asidik ekstraksiyonu ile elde edilen beta glukan için bulunurken SLS yöntemi ile en yüksek molekül kütlesi (531.2 kDa) otoliz ultrasonik destekli asidik ekstraksiyonu ile elde edilen beta glukan için elde edilmiştir. Bu durumda, SLS yöntemi daha doğru ve kesin sonuç veren yöntem olduğu için bu yöntemin sonuçları dikkate alınmıştır ve Ubbelohde yönteminde selüloz nitratın Mark-Houwing katsayılarının kullanılmaması gerektiği sonucuna varılmıştır. Bunların yanı sıra, kullanılan mayanın farklı olması (ticari ya da

laboratuvarda üretilen), ekstraksiyon koşullarının farklı olması da etkili olmuş olabilmektedir.

Literatürde beta glukan ekstraksiyonun istatistiksel deneysel tasarımlarla optimizasyonun az olması, özellikle mayalardan beta glukan eldesinde kullanılan ekstraksiyon yöntemlerinin koşullarının optimizasyonunda Box – Behnken deneysel tasarımının kullanılmaması, Soxhlet ekstraksiyon yönteminin mayalardan beta glukan eldesinde kullanılmaması ve *S. cerevisiae* mayasından beta glukan eldesinde bu şekilde kapsamlı bir çalışma yapılmamasından dolayı bu tez çalışmasının özgün tarafı olup literatüre birçok yenilik katacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abbas, A. K. ve Lichtman, A. H. 2007. Temel Ümmünoloji –İmmün sistemin işlev ve bozuklukları. Çeviri Ed. Camcıoğlu Y, Deniz G. 1. Baskı. İstanbul, İstanbul Medikal Yayıncılık, 21-39.

Adachi, M., Kowhakul, W., Masamoto, H. and Shigematsu, M. 2013. Bioactivities of β-Glucan and Tannin Extracted with Superheated Water by Using a Macchinetta Extractor. 4th International Conference on Biology, Environment and Chemistry (IPCBEE), Vol 58, 15, Singapore.

Akkuş, M. S. ve Karabudak S. 2020. Biyoproses Çalışmalarında Deneysel Tasarım Yönteminin Uygulanması. İleri Mühendislik Çalışmaları ve Teknolojileri Dergisi, 1(2), 188-197.

Ali, S. H. 2009. The world of β-a review of biological roles, applications and potential areas of research. Tromso University Institute of Medical Biology, Master Thesis,1-45.

Alzorqi I., Sudheer S., Lu T.-J. ve Manickam S. 2017. Ultrasonically extracted β-D-glucan from artificially cultivated mushroom, characteristic properties and antioxidant activity. Ultrasonics Sonochemistry, 35, 531 – 540.

Amaral, E. A., Carbonero, E., R., de Cassia G. Simao, R., Kadowaki, M., K., Sassaki, G., L., Osaku, C., A., Gorin, P., A., J. ve Iacomini M. 2008. An unusual water-soluble b-glucan from the basidiocarp of the fungus *Ganoderma resinaceum*, Carbohydrate Polymers, 72, 473–478.

Anonim 2021a. Web Sitesi: file:///C:/Users/ts/Downloads/1.Hafta%20(1).pdf Erişim Tarihi: 15.06.2021

Anonymous 2020a. Web Sitesi: https://www.betaglucan.org/history/ Erişim tarihi: 15.05.2020

Anonymous 2020b. Web Sitesi: http://www.efsa.europa.eu/ Erişim tarihi: 15.05.2020

Anonymous 2020c. Web Sitesi: https://glycanova.com/beta-glucan-dosage/ Erişim tarihi: 16.05.2020

Anonymous 2020d. Web Sitesi: https://www.marketdataforecast.com/ market-reports/ beta-glucan-market Erişim tarihi: 18.05.2020

Anonymous 2020e. Web Sitesi: http://www.beta-glucan-info.com/test_results_ comparison.htm Erişim tarihi: 17.05.2020

Anonymous 2021f. Web Sitesi: http://epgp.inflibnet.ac.in/epgpdata/uploads/epgp_content/food_technology/16.advances_in_food_science_&_technology/24.beta_glucan__properties_and__health_benefits/et/ 2715_et_et.pdf Erişim tarihi: 17.05.2021

Anonymous 2021g. Web Sitesi: https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri3346.htm Erişim Tarihi: 15.06.2021

Bacic, A., Fincher, G. and Stone, B. 2009. Chemistry, Biochemistry and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides. Academic Press. USA.

Bai, J., Ren, Y., Li, Y., Fan, M., Qian, H., Wang, L., Wu, G., Zhang, H., Qi, X., Xu, M., ve Rao, Z. 2019. Physiological functionalities and mechanisms of β-glucans. Trends in Food Science & Technology, 88, 57 – 66.

Bardakçı, Ö. 2017. Bazı Sentetik Antioksidanların 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürme Kapasitesi Yöntemi ile Antioksidan Aktivitelerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ve Toksikoloji (Veteriner) Yüksek Lisans Programı, 58, Aydın.

Baschong, W., Monglat, S. and Ochs, D. 2009. Glucan compositions. US patent 0156563 A1.

Bayer, V. M. L., Francisco, A., Chan, A., Oro, T., Ogliari, P. J. and Barreto, P. L. M. 2014. Barley β-glukans extraction and partial characterization. Food chemistry, 154, 84- 89.

Becker, J., Caldwell, G. A. ve Zachgo, E., A. 1996. Biotechnology A Laboratory Course.Elsevier, 261, ABD

Beer, M., U., Peter, J., W., Weisz, J., ve Fillion, N. 1997. Effect of Cooking and Storage on the Amount and Molecular Weight of (1→3) (1→4)-β-D-Glucan Extracted from Oat Products by an In Vitro Digestion System[1]. Cereal Chemistry, 74(6), 707 – 709.

Bettelheim, F. A., Brown, W. H., Campbell, M. K., Farrell, S. O. and Torres, O. J. 2013. Introduction to Organic and Biochemistry. Brooks/Cole, Cengage Learning, 267-268, USA.

Brennan, C., S., ve Cleary, L., J. 2005. The potential of cereal (1→3, 1→4)-β-d-glucans as functional food ingredients. Journal of Cereal Science, 42(1), 1 – 13.

Buyuktuncel, S., E. 2012. Gelişmiş Ekstraksiyon Teknikleri I. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 32(2), 209 - 242.

Bzducha-Wrobel, A., Balzejak, S., Kawarska, A., Stasiak,-Rozanska, L., Gientka, I., ve Majewska, E. 2014. Evaluation of the Efficiency of Different Disruption Methods
on Yeast Cell Wall Preparation for β-Glucan Isolation. Molecules, 19(12), 20941 – 20961.

Chen, S. N. 2014. Composite glucan and method for preparing the same. US patent 20140031542 A1.

Cui, R., ve Zhu, F. 2021. Ultrasound modified polysaccharides: A review of structure,

physicochemical properties, biological activities and food applications. Trends in Food Science & Technology, 107, 491 – 508.

De Castro, M. D. L. ve Priego-Capote, F. 2010. Soxhlet extraction: Past and present panacea. Journal of Chromatography A, 1217, 2383 – 2389.

Değirmencioğlu, A. ve Yazgı, A. 2006. Tepki Yüzeyleri Metodolojisi'' Optimizasyon Esaslı Çalışmalara İlişkin Teorik Esaslar ve Tarımsal Mekanizasyon Uygulamaları''. Tarım Makinaları Bilim Dergisi, 2(2), 111 – 115.

Delibaş, N. ve Özcankaya, R. 1995. Serbest Radikaller. SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi, 2(3), 11-17.

Dimopoulos, G., Tsantes, M., ve Taoukis, P. 2020. Effect of high pressure homogenization on the production of yeast extract via autolysis and beta-glucan recovery. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 62, 102340.

Du, B., Zhu, F. and Xu, B. 2014. β-Glucan extraction from bran of hull-less barley by accelarated solvent extraction combined with response surface methodology. Journal of Cereal Science, 59, 95-100.

Errenst, C., Petermann, M., ve Kilzer, A. 2021. Encapsulation of limonene in yeast cells using the concentrated powder form technology. The Journal of Supercritical Fluids, 168, 105076.

Feng, Y., Zhang, J., Wen, C., Dzah, C. S., Juliet, I. C., Duan, Y. Ve Zhang, H. 2020. Recent advances in Agaricus bisporus polysaccharides: Extraction, purification, physicochemical characterization and bioactivities. Process Biochemistry, 94, 39 – 50.

Freimund, S., Sauter, M., Kappeli, O. Ve Dutter, H. 2003. A new non-degrading isolation process for 1,3-β-D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Carbohydrate Polymers, 54, 159–171.

Gangopadhyay, N., Hossain, M. B., Rai, D. K. ve Brunton, N. P. 2015. Optimisation of yield and molecular weight of b-glucan from barley flour using response surface methodology. Journal of Cereal Science, 62, 38 – 44.

Gil-Ramirez, A., Smiderle, F. R., Morales, D., Iacomini, M. ve Soler-Rivas, C. 2019. Strengths and weaknesses of the aniline-blue method used to test mushroom (1 →3)- β -D-glucans obtained by microwave-assisted extractions. Carbohydrate Polymers, 217, 135 – 143.

Goldsmith, L. A., Katz, S. I., Gilchrest, B, A., Paller, A. S., Leffell, D. J. and Wolff, K. 2012. Fitzpatrick' Dermatology in General Medicine. 8th edition. USA, McGraw-Hill Companies Inc, 105-499.

Goudar, G., Sharma, P., Janghu, S. ve Longvah, T. 2020. Effect of processing on barley β-glucan content, its molecular weight and extractability. International Journal of Biological Macromolecules, 162, 1204 – 1216.

Gründemann, C., Garcia-Kaufer, M., Saver, B., Scheer, R., Merdivan, S., Philipp, B.,

Huber, R. Ve Lindequist U. 2015. Comparative chemical and biological investigations of β-glucan-containing products from shiitake mushrooms, Journal of Functional Foods, 18, 692–702.

Harasym, J., Suchecka, D. ve Gromadzka-Ostrowska, J. Effect of size reduction by freeze-milling on processing properties of beta-glucan oat bran. Journal of Cereal Science, 61, 119 – 125.

Hong, F. Yan, J. Baran, J. T., Allendorf, D. J., Hansen, R. D., Ostroff, G. R., Xing, P. X., Cheung, N. K. and Ross, G. D. 2004. Mechanism by which orally administered beta- 1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. J Immunol, 173(2), 797-806.

Jaehrig, S. C., Rohn, S., Kroh, L. W., Fleischer, L. G. and Kurz T. 2008. In Vitro Potential
Antioxidant Activity of (1→3), (1→6)-β-D-Glucan and Protein Fractions from Saccharomyces cerevisiae Cell Walls. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 4710-4716.

Johnson, E. A. ve Echavarri-Erasun, C. 2011. Yeast Biotechnology, In: The Yeast A taxonomic Study. Kurtzman, P. C., Fell, J. W. ve Boekhout, T. (eds), Elsevier Science, 22 – 44, Amsterdam.

Jung, H. K., Hong, J. H., Park, S. C., Park, B. K., Nam, D. H. and Kim, S. D. 2007. Production and physicochemical characterization of β-glucan produced by Paenibacillus polymyxa JB115. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 12, 713- 719.

Kagimura, F. Y., Cunha, M. A. A., Barbosa, A. M., Dekker, R. F. H. and Malfatti, C. R. M. 2015. Biological activities of derivatized D-glucans: A review. International Journal of Biological Macromolecules, 72, 588-598.

Karimi, R., Azizi, M. H. ve Xu, Q. 2019. Effect of different enzymatic extractions on molecular weight distribution, rheological and microstructural properties of barley bran β-glucan. International Journal of Biological Macromolecules, 126, 298 – 309.

Khan, A. A., Gani, A., Masoodi, F. A., Amin, F., Wani, I. A., Khanday, F. A. and Gani, A. 2016. Structural, thermal, functional, antioxidant & antimicrobial properties of β-D glucan extracted from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) – Effect of ɤ- irradition. Carbohdrate polymers, 140, 442-450.

Khan, A. A., Gani, A., Khanday, F. A. ve Masoodi, F. A. 2018. Biological and pharmaceutical activities of mushroom β-glucan discussed as a potential functional food ingredient. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 16, 1 – 13.

Kim, H. J. and White, P. J. 2013. Impact of the Molecular Weight, Viscosity, and Solubility of β – Glucan on in Vitro Oat Starch Digestibility. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61, 3270-3277.

Kittisuban, P., Ritthiruangdej, P., and Suphantharika, M. 2014. Optimization of hydroxypropylmethylcellulose, yeast β-glucan, and whey protein levels based on physical properties of gluten-free rice bread using response surface methodology. LWT- Food Science and Technology, 57, 738-748.

Klis F. M., Mol P., Hellingwerf K. and Brul S., 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Reviews, 26(3),239-256.

Knuckles, B. E., Yokoyama, W. H. ve Chui, M. M. 1997. Molecular Characterization of Barley β-Glucans by Size-Exclusion Chromatography with Multiple-Angle Laser Light Scattering and Other Detectors. Carbohydrates, 74(5), 599 – 604.

Koç, B. ve Kaymak-Ertekin, F. 2010. Yanıt Yüzey Yöntemi ve Gıda İşleme Uygulamaları. Gıda, 35, 63 – 70.

Koçak, F. 2019. Farklı havalandırma profillerinde maya çoğalmasının beta glukan verimine etkisinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, 115, Ankara.

Kodama, S., Shoda, T., Machmudah, S., Wahyudiono, Kanda, H. ve Goto, M. 2015. Enhancing pressurized water extraction of b-glucan from barley grain by adding CO2 under hydrothermal conditions. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 97, 45 -54.

Kofuji, K., Huang, Y., Tsubaki, K., Kokido, F., Nishikawa, K. and Isobe, T. 2010. Preparation and evaluation of a novel wound dressing sheet comprised of β-glucan- chitosan complex. Reactive and Functional Polymers, 70, 784-789.

Kofuji, K., Aoki, A., Tsubaki, K., Konishi, T. I. Ve Murata, Y. 2011. Antioxidant Activity of *β*-Glucan. ISRN Pharmaceutics, ID No: 125864, 1 – 5.

Kumar, M., Tomar, M., Potkule, J., Verma, R., Punia, S., Mahapatra, A., Belwal, T., Dahuja, A., Joshi, S., Berwal, M. K., Satankar, V., Bhoite, A. g., Amarowicz, R., Kaur, C. ve Kennedy, J. F. 2021. Advances in the plant protein extraction: Mechanism and recommendations, Food Hydrocolloids, 115, 106595.

Kurban 2019. *Saccharomyces cerevisiae* DNA barkodunun belirlenmesi ve veri tabanının oluşturulması. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 335, Ankara.

Kwiatkowski, S. ve Kwiatkowski, S. E. 2012. Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Glucan Polysaccharides – Occurrence, Separation and Application in Food, Feed and Health Industries, In: The Complex World of Polysaccharides. Karunaratne D. N. (eds), IntechOpen, 47 – 70.

Lam, K. L., and Cheung, C. K. 2013. Non-digestible long chain beta-glucans as novel prebiotics. Bioactive Carbohydrate and Dietary Fibre, 2, 45-64.

Lazaridou, A., and Biliaderis, C. G. 2007. Molecular aspects of cereal β-glucan functionality: physical properties, technological applications and physiological effects. Journal of Cereal Science, 46, 101-118.

Leong, Y. K., Yang, F.-C. ve Chang, J.-S. 2021. Extraction of polysaccharides from edible mushrooms: Emerging technologies and recent advances. Carbohydrate Polymers, 251, 117006.

Li, J. ve Karboune, S. 2018. A comparative study for the isolation and characterization of mannoproteins from Saccharomyces cerevisiae yeast cell wall. International Journal of Biological Macromolecules, 119, 654 – 661.

Liu, X.-Y., Wang, Q., Cui, S. W. ve Liu, H.-Z. 2008. A new isolation method of β-D-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Food Hydrocolloids, 22, 239‑247.

Luen, L. Q. ve Uyen, N. H. P. 2014. Radiation degradation of (1 → 3)- _-d-glucan from yeast with apotential application as a plant growth promoter. International Journal of Biological Macromolecules, 69, 165 – 170.

Maheshwari, G., Sowrirajan, S. and Joseph B. 2017. Extraction and Isolation of β-Glucan from Grain Sources-A review. Journal of Food Science, 7, 1535-1545.

Maheshwari, G., Sowrirajan, S. ve Joseph, B. 2019. β-Glucan, a dietary fiber in effective prevention of lifestyle diseases – An insight. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 19, 100187.

Mantovani, M. S., Bellini, M. F., Angeli, J. P. F., Oliveira, R. F., Silva, A. F. and Ribeiro, L. R. β-Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. Mutation research, 658, 154-161.

Marconi, O., Tomasi, I., Dionisio, L., Perretti, G. ve Fantozzi, P. 2012. Effects of maltingon molecular weight distribution and content of water-extractable β-glucans in barley. Food Research International, 64, 677 – 682.

Mohl, T. M., Rivera, A. And Pamer, E.G. 2006. Immunity to fungi. Curr Opin Immunol,18, 465-4672.

Moldoveanu, S. ve David, V. 2015. Modern Sample Preparation for Chromatography. Elsevier, 696.

Morales, D., Smiderle, F. R., Villalva, M., Abreu, H., Rico, C., Santoyo, S., Iacomini, M.ve Soler-Riva, C. 2019. Testing the effect of combining innovative extraction technologies on the biological activities of obtained β-glucan-enriched fractions from *Lentinula edode.* Journal of Functional Foods, 60, 103446.

Murphy, E. J., Masterson, C., Rezoagli, e., Otoole, D., Major, I., Stack, G. D., Lynch, M.,Laffey, J. G. ve Rowan, N. J. 2020. β-Glucan extracts from the same edible shiitake mushroom *Lentinus edodes* produce differential in-vitro immunomodulatory and pulmonary cytoprotective effects— Implications for coronavirus disease (COVID-19) immunotherapies. Science of the Total Environment, 732, 139330.

Nauremon, N., Romanee, S., Cheunjit, P., Xiao, H., McLandsborough, L. A. and Pawadee, M. 2013. Influence of additives on Saccharomyces cerevisiae β-glucan production. International Food Research Journal, 20(4), 1953-1959.

Nyman, A. A. T., Aachmann, F. L., Rise, F., Ballance, S. ve Samuelsen, A. B. C. 2016. Structural characterization of a branched (1 → 6)- _-mannan and _-glucans isolated from the fruiting bodies of *Cantharellus cibarius*. Carbohydrate Polymers, 146, 197 – 207.

Özcan, Ö. ve Ertan, F. 2018. Beta-glucan Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Some Edible Mushroom Species. Food Science and Technology,6(2), 47- 55.

Paciello, L. 2016. Production of heterologous proteins by engineered yeast cell, 213.

Pillai, R., Redmond, M. and Röding, J. 2005. Anti-wrinkle therapy: significant new findings in the non-invasive cosmetic treatment of skin wrinkles with beta glucan. International Journal of Cosmetic Science, 27, 292.

Puligundla, P., Mok, C. ve Park, S. 2020. Advances in the valorization of spent brewer's yeast. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 62, 102350.

Rashid, M. Z., Mormann, M., Steckhan, k., Peters, A., Esch, S. ve Hensel, A. 2019. Polysaccharides fromlichen Xanthoria parietina: 1,4/1,6-α-D-glucans and a highly branched galactomannan with macrophage stimulating activity via Dectin-2 activation. International Journal of Biological Macromolecules, 134, 921 – 935.

Rhee, S. J., Cho, S. y., Kim, K. M., Cha, D.-S. ve Park, H.-J. 2008. A comparative study of analytical methods for alkali-soluble b-glucan in medicinal mushroom, Chaga (*Inonotus obliquus*). LWT, 41, 545 – 549.

Rinaldi, L., Rioux, L. E., Britten, M., and Turgeon, S. L. 2015. In vitro bioaccessibility of peptides and amino acids from yogurt made with starch, pectin, or β-glucan. International Dairy Journal, 46, 39-45.

Ruiz-Herrera, J. ve Ortiz-Castellanos 2019. Cell wall glucans of fungi. A review. The Cell Surface, 5, 100022.

Sabuncu, N. 2016. β-Glukan içeriğinin arttırılması için *S.cerevisiae* üretilen bir biyoreaktörde çoğalma koşullarının incelenmesi ve pH kontrolü. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, 156, Ankara.

Saçak, M. 1998. Polimer Kimyasına Giriş. A.Ü.F.F. Döner Sermaye İşletmesi Yayınları,28, Ankara.

Sapirstein, H. D. 2016. Bioactives in Wheat Bran. Referance Module in Food Science.

Sharafbafi, H., Tosh, S. M., Alexander, M., and Corredig, M. 2014. Phase behaviour, rheological properties, and microstructure of oat β-glucan-milk mixtures. Food Hydrocolloids, 41, 274-280.

Shurson G. C. 2018. Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods. Animal Feed Science and Technology, 235, 60 – 76.

Siwicki, A. K., Kazun, K., Glbski, E., Terech-Majewska, E., Baranowski, P., and Trapkowska, S. 2004. The effect of beta-1.3/1.6-glucan in diets on the effectiveness of anti-yersinia ruckeri vaccine-an experimental study in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 13, 59-61.

Sun, J., Li, J., Qin, Y., Xie, J., Wue, B., Li, X., Gan, J., Bian, X. ve Shao, Z. 2020. Rheological and functional properties of oat b-glucan with different molecular weight. Journal of Molecular Structure, 1209, 127944.

Synytsya, A. and Novak, M. 2014. Structural analysis of glucans. Annals of Translational Medicine, 2(2):17, 1-14.

Tang, Q., Huang, G., Zhao, F., Zhou, L., Huang, S. ve Li, H. 2017. The antioxidant activities of six (1 → 3)- β-d-glucan derivativesprepared from yeast cell wall. International Journal of Biological Macromolecules, 98, 216 – 221.

Tansık, E. 2019. POLİ(METİL VİNİL ETER-ard-MALEİK ANHİDRİT) VE POLİ(ETİLEN-ard-MALEİK ANHİDRİT) KOPOLİMERLERİNİN ÇÖZELTİ DİNAMİĞİ VE TERMODİNAMİĞİ. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 81, ANKARA.

Taofiq, O., Correa, R. C. G., Barras,L., Prieto, M. A., Bracht, A., Peralta, R. M., Gonzalez-Paramas, A. M., Barreiro, M. F. ve Ferreira, I. C. F. R. 2019. Food Research International, 125, 108541.

Thebaudin, J. Y., Lefebvre, A. C., Harrington, M. and Bourgeois, C. M. 1997. Dietary fibres: nutritional and technological interest. Trends Food Sci Tech, 8; 41-48.

Toklu, H. Z., Sener, G., Jahovic, N., Uslu, B., Arbak, S., and Yeğen, B. C. 2006. β-glucan protects against burn-induced oxidative organ damage in rats. International Immunopharmacology, 6, 156-169.

Wu, J., Jin, S., Wu, S., Chen, Y. Ve Chen, R. 2018. Effect of filamentous fungi fermentation on the extractability and physicochemical properties of β-glucan in oat bran. Food Chemistry, 254, 122 – 128.

Valasques-Junior GL, de Lima FO, Boffo EF, Santoz JTG, da Silva BC, de Assis SA 2014. Extraction optimization and antinociceptive activity of(1−→3)-β-D-glucan from *Rhodotorula mucilaginosa*. Carbohydrate Polymers, 105: 293-299.

Yang, Y., Zhao, X., Li, J., Jiang, H., Shan, X., Wang, Y., Ma, W., Hao, J: ve Yu, G. 2018. A β-glucan from Durvillaea Antarctica has immunomodulatory effects on RAW264.7 macrophages via toll-like receptor 4. Carbohydrate Polymers, 191, 255 – 265.

Yılmaz, C. 2010. Saccharomyces cerevisiae'dan Glukan Eldesi. Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 117, Kocaeli.

Zekovic, D. B., Kwiatkowski, S., Vrvic, M. M., Jakovljevic, D. and Moran, C. A. 2008. Natural and Modified (1→3)-β-D-Glucans in Health Promotion and Disease Alleviation. Critical Reviews in Biotechnology, 25:4, 205-230

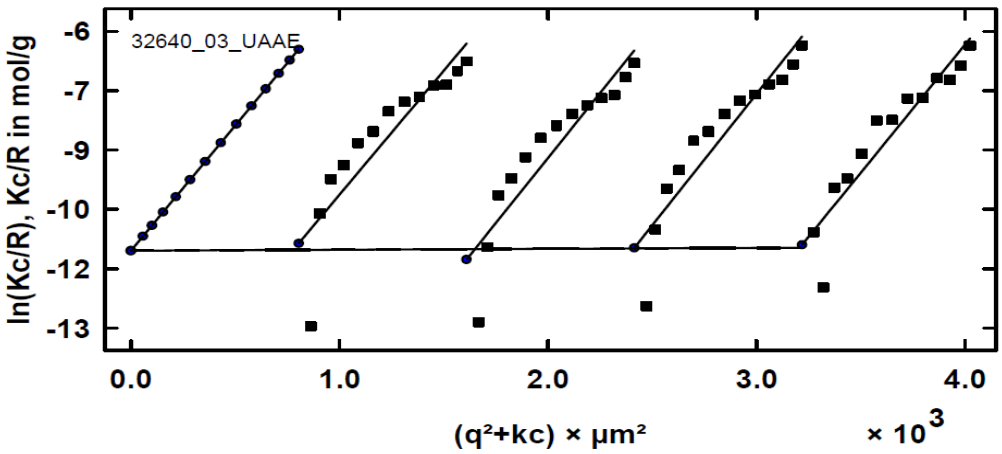
Zhao, G., Chen, X., Wang, L., Zhou, S., Feng, H., Chen, W. N. ve Lau, R. 2013. Ultrasound assisted extraction of carbohydrates from microalgae as feedstockfor yeast fermentation. Bioresource Technology, 128, 337 – 344.

Zhu, H., Du, B. and Xu, B. 2016. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. Food Hydrocolloids, 52, 275-288.

Zhu, W., Xue, X. ve Zhang, Z. 2016. Ultrasonic-assisted extraction, structure and antitumor activity ofpolysaccharide from *Polygonum multiflorum*. International Journal of Biological Macromolecules, 91, 132 – 142.

Zielke, C., Strander, A. ve Nilsson, L. 2018. Characterization of cereal b-glucan extracts: Conformation and structural aspects. Food Hydrocolloids, 79, 218 – 227.

EK SLS yöntemi analizinin sonuç grafikleri



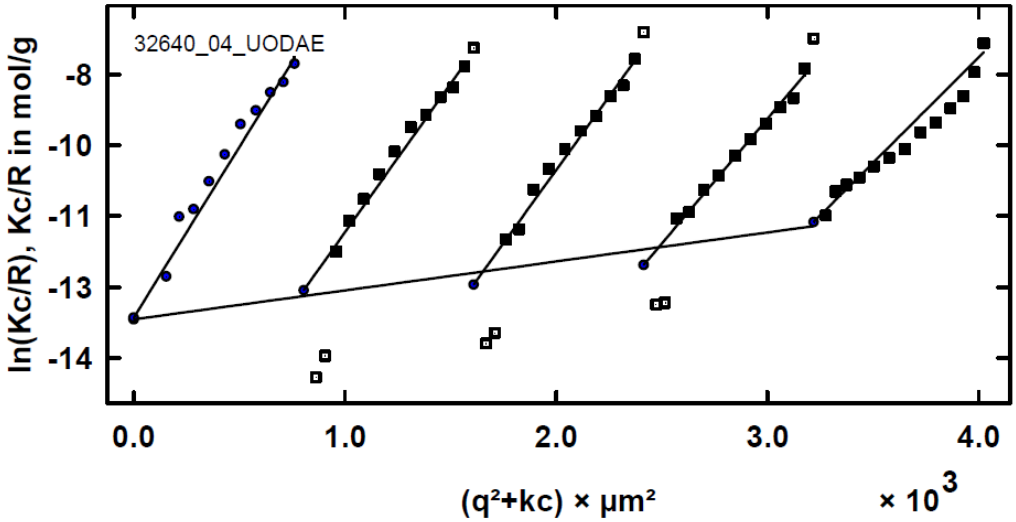
Mw(c): 6.266e+04 g/mol Mw(q²): 6.266e+04 g/mol
A2: 1.486e-08 mol dm³/g² Rg: 1.378e+02 nm
C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\03_UAAE_C1.sta; C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\03_UAAE_C2.sta; C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\03_UAAE_C3.sta; C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\03_UAAE_C4.sta

32640_03_UAAE
Static Light Scattering, results of Guinier-Plot, q²-dep.: 1, c-dep.: 1 smoothed

File	Conc/(g/dm³)	Mw(app)/(g/mol)	<S²>(app)/µm²	Rg(app)/nm
Conc.=0	0.0000	6.266e4	1.898e-2	137.764
03_UAAE_C1.sta	40.0000	5.389e4	1.944e-2	139.432
03_UAAE_C2.sta	30.0000	5.839e4	1.992e-2	141.154
03_UAAE_C3.sta	20.0000	7.819e4	1.971e-2	140.387
03_UAAE_C4.sta	10.0000	5.202e4	1.885e-2	137.278

Mw(c): 6.266e+04 g/mol (± 31.7 %) Mw(q²): 6.266e+04 g/mol (± 3.5e-13 %)
A2: 1.486e-08 mol dm³/g² (± 541 %) Rg: 1.378e+02 nm (± 5.9e-14 %)

ALV-Stat (V 4.31 10/01), printed at Fri May 28 16:31:52 2021. Data were from: C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\03_UAAE_C1.sta; C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\03_UAAE_C2.sta; C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\03_UAAE_C3.sta; C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\03_UAAE_C4.sta



Mw(c): 5.312e+05 g/mol Mw(q²): 5.120e+05 g/mol

A2: 4.638e-08 mol dm³/g² Rg: 1.471e+02 nm

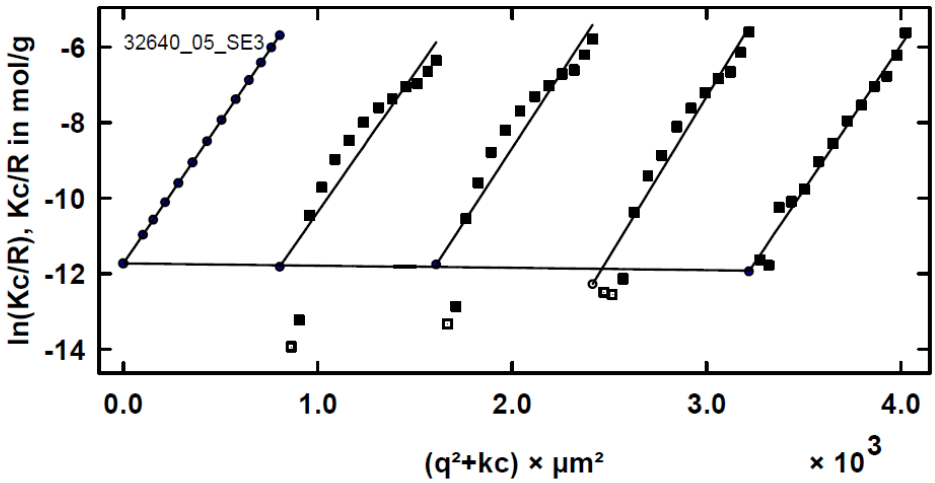
C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\04_UODAE_C1.sta; C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\04_UODAE_C2.sta; C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\04_UODAE_C3.sta; C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\04_UODAE_C4.sta

32640_04_UODAE
Static Light Scattering, results of Guinier-Plot, q²-dep.: 1, c-dep.: 1

File	Conc/(g/dm³)	Mw(app)/(g/mol)	<S²>(app)/µm²	Rg(app)/nm
Conc.=0	0.0000	5.120e5	2.163e-2	147.057
04_UODAE_C1.sta	40.0000	6.783e4	1.339e-2	115.714
04_UODAE_C2.sta	30.0000	1.679e5	1.583e-2	125.815
04_UODAE_C3.sta	20.0000	2.547e5	1.861e-2	136.427
04_UODAE_C4.sta	10.0000	2.872e5	1.884e-2	137.246

Mw(c): 5.312e+05 g/mol (± 2.77 %) Mw(q²): 5.120e+05 g/mol (± 3.14 %)
A2: 4.638e-08 mol dm³/g² (± 3.45 %) Rg: 1.471e+02 nm (± 0.38 %)

ALV-Stat (V 4.31 10/01), printed at Fri May 28 16:49:50 2021. Data were from: C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\04_UODAE_C1.sta; C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\04_UODAE_C2.sta; C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\04_UODAE_C3.sta; C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\04_UODAE_C4.sta



Mw(c): 1.242e+05 g/mol Mw(q²): 1.242e+05 g/mol

A2: -1.909e-08 mol dm³/g² Rg: 1.501e+02 nm

C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\05_SE3_C1.sta; C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\05_SE3_C2.sta; C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\05_SE3_C3.sta; C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\05_SE3_C4.sta

32640_05_SE3

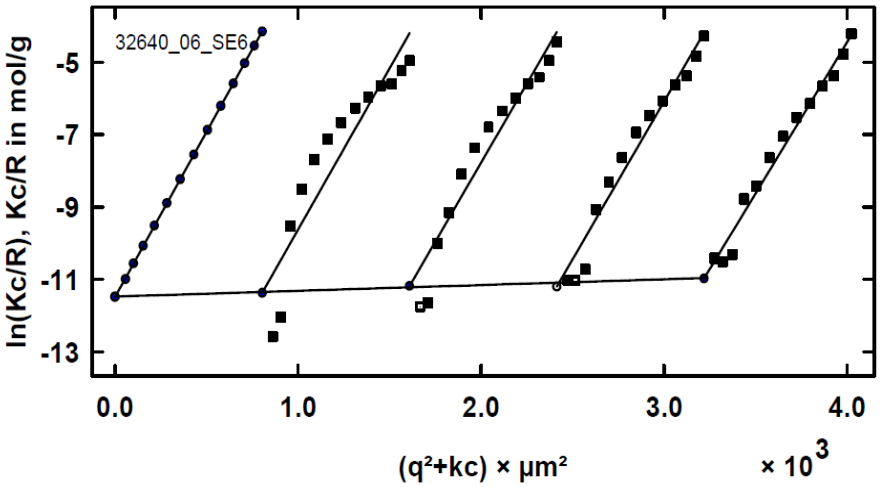
Static Light Scattering, results of Guinier-Plot, q²-dep.: 1, c-dep.: 1 smoothed

File	Conc/(g/dm³)	Mw(app)/(g/mol)	<S²>(app)/µm²	Rg(app)/nm
Conc.=0	0.0000	1.242e5	2.252e-2	150.061
05_SE3_C1.sta	40.0000	1.534e5	2.300e-2	151.662
05_SE3_C3.sta	20.0000	1.281e5	2.369e-2	153.923
05_SE3_C4.sta	10.0000	1.359e5	2.217e-2	148.906

Mw(c): 1.242e+05 g/mol (± 10.2 %) Mw(q²): 1.242e+05 g/mol (± 5.2e-13 %)

A2: -1.909e-08 mol dm³/g² (± 78.3 %) Rg: 1.501e+02 nm (± 5.7e-14 %)

ALV-Stat (V 4.31 10/01), printed at Fri May 28 17:00:18 2021. Data were from: C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\05_SE3_C1.sta; C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\05_SE3_C2.sta; C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\05_SE3_C3.sta; C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\05_SE3_C4.sta



Mw(c): 9.623e+04 g/mol Mw(q²): 9.731e+04 g/mol

A2: 6.675e-08 mol dm³/g² Rg: 1.655e+02 nm

C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\06_SE6_C1.sta; C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\06_SE6_C2.sta; C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\06_SE6_C3.sta; C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\06_SE6_C4.sta

32640_06_SE6

Static Light Scattering, results of Guinier-Plot, q²-dep.: 1, c-dep.: 1 smoothed

File	Conc/(g/dm³)	Mw(app)/(g/mol)	<S²>(app)/µm²	Rg(app)/nm
Conc.=0	0.0000	9.731e4	2.738e-2	165.461
06_SE6_C1.sta	40.0000	5.828e4	2.509e-2	158.390
06_SE6_C3.sta	20.0000	7.170e4	2.618e-2	161.799
06_SE6_C4.sta	10.0000	8.675e4	2.678e-2	163.631

Mw(c): 9.623e+04 g/mol (± 5.85 %) Mw(q²): 9.731e+04 g/mol (± 0.59 %)

A2: 6.675e-08 mol dm³/g² (± 17.7 %) Rg: 1.655e+02 nm (± 0.064 %)

ALV-Stat (V 4.31 10/01), printed at Fri May 28 17:49:39 2021. Data were from: C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\06_SE6_C1.sta; C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\06_SE6_C2.sta; C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\06_SE6_C3.sta; C:\Program Files\ALV_V3.0.2.1\data\32640\06_SE6_C4.sta