



***Pichia kudriavzevii* MAYA SUŞLARINDAN BETA-GLUKANIN
EKSTRAKTE EDİLEREK PREBİYOTİK ETKİLERİNİN VE
GASTROİNTESTİNAL SİSTEMDE DAYANIKLILIĞININ
BELİRLENMESİ**

Buse DENGİZ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

AĞUSTOS 2021

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

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

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

Buse DENGİZ

20/08/2021

Pichia kudriavzevii MAYA SUŞLARINDAN BETA-GLUKANIN EKSTRAKTE
EDİLEREK PREBİYOTİK ETKİLERİNİN VE GASTROİNTESTİNAL SİSTEMDE
DAYANIKLILIĞININ BELİRLENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Buse DENGİZ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ağustos 2021

ÖZET

Bu çalışmada, *Pichia kudriavzevii* maya suşlarından β -glukan ekstraksiyonunun optimizasyonu ve en yüksek β -glukan verimini gösteren suştan elde edilen β -glukanın (β -gluM13) prebiyotik etkileri ile gastrointestinal sistemde dayanıklılığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Öncelikle yüksek gelişme yeteneği gösteren maya suşu seçilmiş ve β -glukan miktarını arttırmaya yönelik optimizasyonlar yapılmıştır. Belirlenen optimum koşullarda beş farklı *P. kudriavzevii* maya suşunda β -glukan miktarı belirlenmiş ve *P. kudriavzevii* M13 suşu en yüksek β -glukan miktarı (%87,8) göstermiştir. β -gluM13'ün *Ligilactobacillus plantarum* GD2, *Bifidobacterium bifidum* A12 ve *Saccharomyces cerevisiae* BD1 tarafından fermente edilebilme kapasitesi araştırılmıştır. Suşların karbon kaynağı olarak β -gluM13 içeren besi ortamlarındaki canlılıkları kontrol besiyerine göre artmıştır. Farklı konsantrasyonlarda (0,5; 1; 5; 10 mg/mL) β -gluM13'ün Laktobasil Gelişimini Düzenleyici (LGD), Bifido Gelişimini Düzenleyici (BGD) ve Maya Gelişimini Düzenleyici (MGD) aktiviteleri araştırılmış ve ticari prebiyotik inülin ile karşılaştırılmıştır. En yüksek LGD etkisi 10 mg/mL ($9,4 \pm 0,1$ log kob/mL), BGD etkisi 5 mg/mL ($9,4 \pm 0,1$ log kob/mL) ve MGD etkisi 10 mg/mL β -gluM13 ilave edilen ($9,4 \pm 0,3$ log kob/mL) besiyerlerinde belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda (0,2-50 mg/mL) β -gluM13'ün antioksidan etkisi DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) metodu ile belirlenmiş ve tüm konsantrasyonlarda antioksidan aktivite, pozitif kontrolden (askorbik asit) daha düşük bulunmuştur. β -gluM13'ün gastrointestinal sistemde dayanıklılığı, farklı konsantrasyonlarda (0,5-10 mg/mL) yapay mide-bağırsak sıvılarında hidroliz olmalarına göre değerlendirilmiştir. 5 mg/mL β -gluM13'ün pH 2'de (180 dk) en yüksek hidroliz yüzdesine (%1,14) ve 10 mg/mL β -gluM13 %0,5 safra konsantrasyonunda en yüksek hidroliz yüzdesine (%1,16) sahip olduğu bulunmuştur. β -gluM13'ün yüksek LGD, BGD, MGD aktivitesi, antioksidan özelliği ve mide-bağırsak sıvılarına dayanıklılığından dolayı prebiyotik olarak kullanılma potansiyeli bulunmaktadır.

Bilim Kodu : 20309

Anahtar Kelimeler : β -glukan, Maya, Optimizasyon, Prebiyotik etki, Gastrointestinal sistem dayanıklılığı

Sayfa Adedi : 104

Danışman : Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

İkinci Danışman : Doç. Dr. Selcen BABAOĞLU AYDAŞ

EXTRACTION, PREBIOTIC EFFECTS AND GASTROINTESTINAL SYSTEM
RESISTANCE OF BETA-GLUCAN FROM *Pichia kudriavzevii* YEAST STRAINS

(M. Sc. Thesis)

Buse DENGİZ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

August 2021

ABSTRACT

In this study, it was aimed to optimize the extraction of β -glucan from *Pichia kudriavzevii* yeast strains and to determine the stability of β -glucan (β -gluM13) obtained from the yeast strain showing the highest β -glucan yield in the gastrointestinal tract with its prebiotic effects. First of all, yeast strain with high growth ability was selected and optimizations in the extraction steps were made to increase the amount of β -glucan. The amount of β -glucan was determined in five different *P. kudriavzevii* yeast strains under the determined optimum conditions, and the *P. kudriavzevii* M13 strain showed the highest β -glucan yield (87.8%). The fermentation capacity of β -gluM13 by *Ligilactobacillus plantarum* GD2, *Bifidobacterium bifidum* A12 and *Saccharomyces cerevisiae* BD1 was investigated. The viability of the strains in the medium containing β -gluM13 as a carbon source increased compared to the control medium. Lactobacillus Growth Regulatory (LGD), Bifido Growth Regulatory (BGD) and Yeast Growth Regulatory (MGD) activities of β -gluM13 at different concentrations (0.5; 1; 5; 10 mg/mL) were investigated and combined with commercial prebiotic inulin. The highest LGD, BGD and MGD effects were determined in the mediums containing, 10 mg/mL (9.4 ± 0.1 log cfu/mL), 5 mg/mL (9.4 ± 0.1 log cfu/mL), and 10 mg/mL (9.4 ± 0.3 log cfu/mL) β -gluM13 respectively. The antioxidant effect of β -gluM13 at different concentrations (0.2-50 mg/mL) was determined by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) method, and the antioxidant activity at all concentrations was lower than that of the positive control (ascorbic acid). The stability of β -gluM13 in the gastrointestinal tract was evaluated according to their hydrolysis in artificial gastrointestinal fluids at different concentrations (0.5-10 mg/mL). 5 mg/mL β -gluM13 had the highest percentage of hydrolysis (1.14%) at pH 2 (180 min), and 10 mg/mL β -gluM13 had the highest percentage of hydrolysis at 0.5% bile concentration (1.16%). β -gluM13 has the potential to be used as a prebiotic due to its high LGD, BGD, MGD activity, antioxidant properties and resistance to gastrointestinal fluids.

Science Code : 20309

Key Words : β -glucan, Yeast, Optimization, Prebiotic effect, Gastrointestinal system stability

Page Number : 104

Supervisor : Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

Co-Supervisor : Doç. Dr. Selcen BABAOĞLU AYDAŞ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin ilk gününden bu yana bana büyük bir sabır ve anlayış ile her türlü desteği sağlayan, benden engin bilgilerini esirgemeyen, her türlü araştırma olanağını sunan, bilgi ve deneyimleriyle bu tez çalışmasını tamamlamamda bana yol gösteren, bir danışmandan çok daha fazlası olan çok değerli danışmanlarım Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ ve Doç. Dr. Selcen BABAOĞLU AYDAŞ'a saygılarımı sunar ve teşekkürü borç bilirim. Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesiyle bana her konuda yardımcı olan sayın Prof. Dr. Belma ASLİM'a da saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Ekip ruhunu bana doyasıya tattıran, bir meslektaştan daha fazlası olan çok değerli dostum Abdullah DEMİR başta olmak üzere tüm ekip arkadaşlarıma bu süreçte yanımda oldukları ve bana her türlü desteği verdikleri için teşekkür ederim. Beni bugünlere kadar büyük emeklerle yetiştiren, bana her zaman maddi manevi destek olan, canım babam Hüseyin DENGİZ'e ve biricik annem Beyhan DENGİZ'e beni dünyanın en şanslı çocuğu kıldıkları için, üzerimde en az annem ve babam kadar emeği bulunan, her zaman elini omzumda hissettiğim çok sevgili dedem Mustafa ŞAHİN'e ve çok sevgili anneannem Reyhan ŞAHİN'e saygı ve minnetlerimi sunarım.

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından 05/2019-20 kodlu araştırma projesi ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Gazi Üniversitesi Rektörlüğüne teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	5
2.1. Mayalar ve Tarihçesi.....	5
2.2. Maya Hücresi ve Organelleri	6
2.3. Maya Hücre Duvarının Bileşimi ve Özellikleri	6
2.3.1. Kitin	8
2.3.2. Duvar proteinleri.....	9
2.3.3. β -glukan' nın yapısı ve özellikleri	10
2.3.4. β -glukan kaynakları	13
2.4. Maya β -glukanların İzolasyon Süreci	13
2.4.1. Ekstraksiyon yöntemleri	15
2.4.2. Hücre parçalanması ve hücre duvarının kırılması	15
2.4.3. Otoliz	16
2.4.4. Enzimatik uygulamalar	16
2.4.5. Boncuklarla hücre bozulması	17
2.4.6. Yüksek basınçlı homojenizasyon	17
2.4.7. Kurutma	17

	Sayfa
2.5. β -glukanın Antioksidan Özellikleri.....	18
2.6. Prebiyotik Olarak β -glukan	20
2.7. β -glukanın Fonksiyonel Uygulamaları.....	22
2.7.1. Sağlık uygulamaları.....	22
2.7.2. Kozmetik uygulamaları	25
2.7.3. Yem endüstrisi uygulamaları.....	25
2.7.4. Gıda sektörü uygulamaları.....	26
2.8. <i>Pichia Kudriavzevii</i> ve Hücresel Özellikleri.....	27
3. MATERYAL VE METOT	29
3.1. Materyal	29
3.1.1. Çalışmada kullanılan cihaz ve ekipmanlar	29
3.1.2. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar.....	29
3.1.3. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve çözeltiler.....	30
3.2. Metot	33
3.2.1. Maya ve bakterilerin aktifleştirilmesi.....	33
3.2.2. Maya ve Bakterilerin muhafazası	33
3.2.3. Bakterilerin sayımı	34
3.2.4. β -glukan ekstraksiyonu.....	35
3.2.5. β -glukan ekstraksiyonun optimizasyonu	36
3.2.6. β -glukan miktarlarının hesaplanması.....	37
3.2.7. Kuru madde miktarı.....	38
3.2.8. β -glukanlarda toplam karbonhidrat miktarının belirlenmesi	38
3.2.9. Toplam protein miktarı.....	39
3.2.10. Toplam lipit içeriği	40
3.2.11. β -gluM13'ün prebiyotik etkileri	41

	Sayfa
3.2.12. Antioksidan aktivite.....	45
3.2.13. β -gluM13'ün gastrointestinal sistemde dayanıklılığı	45
3.2.14. İstatistiksel analizler	46
4. BULGULAR	49
4.1. Mikroorganizma İnokülasyon Miktarının Belirlenmesi.....	49
4.2. β -glukanın Ekstraksiyonunun Optimizasyonu	50
4.2.1. Otoliz	50
4.2.2. Sıcak su muamelesi	52
4.2.3. Sonikasyon.....	54
4.2.4. Proteaz enzim uygulaması	56
4.3. <i>Pichia Kudriavzevii</i> Maya Suşlarının β -glukan Miktarı	57
4.4. Optimum Koşulların Uygulandığı <i>P. Kudriavzevii</i> M13 Maya Suşundan Elde Edilen β -glukan (β -gluM13)'ın Karbonhidrat, Lipit ve Protein Miktarı	60
4.5. β -gluM13'ün Prebiyotik Etkileri.....	61
4.5.1. β -gluM13'ün <i>Ligilactobacillus plantarum</i> GD2 tarafından fermente edilebilme kapasitesi	61
4.5.2. β -gluM13'ün <i>Bifidobacterium bifidum</i> A12 tarafından fermente edilebilme kapasitesi	61
4.5.3. β -gluM13'ün <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BD1 tarafından fermente edilebilme kapasitesi	62
4.5.4. β -gluM13'ün Laktobasil Gelişimini Düzenleyici (LGD) Etkisinin Belirlenmesi	63
4.5.5. β -gluM13'ün Bifido Gelişimini Düzenleyici (BGD) Etkisinin Belirlenmesi	64
4.5.6. β -gluM13'ün Maya Gelişimini Düzenleyici (MGD) Etkisinin Belirlenmesi	65
4.5.7. 1,1-difenil-2-pikrilhidraz (DPPH) radikalini giderme etkisi	66
4.6. β -gluM13'ün Gastrointestinal Sistemde Dayanıklılığı	67
5. TARTIŞMA	69

	Sayfa
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	85
KAYNAKLAR	87
ÖZGEÇMİŞ	103



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Maya hücre duvar makromolekülleri, kuru ağırlık yüzdeleri ve bu moleküllerin sentezlendikleri bölgeler.....	8
Çizelge 2.2. Farklı kaynaklardan elde edilen β -glukanlar ve kimyasal yapıları.....	13
Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan <i>Pichia kudriavzevii</i> maya suşları	29
Çizelge 3.2. Prebiyotik etkilerin belirlenmesinde kullanılan mikroorganizmalar	30
Çizelge 3.3. Yeast Ekstrakt Glukoz Kloramfenicol (YGC) besi yeri içeriği.....	30
Çizelge 3.4. Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) besi yeri içeriği.....	31
Çizelge 3.5. De Man Rogosa Sharpe (MRS) besi yeri içeriği	31
Çizelge 3.6. Bifidobacterium selective besi yeri (BSM) içeriği	32
Çizelge 4.1. <i>P. kudriavzevii</i> maya suşlarına ait canlı hücre sayısı.....	49
Çizelge 4.2. <i>P. kudriavzevii</i> M10 suşundan elde edilen biyomas, karbonhidrat ve protein miktarı.....	50
Çizelge 4.3. Farklı miktarlarda sodyum fosfat ilave edilen pelletlerden elde edilen kuru madde miktarları	52
Çizelge 4.4. Farklı sürelerde yapılan sonikasyon sonrası <i>P. kudriavzevii</i> M10 maya suşunun toplam karbonhidrat ve toplam protein miktarı	56
Çizelge 4.5. β -glukan ekstraksiyonunun optimizasyonu sonucu elde edilen koşullar....	58
Çizelge 4.6. β -gluM13'ün karbonhidrat, lipit, protein ve β -glukan miktarı	60
Çizelge 4.7. <i>L. plantarum</i> GD2 suşunun farklı besi ortamlarındaki canlı hücre sayısı ..	61
Çizelge 4.8. <i>B. bifidum</i> A12 suşunun farklı besi ortamlarındaki canlı hücre sayısı	62
Çizelge 4.9. <i>S. cerevisiae</i> BD1 suşunun farklı besi ortamlarındaki canlı hücre sayısı ...	63
Çizelge 4.10. <i>L. plantarum</i> GD2 suşunun farklı konsantrasyonlarda β -gluM13 içeren besi ortamlarındaki canlı hücre sayısı.....	63
Çizelge 4.11. <i>B. bifidum</i> A12 suşunun farklı konsantrasyonlarda β -gluM13 içeren besi ortamlarındaki canlı hücre sayısı	64
Çizelge 4.12. <i>S. cerevisiae</i> BD1 suşunun farklı konsantrasyonlarda β -gluM13 içeren besi ortamlarındaki canlı hücre sayısı	65

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.13. β -gluM13'ün 1,1-difenil-2-pikrilhidraz (DPPH) radikalini giderme etkisi.....	66
Çizelge 4.14. Farklı konsantrasyonlarda β -gluM13'ün yapay mide ve yapay bağırsak sıvısındaki hidroliz yüzdeleri.....	68



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Tipik bir maya hücresinin temel özellikleri.....	6
Şekil 2.2. Maya hücre duvarı yapısı.....	7
Şekil 2.3. Kitin yapısı.....	8
Şekil 2.4. Mannoprotein yapısı	9
Şekil 2.5. β -glukanın kimyasal yapısı	10
Şekil 2.6. β -(1,3)-glukan yapısı	11
Şekil 2.7. β -(1,6)-glukan yapısı	13
Şekil 3.1. Glukoz standart eğrisi	39
Şekil 3.2. Protein standart eğrisi	40
Şekil 4.1. <i>Pichia kudriavzevii</i> maya suşlarında β -glukan miktarları (%)	59
Şekil 4.2. β -gluM13'ün 1,1-difenil-2-pikrilhidraz (DPPH) radikalini giderme etkisinin askorbikası ile kıyaslanması	67

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Liyofilize edilmiş β -glukan örneği	36
Resim 3.2. Lipit içeriğinin reflüks cihazı ile belirlenmesi	41
Resim 3.3. <i>L. plantarum</i> GD2 suşunda canlı hücre sayımı	43
Resim 4.1. Çalışmada kullanılan <i>P. kudriavzevii</i> M10 maya suşunun ışık mikroskopundaki görüntüsü (100X)	49
Resim 4.2. Farklı miktarlarda NaClO_2 ile muamele edilen <i>P. kudriavzevii</i> M10 maya suşunun mikroskopik görüntüsü.	51
Resim 4.3. Sıcak su banyosunda bekletilen <i>P. kudriavzevii</i> M10 maya suşunun mikroskopik görüntüsü	52
Resim 4.4. Cam boncukla muamele edilen <i>P. kudriavzevii</i> M10 maya suşunun mikroskopik görüntüsü	53
Resim 4.5. Vorteks uygulanmayan (A) ve uygulanan (B) <i>P. kudriavzevii</i> M10 maya suşunun mikroskopik görüntüsü	54
Resim 4.6. Farklı sonikasyon çözeltisi uygulanan <i>P. kudriavzevii</i> M10 maya suşunun mikroskopik görüntüsü	55
Resim 4.7. Farklı miktarlarda sonike edilen <i>P. kudriavzevii</i> M10 maya suşunun mikroskopik görüntüsü	55
Resim 4.8. Farklı sürelerde sonike edilen <i>P. kudriavzevii</i> M10 maya suşunun mikroskopik görüntüsü	56
Resim 4.9. <i>P. kudriavzevii</i> M10 suşundaki glukan ekstraksiyonunun aşamalarının mikroskopik görüntüsü	57
Resim 4.10. <i>Pichia kudriavzevii</i> maya suşlarında β -glukan örnekleri.....	59
Resim 4.11. β -gluM13'ün 1,1-difenil-2-pikrilhidraz (DPPH) radikalini giderme etkisi	66

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
Da	Dalton
g	Gram
kDa	Kilodalton
L	Litre
m	Metre
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
pH	Asitlik bazlık birimi
α	Alfa
β	Beta
μ g	Mikrogram
μ L	Mikrolitre
μ m	Mikrometre

Kısaltmalar	Açıklamalar
ATCC	Amerikan Kültür Koleksiyonu
BGD	Bifido Gelişimi Düzenleyicisi
cfu	Koloni Oluşturan Birim
CO ₂	Karbondioksit

Kısaltmalar**Açıklamalar**

dk.	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EPS	Ekzopolisakkarit
L-EPS	Liyofilize Ekzopolisakkarit
LGD	Laktobasil Gelişimi Düzenleyicisi
MGD	Maya Gelişimi Düzenleyicisi
MRS	De Man, Rogosa and Sharpe
OD	Optik Yoğunluk
rpm	Dakikada Devir Sayısı
SD	Standart Sapma
SF	Serum Fizyolojik
sn.	Saniye
sp.	Tür
β-gluM13	<i>P. kudriavzevii</i> M13 ekstaksiyonu β -glukanı

1. GİRİŞ

Mayaların binlerce yıldır insanlığa büyük fayda sağladığı bilinmektedir. Gıda, tıp ve tarım disiplinlerinde geniş kapsamlı temel ve endüstriyel öneme sahiptirler. Mayaların geleneksel endüstriyel özellikleri, bira, şarap, damıtılmış alkollü içkiler, unlu mamuller, peynir, sosis ve diğer fermente gıdalar gibi, birçok gıda fermantasyonundaki birincil rolleri içermektedir. Mayaların yer aldığı diğer endüstriyel işlemler, yakıt etanolü, tek hücre proteini (THP), β -glukanlar, yemler, endüstriyel enzimler ve küçük moleküler ağırlıklı metabolitlerin üretimidir. Maya türleri, biyoteknolojik alanda kullanılan organizmaların tartışmasız en önemli grubu ve en büyük üreticisidir (Johnson ve Erasun, 2011).

Maya hücre duvarı β -glukan (%29-64), mannan (%31), protein (%13), lipit (%9) ve kitinden (%1-2) oluşmaktadır. Maya hücre duvarının ana aktif bileşenleri β -glukan'lar ve mannoproteinler olarak bilinen mannanlardır. Maya hücre duvarındaki β -glukan ve mannan, vücudun spesifik olmayan bağışıklığını uyarmak için makrofajlar üzerinde etkili bir rol oynamaktadır (Korolenko, Bgatova ve Vetvicka, 2019). β -glukanlar, fagositoz, süperoksit anyon üretimi, lizozim aktivitesi, sitokin üretiminin düzenlenmesi, interlökin 1'in ekspresyonu, kompleman aktivitesi gibi kayda değer immünolojik performanslar göstermektedirler (Selvaraj, Sampath ve Sekar, 2005). Araştırmalar, β -glukan'ın bağırsak ortamını iyileştirebileceğini, doğuştan gelen ve edinilmiş bağışıklığı uyardığını, mikotoksinleri adsorbe edebileceğini, yara iyileşmesini destekleyebileceğini, kanseri önleyebileceğini ve antioksidan aktiviteye sahip olduğunu doğrulamıştır (Zheng, Li, Wang, 2014; M Zhang, Cheung, L Zhang, 2001). Ayrıca hayvanlarda hastalıkları önlemek ve üretim performansını artırmak için de β -glukanlar önemli bir rol oynamaktadır. Son yıllarda β -glukanlar, insanlarda yara iyileştirme, anti-enfektif ilaçlar veya aşı adjuvanları olarak da kullanılmaktadırlar (Vetvicka ve Vetvickova, 2020; Korolenko, Bgatova ve Vetvicka, 2020; Sima, Venucci ve Vetcicka, 2018). β -glukan'ın biyolojik aktiviteleri, birincil ve gelişmiş yapısını kimyasal olarak değiştirerek veya polisakkaritlerin zincir uzunluğunu azaltarak geliştirilebilmektedir (Ishimoto ve diğerleri, 2018; Ishimoto ve diğerleri, 2017; Wang ve diğerleri, 2018). Ancak ilk aşamada β -glukan'ın doğru bir şekilde ekstrakte edilmesi çok önemlidir.

β -glukan'ların, insan sağlığı için yararlı özellikleri doğrultusunda, bu polisakkaridin izolasyonu ve saflaştırılması için birçok işlem geliştirilmiştir. Bunların çoğu, glukoz zincirlerinde daha çok bozulmaya, düşük verime ve sınırlı saflığın elde edilmesine neden olan sıcak alkali, asitler veya her ikisinin kombinasyonunu içermektedir (Magnani ve diğerleri, 2009). Bu yöntemler β -glukanlarda düşük verim ve sınırlı saflığa neden olduğundan sıcak su ve enzim kullanımını içeren başka metotlar önerilmiştir (Freimund ve diğerleri, 2003; Jaehrig ve diğerleri, 2008; Magnani ve diğerleri, 2009).

β -glukan'lar bağırsakta bulunan probiyotik mikroorganizmalar tarafından kullanılan önemli bir prebiyotiktir. Probiyotikler, yeterli miktarlarda uygulandığında konakçıya yarar sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır. Probiyotiklerin bağırsak mikrobiyotası üzerindeki faydası, mikroorganizmalar için daha uygun bir bağırsak ortamı oluşturaktan kaynaklanmaktadır (Hill ve diğerleri 2014; Gibson ve diğerleri 2017). Çoğunlukla nişasta olmayan polisakkaritler ve sindirim enzimleri tarafından zayıf bir şekilde sindirilen oligosakaritlerden oluşan prebiyotikler ise probiyotik mikroorganizmaları besleyen diyet maddeleridir. Probiyotik bakterilerin gelişimini teşvik ederler. Ortam koşullarından etkilenen probiyotiklerin aksine, prebiyotikler bisküvilerde, tahıllarda, çikolatada, ekmeğe sürülen yiyeceklerde ve süt ürünlerinde gıda bileşenleri olarak daha çok tercih edilmektedirler (Kumar ve diğerleri, 2012)

β -glukanlar, biyoteknolojik çalışmalarda kullanılan en yaygın prebiyotikler arasındadır. Sindirilemeyen lifler (prebiyotikler) veya probiyotik bakteriler (*Lactobacillus* sp ve *Bifidobacteria* gibi) açısından zengin diyet alımı veya her ikisinin karışımı kullanılarak, gastrointestinal sistem rahatsızlıklarının üstesinden gelinilebilmektedir (Pandya ve diğerleri, 2019). Bir prebiyotik, kolona ulaşabilmesi için midenin asidik pH'sını ve ince bağırsaklarda bulunan enzimleri tolere etmelidir. Ancak bu sayede kolonda, *Lactobacillus* ve *Bifidobacteria* gibi belirli spesifik probiyotik bakterilerin büyümesini artırabilirler (Kerry ve diğerleri, 2018). Prebiyotikler ayrıca, antitümör ve kolesterol düşürücü aktiviteler (Kumar ve diğerleri, 2012) gibi sağlığı geliştirici birçok fayda sağlayabilmektedir. Ayrıca, probiyotik bakteriler tarafından, prebiyotiklerin fermentasyonu sonucu, bağırsakta istenmeyen patojenik bakterilerin baskılanmasına yardımcı olan kısa zincirli yağ asitleri (SCFA) ve laktat oluşmaktadır (Kumar ve diğerleri, 2012).

β -glukan üzerinde yapılan araştırmaların çoğunda bitki kaynaklı β -glukan'lar kullanılmıştır. Bitkilerden elde edilen β -glukanın, immün sistemi geliştirici, kolesterol dūřürücü, kanser önleyici, koroner kalp hastalıklarını önleyici, anti diyabetik, yara iyileştirici, antioksidant ve enfeksiyon önleyici etkilerinin belirlendiğı birçok çalışmanın yanı sıra soğuk algınlığı, grip, yaşlanma, H1N1 (domuz gribi), kulak enfeksiyonları, hepatit, Lyme hastalığı, alerji, astım, ülseratif kolit ve Crohn hastalığı, fibromiyalji, romatoid artrit ve çoklu skleroz, HIV / AIDS gibi hastalıklara karşı da direnç mekanizması oluşturduğı çalışmalarla desteklenmiştir (Murphy, Rezoagli, Major, Rowan, ve Laffey, 2020; Bezerra ve diğeri, 2021; Kremmyda ve diğeri, 2021). Maya β -glukanları ile yapılan çalışmalar ise bitkilerden elde edilenlere kıyasla daha azdır (Geraldelli ve diğeri, 2020). Mayadan ekstrakte edilen β -glukanların, özellikle prebiyotik özelliklerinin ve gastrointestinal sisteme dayanıklılıklarının belirlendiğı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. *Pichia kudriavzevii* maya suşlarına ait β -glukan üzerine gerçekleştirilen bu tez çalışmasında,

- 1- Gazi Üniversitesi Fen Fakóltesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı Kùltür Koleksiyonu'nda bulunan, peynirden izole edilen ve 18SrRNA analizi ile tanımlanmış probiyotik beş farklı *Pichia kudriavzevii* maya suşlarının hücre duvarından β -glukanın yüksek verimde ve saflıkta ekstrakte edilmesi amacıyla en iyi gelişim gösteren M10 suşunda farklı koşullarda ekstraksiyonunun optimize edilmesi,
- 2- Belirlenen optimum ekstraksiyon koşulunda; beş farklı *P. kudriavzevii* maya suşunun hücre duvarından β -glukanın ekstrakte edilerek, liyofilize edilen β -glukanların miktar tayinlerinin yapılması,
- 3- Yüksek β -glukan aktivitesi gösteren *P. kudriavzevii* M13 maya suşundan elde edilen β -glukanın (β -gluM13) prebiyotik özelliklerinin belirlenmesi,
- 4- β -gluM13'ün antioksidan etkisinin tespit edilmesi,
- 5- β -gluM13'ün yapay mide ve bağırsak sıvılarında hidroliz olma durumlarının belirlenmesi hedeflenmiştir.

Bu tez alışması Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri 05/19-2020 kodlu projesi tarafından desteklenmiş olup, probiyotik *Pichia kudriavzevii* maya hücre duvarından ekstrakte edilen β -glukanın ekstaksiyonunun optimize edilerek prebiyotik özelliklerinin ve gastrointestinal sisteme dayanıklılığının belirlendiğı ÷lkemizde ve dñnyadaki ilk çalışmadır. Ekstrakte edilme koşulları optimize edilmiş bir maya β -glukanın (β -gluM13) prebiyotik özelliklerinin belirlenmesi ile β -gluM13'ün biyoteknolojik kullanımının önñ açılacaktır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

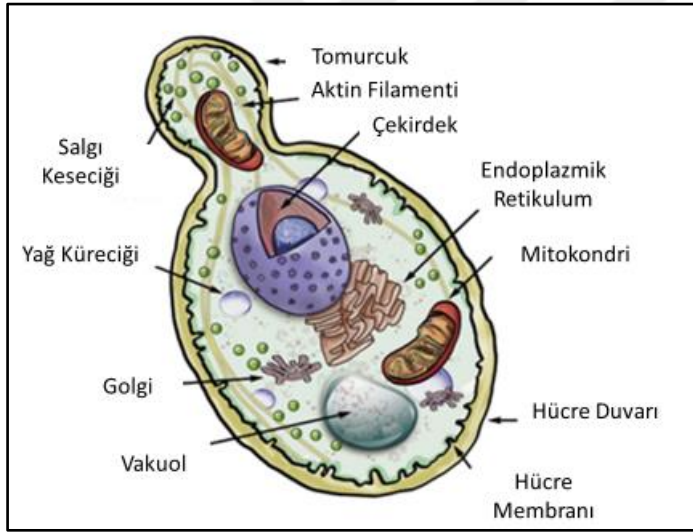
2.1. Mayalar ve Tarihçesi

Antik çağlardan bu yana mayaların işlenmesiyle üretilen fermente içecekler ve yiyecekler, toplumların kalkınmasına önemli katkı sağlamıştır (Legras, Merdinoğlu, Cornuet ve Karst, 2007; Ulber ve Soyez, 2004). Mayaların birçok alanda kullanımı, insanlık tarihinde önemli bir rol oynamıştır. Arkeologların yaptığı incelemeler sonucunda, mayalar tarafından üretilen alkollü fermente içeceklerin Çin, İran ve Mısır gibi dünyanın birçok yerinde, Neolitik çağlarda (MÖ 8500-4000) tüketildiğine dair kanıtlara ulaşılmıştır (Ulber ve Soyez, 2004). Çeşitli bölgelerde mayalı ekmekler, soya, pirinç, sebzelerden çeşitli fermente yiyecekler ve içecekler gibi pek çok fermente gıda da Neolitik dönemlerde ortaya çıkmıştır (Aidoo, Rob ve Sarkar 2006; Hui ve diğerleri, 2004; Steinkraus 2004). Fermente içecek ve gıda üretimi, tarımın başlangıcına paralel olarak gerçekleşmiş ve insanların uzun yıllar beslenmesine imkân sağlamıştır (Legras ve diğerleri, 2007; Ulber ve Soyez, 2004). Tarihsel kanıtlar, fermente içeceklerin ve yiyeceklerin mevcudiyetinin, insanların coğrafi alanlara yerleşmeleri ve tarımla uğraşmaları için önemli bir motivasyon kaynağı olduğunu göstermektedir (Johnson ve Erasun, 2011).

Gıda ve alkollü fermantasyonlarda kullanılan birçok teknoloji ve teknik bilgi, en eski biyoteknolojik metotları içeren uygulamalardan köken almaktadır (Straathof ve Adlercreutz, 2000). Fermantasyonların bilimsel ve teknolojik olarak kullanımı, öncelikle Louis Pasteur'un (1822-1895) yapmış olduğu deneysel araştırmalarla aydınlatılmıştır. Şarap ve bira fermantasyonları üzerine yaptığı çalışmalarda, 1876'da şekerlerden alkol oluşumundan mikroorganizmaların sorumlu olduğunu bildirmiştir (Barnett, 2000). Pasteur ayrıca aseptik koşullar kavramını anlamlandırmıştır. "Kötü" fermantasyon sorunlarını çözmeye yardımcı olmak için saf kültürler kullanarak alkol fermantasyonu ile mayaların aerobik büyümesi arasındaki ayrımın farkına varılması için birçok çalışma yapmıştır. Bunların yanı sıra üzüm suyunun aşılınması için doğal bir kaynak sağlayan üzümlerin yüzeyinde şarap yapımını sağlayan mayaların varlığından da bahsetmiştir (Johnson ve Erasun, 2011).

2.2. Maya Hücresi ve Organelleri

Maya hücreleri, diğer ökaryotik hücrelerde olduğu gibi dayanıklı bir yapıya ve zara bağlı organellere sahiptirler (Şekil 2.1). Çoğunlukla, 'maya' ve '*Saccharomyces cerevisiae*' kelimeleri eşanlamlı olarak kullanılmaktadır. *Saccharomyces*, Yunancada 'şeker mantarı' anlamına gelmektedir. Maya hücreleri, hücre boyutu, şekli ve rengi açısından büyük bir çeşitliliğe sahiptir. Mayaların hücre boyutu 2–3 µm uzunluğundan 20–50 µm'ye kadar değişebilmekte ve 1–10 µm çapında olabilmektedirler. Maya hücreleri; hücre duvarı, çekirdek ve sitoplazmadan meydana gelmektedir. Oval, küresel, silindir, limon, eliptik görünümde olabilirler. Çoğunlukla misel oluşturmazlar. Maya hücre duvarı, yaklaşık 100–200 nm kalınlığında sert bir yapıya sahiptir ve hücrenin toplam kuru kütleinin yaklaşık %25'ini oluşturur. Hücre duvarını, makromoleküller, glikoproteinler (mannoproteinler), β-glukanlar ve kitin oluşturmaktadır (Tofalo, Perpertuni, Schirone ve Suzzi, 2016).

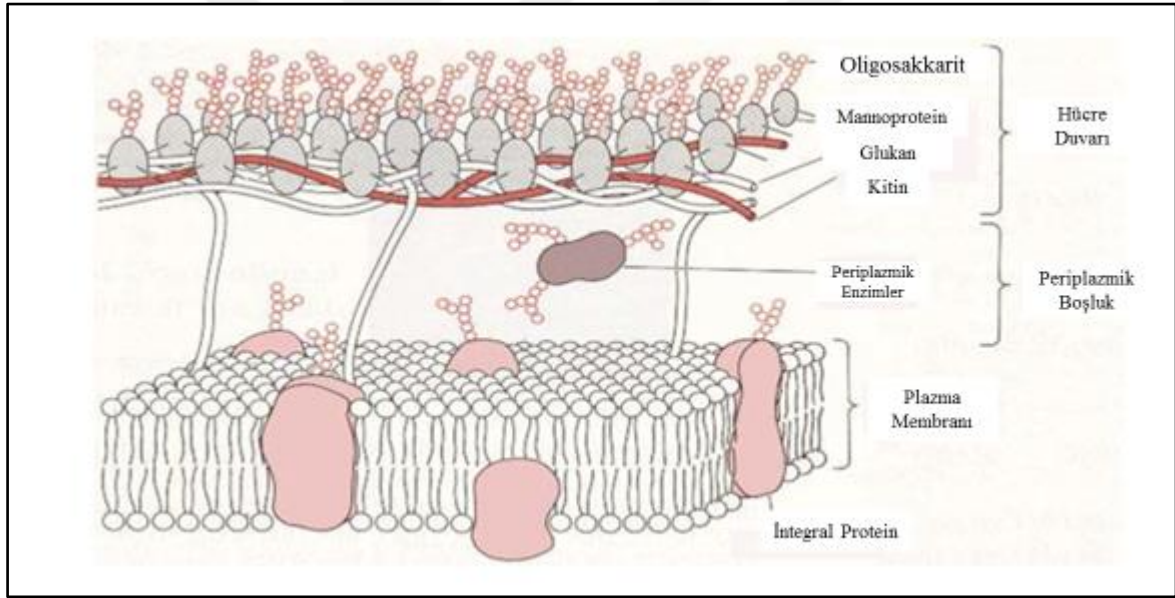


Şekil 2.1. Tipik bir maya hücresinin temel özellikleri (Speers ve Forbes, 2015)

2.3. Maya Hücre Duvarının Bileşimi ve Özellikleri

Hücre duvarı, elastik yapıya sahip, mikroorganizmaya ozmotik destek ve fiziksel koruma sağlayan önemli bir yapıdır. Elastik yapıda olması hücre şeklinin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Negatif-Boyama teknikleri kullanılarak duvarın elektron mikroskopuyla incelenmesi sonucunda, mayanın büyüme koşullarına ve genetik özelliklerine bağlı olarak farklılaşabilen hücre duvarının, yaklaşık 70-100 nm kalınlığında iç tabaka ve dış tabaka olmak üzere iki katmanlı bir yapıya (Şekil 2.2) sahip olduğu gözlemlenmiştir (Klis, Mol,

Hellingwerf ve Brul, 2002). Duvarın mekanik mukavemeti esas olarak β -1,3-glukan ve kitinden oluşan ve duvar kuru ağırlığının yaklaşık %50-60'ını temsil eden iç tabakadan kaynaklanmaktadır (Çizelge 2.4). Hücre yüzeyinden yayılan glukozile edilmiş mannoproteinlerden oluşan dış katman hücre-hücre tanıma olaylarında rol oynar (Reynolds ve Fink, 2001). Hücre yüzey proteinlerinin karbonhidrat yan zincirleri, fizyolojik pH değerlerinde hücre yüzeyinde çok sayıda negatif yüke neden olan çoklu fosfodiester köprüler içerir. Bu yan zincirler, duvarın hidrofilik özelliklerinden sorumludur ve su tutma özelliğinin korunmasında rol oynayabilir (Jigami ve Odani, 1999). Dış protein tabakası, duvar kuru ağırlığının yaklaşık üçte birini oluşturur. Hücre duvarı proteinleri, β -(1,3)-glukan-kitin ağına ya dolaylı olarak ya da β -1,6-glukan yoluyla doğrudan bağlanır. Ek olarak, bazı proteinler, diğer hücre duvarı proteinlerine disülfid bağı ile bağlanabilmektedir (Moukadiri, Jafaar ve Zueco, 1999).



Şekil 2.2. Maya hücre duvarı yapısı (Klis ve diğerleri, 2002)

Maya hücre duvarı oldukça esnek bir yapıya sahiptir. Maya hücreleri hipertonic çözeltiye aktarıldıklarında hızla küçülürler ve ozmotik strese bağlı olarak başlangıç hacimlerinin %60'ından fazlasını kaybedebilirler. Bu işlemin aksine hipotonik ortama geri aktarıldıklarında, hücreler hemen hemen ilk hacmine kadar genişleyebilmektedir. Duvarın bu esnekliği β -1,3-glukan zincirlerinin elastik özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Canlı hücre duvarlarının, izole edilmiş hücre duvarlarından daha geçirgen olması da canlı hücrelerin duvarında bulunan β -1,3-glukan zincirlerinden kaynaklanmaktadır. İzole edilmiş hücre duvarı ancak 760 Da'a kadar olan molekülleri geçirebilirken canlı hücre duvarları ise

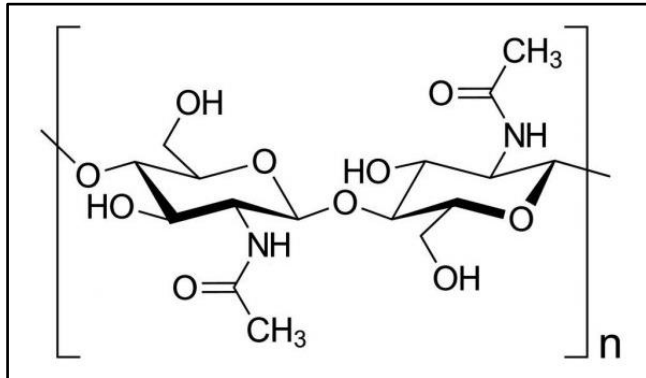
özellikle hipotonik koşullar altında ve büyüme koşullarına bağlı olarak çok daha büyük moleküllere daha fazla geçirgendir (Klis ve diğerleri, 2002).

Çizelge 2.1. Maya hücre duvar makromolekülleri, kuru ağırlık yüzdeleri ve bu moleküllerin sentezlendikleri bölgeler (Klis ve diğerleri, 2002).

Maya Hücre Duvarı Bileşenleri		
Makromoleküller	Kuru Ağırlık (%)	Sentez Bölgesi
Kitin	1-2	Plazma Membranı
Mannoproteinler	35-40	Salgı Yolu
β -1,3-Glukan	50-55	Plazma Membranı
β -1,6-Glukan	5-10	Plazma Membranı

2.3.1. Kitin

Kitin uzun lineer zincir yapılı, hücre duvarının yan duvarlarında homojen bir şekilde dağılmış maya hücre duvarında yapısal önem taşıyan bir polisakkarittir (Cabib, Roh, Schmidt, Crotti ve Varma, 2001) (Şekil 2.3). Kitin zincirleri yaklaşık olarak 100-190 N-asetilglukozamin monomer birimlerinden oluşur. Hücre duvarında yer alan kitin zincirlerinin %50'si kitin polimerinin indirgen ucunda bulunan β -1,4-bağı aracılığıyla β -1,3-glukanların indirgen olmayan uçlarına bağlanarak hücre duvarına dayanıklılık sağlarlar (Klis ve diğerleri, 2002; Lesage ve Bussey, 2006; Bowman ve Free, 2006). Kitin, hücre duvarına verdiği esnekliğin yanı sıra mayaların tomurcuklanma yoluyla çoğalmalarında ve hücre duvar materyallerinin bazik ortamda çözünmesinin önlenmesinde de önemli rol oynamaktadır. Kitin varlığı duvarın düzenli, ozmotik basınca dayanıklı bir yapıda olmasında büyük bir öneme sahiptir (Bowman ve Free, 2006).

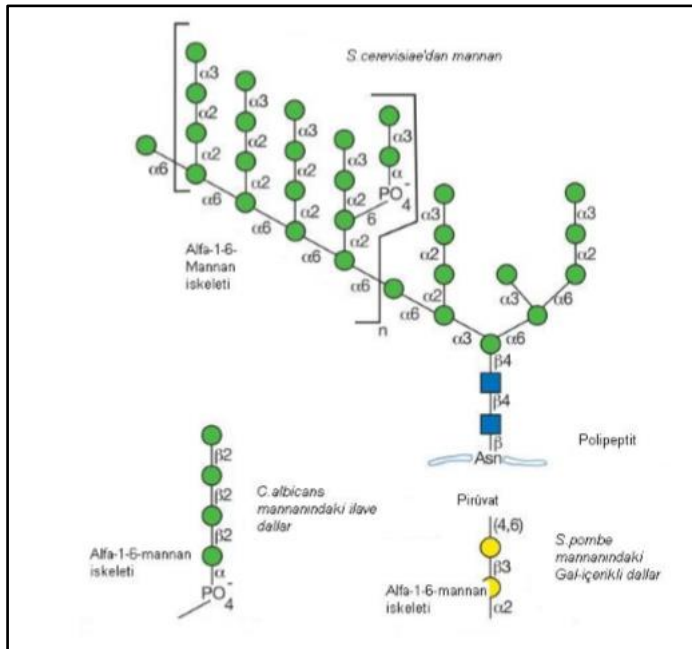


Şekil 2.3. Kitin yapısı (Shirvan, Shakeri ve Bashari, 2019)

Kitin sentezi üç enzim tarafından gerçekleştirilmektedir. Plazma membranında Chs1p, Chs2p ve Chs3p alt birimlerini içeren CS1, CS2, CS3 enzimleri bulunmaktadır (Cabib ve diğerleri, 2001). Kitin sentezi, üridin difosfat UDP-N-asetilglukozaminden dallanmış kitin zincirlerine, kitin sentezini gerçekleştiren enzimlerin katalizör olarak görev yapmasıyla gerçekleşmektedir (Bowman ve Free, 2006; Lesage ve Bussey, 2006)

2.3.2. Duvar proteinleri

Hücre duvarının en dış katmanını oluşturan mannoproteinler, %90'ın üzerine çıkan bir karbonhidrat fraksiyonu ile yüksek oranda glukozile edilirler. Maya sakızı olarak da bilinen mannoproteinler protein ve mannanlardan meydana gelen kompleks yapıli bileşiklerdir (Şekil 2.4). Mannan suda çözünabilen, (1-2)-D-mannoz ve (1-3)-D-mannoz'un bağlandığı bir yan zincir, α -(1-6)-D-mannoz bağlı birimlerin bağlanmasından meydana gelen bir polisakkarittir. Hücre duvarının %5-50'si proteinlerden meydana gelirken, mannanların da yaklaşık %10'u proteinden oluşmaktadır. Mannan oluşumunda minimum miktarlarda fosfat, glukoz, glukozamin ve iz miktarda aminoasit ve azot gerekmektedir (Klis ve diğerleri, 2002).



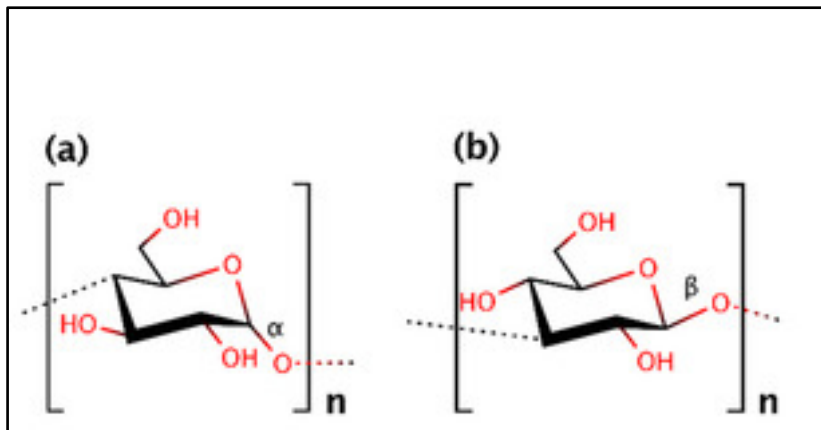
Şekil 2.4. Mannoprotein yapısı (Bacic, Fincher ve Stone, 2009)

Mannoproteinlerin dış tabakası, makromoleküller için iç fibriler tabakadan çok daha az geçirgendir. Bu, büyük ölçüde, asparajin kalıntılarına bağlı uzun ve çok dallı karbonhidrat

yan zincirlerinin varlığından ve disülfür köprülerinin varlığından kaynaklanmaktadır. Kısa oligomannosil zincirleri taşıyabilen serin ve treonin kalıntıları sıklıkla kümelenir. Hem N- hem de O- bağlı mannosil yan zincirlerindeki fosfodiester köprüler nedeniyle, mayanın hücre yüzeyi çok sayıda negatif yük içerir. Hücre duvarının negatif yüke sahip olması yalnızca pozitif yüklü proteinlerin bağlanmasına sebep olacağı için hücre duvarına dayanıklılık ve seçici- geçirgen bir özellik sağlamaktadır (Ibeas ve diğerleri, 2000).

2.3.3. β -glukan' nın yapısı ve özellikleri

β -glukan, genel formülü $(C_6H_{10}O_5)_n$ olan, β -glukozidik bağlarla birbirine bağlanmış D-glukoz monomerlerinden oluşan bir polisakkarit moleküldür. Beta ve alfa olmak üzere iki farklı tipte bulunan glukozidik bağın tipini, C-1'deki $-OH$ grubunun bulunduğu konum belirlemektedir. Eğer anomerik karbonun hidroksil grubu CH_2OH grubuna göre cis konumundaysa, şeker bir beta anomeridir. Eğer anomerik karbonun hidroksil grubu CH_2OH grubuna göre trans konumundaysa, şeker bir alfa anomeridir. Diğer bir ifadeyle glukoz molekülü, C-1'e bağlı olan hidroksil grubunun halka düzleminin altında olduğu durumda α ; halka düzleminin üstünde olduğu durumda ise β yapısında bulunmaktadır. C-1'de konumlanan $-OH$ grubunun pozisyonu α pozisyonu ise α -glukozidik bağ, β pozisyonu ise β -glukozidik bağ oluşmaktadır (Şekil 2.5). Alfa glukozidik bağlarla bağlanmış moleküller, metabolizmada kolayca değişirken, beta glukozidik bağlar hücre duvarının yapısını daha da güçlendirirler (Rahar, Swami, Nagpal ve Singh, 2011).



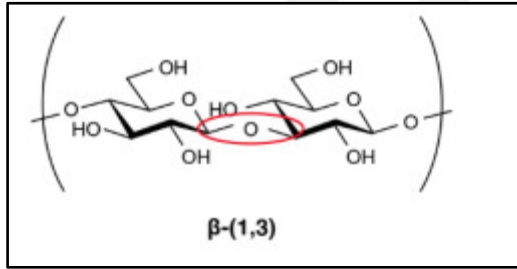
Şekil 2.5. β -glukanın kimyasal yapısı: (a) α -(1,4)glukan; (b) β -(1,3)glukan (Papaspıridi, Zerva ve Topakas, 2018).

Ekmek mayasından elde edilen β - glukan, β -(1 $\rightarrow$ 3) ve (1 $\rightarrow$ 6) bağlantılarından oluşur. Bununla birlikte, tahıllardan türetilen diğer β -glukanlar, β -(1 $\rightarrow$ 3) ve β -(1 $\rightarrow$ 4) bağlantıları

olan glukoz kalıntılarının oluşturduğu polisakkaritleridir. Selüloz β -(1 $\rightarrow$ 4) bağlarından, curdlan ise β -(1 $\rightarrow$ 3) bağlarından oluşan bir bağ yapısına sahiptir. Likenden elde edilen β -glukanlar, β -(1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 4) veya β -(1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6) bağlı β -glukanlar içerebilirler. Mantar β -glukanları, bağışıklık sistemi güçlendirici ve bir anti-tümör maddesi olarak etkinlik göstermektedirler. Tahıllardan elde edilen β -glukan, kolesterolü ve kan şekerini düşürmeye yardımcı olur (Zhu, Du ve Xu, 2016).

β -(1,3)-glukan ağı

Hücre duvarının mekaniksel dayanıklılığı, anilin mavisi ile boyanabilen β -1,3-glukanların varlığına bağlıdır (Beauvais ve diğerleri, 2001). β -1,3-glukan zincirleri, çukur, içi boş heliks yapıdadır; heliks yapısı, hücre duvarının yukarıda bahsedilen esnekliğini açıklar (Şekil 2.6). Birçok çalışma β -1,3-glukanın sarmal bir yapısı olduğunu, canlı hücreler üzerinde ^{13}C -NMR analizi yaparak doğrulamıştır (Klis ve diğerleri, 2002; Lesage ve Bussey, 2006; Lipke ve Ovalle, 1998; Klis ve diğerleri, 2006).



Şekil 2.6. β -(1,3)-glukan yapısı (Diekjürgen ve Grainger, 2017)

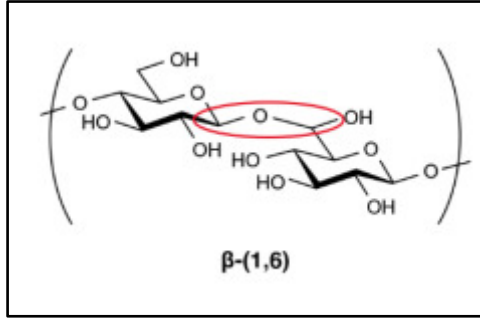
β -1,3-glukan hücre duvarında hafif kristalsi bir yapıya sahiptir. Durağan faz evresindeki canlı maya hücrelerinde, β -1,3-glukan molekülleri yaklaşık olarak 1500 glukoz monomerinden oluşurken, ekstraksiyon prosedürü uygulanmış hücre duvarında glukan zincirlerinin hidrolizi sonucu bu sayıda azalmalar meydana gelmektedir. Uzun glukan zincirlerinde, dallanmış bir yapı oluşturmak için 40-50 glukoz biriminden meydana gelen 6. karbon bölgelerine β -1,3-glukan ilavesinin yapılması gerekmektedir. Ekstraksiyon için kullanılan asit tipine bağlı olarak da monomerlerin daha yüksek polimerizasyon derecesine sahip olabileceği bildirilmiştir. Polimerizasyon derecesi kullanılan asit tipinin yanı sıra, çevresel koşullara da bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir, çünkü maya hücreleri, büyüme fazına ve karbon kaynağına bağlı olarak β -1,3-glukan sentaz kompleksi kullanılmaktadırlar. Maya hücrelerinin olgun formlarında ise, durağan faz hücrelerine kıyasla β -1,3-glukan zincirleri orta derecede dallıdır ve yaklaşık %3-4 β -1,6'ya bağlı glukoz kalıntısı

içerir. Mayaların gelişim evreleri ve büyüme koşullarının β -1,3-glukanların dallanma derecesi üzerinde önemli bir etkisinin olduğu gösterilmiştir (Klis ve diğerleri, 2002; Lesage ve Bussey, 2006; Lipke ve Ovalle, 1998; Klis ve diğerleri, 2006).

β -1,3-glukanlarda kesintisiz zincir segmentlerinin varlığı, zincirler arasında birliğin oluşmasını sağlamaktadır ve bu birlik β -1,3-glukanların üç boyutlu bir yapı meydana getirmesinde önemli bir rol oynar. Hücre duvarı üzerinde negatif boyama teknikleri uygulanarak elde edilen mikroskop görüntüleri; β -1,3-glukan ağlarının 20-60 nm genişliğinde ve ince bir yapıda olduğunu ortaya koymaktadır. Hücre duvarının ekstrakte edilmesiyle elde edilen β -1,3-glukanların por çapları, canlı hücre duvarında bulunan porlarda daha geniş olduğu için, yalnızca çok büyük proteinlerin geçirgenliğinde sınırlayıcı bir etki olduğu gösterilmiştir (De Nobel, Van Den Ende ve Klis, 2000).

β -(1,6)-Glukan

β -1,6-glukan olgun formunda, ortalama olarak yaklaşık 130 glukoz monomeri içeren, oldukça dallı, suda çözünür amorf yapılu bir polimerdir. Glukozil fosfatidil inositol (GPI) varlığıyla β -1,6-glukan hücre duvarı proteinleri β -1,3-glukan ağına bağlanır. Bu bağlanma, hücre duvarı ağ sisteminde GPI-1,6-glukan-1,3-glukan kompleksinin oluşmasına sebebiyet verir. Hücre duvarındaki β -1,6-glukan seviyelerini etkileyen birkaç gen tanımlanmıştır (Shahinian ve Bussey, 2000). Bu çalışmalardan, çeşitli endoplazmik retikulumde, golgide ve hücre yüzeyine yerleşik proteinlerin, hücre duvarındaki β -1,6-glukan seviyelerini güçlü bir şekilde etkilediği ortaya çıkmıştır. Bu (i) β -1,6-glukanın biyogenezi, ER'de başlayan aşamalı bir süreçtir; (ii) β -1,6-glukan sentezi plazma zarında gerçekleşir ancak bir primerin aşamalı sentezini gerektirir veya (iii) β -1,6-glukan sentezi plazma membranında gerçekleşir, ancak sentezleme kompleksinin aktivitesinin, salgılama yolundaki çeşitli kusurlara karşı oldukça hassas olduğu şeklinde yorumlanmaktadır. Ancak son zamanlarda yapılan *in vitro* çalışmalar β -1,6-glukan sentezinde rol oynayan genler hakkında daha fazla bilgi vermektedir. Kre9 ailesi Knh1p ve Kre9p olmak üzere iki salgı proteininden oluşmaktadır. Kre9elta mutantıyla oluşturulan β -1,6-glukanın normalden daha küçük bir yapıya sahip olduğu gözlenmiş ve bunun sonucunda β -1,6-glukan sentezinden Knh1p ve Kre9p'nin doğrudan rol aldığı ispatlanmıştır (Klis ve diğerleri, 2006).



Şekil 2.7. β -(1,6)-glukan yapısı (Shahinian ve Bussey, 2000).

2.3.4. β -glukan kaynakları

Yulaf başta olmak üzere çeşitli tahıllar, mantarlar, bazı bakteriler ve algler hücre duvarı bileşeni olarak β -glukan içermektedirler. Çizelge 2.2’de farklı kimyasal bağlantı yerlerine sahip β -glukanların farklı kaynaklarda bulunduğu görülmektedir.

Çizelge 2.2. Farklı kaynaklardan elde edilen β -glukanlar ve kimyasal yapıları (Bacic, Fincher ve Stone, 2009)

Kimyasal Yapısı	Kaynak	Bilinen Adı
β -(1 $\rightarrow$ 3) glukan + mannoz+ galaktoz	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Pleuran
Lineer β -(1 $\rightarrow$ 3)	<i>Agrobacterium sp.</i>	Curdlan
Lineer β -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6) glikozil	<i>Laminaria sp.</i>	Laminarin
	<i>Schizophyllum commune</i>	Schizophyllan
	<i>Coriolus versicolor</i>	Coriolan
	<i>Lentinus edodes</i>	Lentinan
Lineer β -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)	<i>Hordeum vulgare</i> <i>Avena sativa</i> <i>Triticum vulgare</i>	Tahıl Glukanları
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Mantar Hücre Duvarı Glukanı
Dallanmış β -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Maya hücre duvarı glukanı
	<i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>	Mantar hücre duvarı glukanı

2.4. Maya β -glukanların İzolasyon Süreci

Mikroorganizmalar besin maddesi başta olmak üzere, kimya ve ilaç sanayisinde çok sayıda maddenin üretilmesine imkân sağlayan küçük morfolojili canlılardır. β -glukan üretiminde önemli rol oynayan mayalar ökaryotik mikroorganizma sınıfına ait canlılardır. Maya

hücreleri gelişimleri için enerjiye ve besine ihtiyaç duyarlar. Mayaların üreyebilmeleri ve gelişebilmeleri için gerekli olan besi ortamında, madensel tuzlar, suda çözünmüş azotlu bileşikler ve karbonhidratlar bulunmalıdır. Ayrıca mayaların temel gereksinimlerinden biri de oksijendir. Maya hücresi ortamda etanol açığa çıkmadan gelişebilmek için oksijeni ve şekeri kullanır. Ortamda yeterli oksijenin bulunmaması durumunda maya etanol üreterek çoğalmaya devam eder. Ortamda yüksek oranda etanol varlığı, maya açısından toksik bir etkiye neden olmaktadır ve bu mayalar için istenmeyen bir durumdur. Bu nedenle mayaların üretim aşamasında, bulunan şeker ve oksijen miktarı yeterli oranda bulunmalı ve etanol oluşumunun da minimum miktarda olması gerekmektedir. β -glukan üretimi açısından; maya hücreleri oksijen bakımından zengin bir ortamda, sıcaklık, havalandırma, besi ortamı bileşimi, pH, biyoreaktör ve substrat derişimi işletim türü gibi uygun koşulların sağlanmasıyla çoğaltılmalıdır (Johnson ve Erasun, 2011).

Uygun koşullarda geliştirilen mayaların hücre duvarlarının parçalanmasıyla, istenilen fraksiyonları izole etmek ve istenmeyen bileşikleri uzaklaştırmak gerekmektedir. Ekmek mayası *S. cerevisiae*'nin hücre duvarından β -D-(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-glukanın saflaştırma işlemi sırasında, proteinler, lipitler, nükleik asitler, mineraller ve mannanlar büyük oranda ortamdaki uzaklaştırılmaktadır (Hunter, Gault ve Barner, 2002).

Yapılan izolasyon işlemleri, β -glukan'ın fizyolojik ve sağlık yararlısı olmasını sağlayan moleküler özelliklerini, yapısal ve işlevsel özellikleri dahil olmak üzere birçok özelliği etkileyebilmektedir. Mayaların ve mantar β -glukan'larının biyolojik aktiviteleri nedeniyle, gıda maddelerine kolayca dahil edilebilen bir prebiyotik bileşen elde etmek için yakın zamanda birçok ekstraksiyon yöntemi ile literatüre kazandırılmıştır (Liu ve diğerleri, 2021).

2.4.1. Ekstraksiyon yöntemleri

Ekstraksiyon işlemi, çözünmeyen β -glukanların, hücre duvarının küresel şeklinin korunduğu (Soto, Kim, Lee, Kornfeld ve Ostroff, 2010; Plavcová ve diğerleri, 2019) ve hücre duvarının mekanik etkenlerle parçalanıp, hücre içeriğinin çıkarılıp kullanıma uygun hale getirildiği yöntemlerdir (Bzducha-Wróbel ve diğerleri, 2014; Liu X.Y., Wang, Cui ve Liu H.Z, 2008). Duvarın sertliği ve kalınlığı nedeniyle maya hücresi *S. cerevisiae* litik etkiye dirençlidir ve bazı işlemler hücre duvarını parçalamak için çok etkili değildir. Bu nedenle, pratikte, hücresel sertlikte bir azalmaya ek olarak, β -glukanların fibrilleri arasında bulunan amorf safsızlıkların giderilmesine de yol açan, ısı işlem gibi kombine yöntemler kullanılmaktadır (Magnani ve diğerleri, 2009). Alkali uygulamalar β -glukanların üç boyutlu yapısının bozulmadan mayalardan izolasyonunu ve saflaştırılmasını sağlayan, 125 °C'de sıcak su ve organik çözücülerle gerçekleştirilen metotlardır (Zechner-Krpan ve diğerleri, 2010; Sauter ve diğerleri, 2004). Eğer maya morfolojisinde herhangi bir bozunma meydana gelirse polimer zincirinin geri kazanımı, 55-60 °C'de kurutma ile sağlanabilmektedir (Xiao ve diğerleri, 2017). Büyük glukan kümeleri, sert çubuklar şeklinde düzenlenmiş sekiz adete kadar artabilen, üçlü spiral yapıya sahiptir (Gawronski, Park, Magee ve Conrad, 1999). Dışta bulunan manoprotein yapıları sayesinde, ekstraksiyondan sonra hücresel bileşenleri ortadan kaldıran muamelelere karşı belirli bir koruma sağlanır, bu da orijinal hücre ile aynı boyutları koruyan β -glukanlardan oluşan bütün, küresel, içi boş yapıların elde edilmesiyle sonuçlanır (Yan, Allendrof ve Brandley, 2005). NaOH ile muameleden sonra bile, glukan ekstraktının maya hücresi gibi küresel şeklini koruduğu gözlenmiştir (Zechner-Krpan ve diğerleri, 2010). β -glukanların yapısının ve konformasyonunun belirlenebilmesi için mikroskopik yöntemlerin yanı sıra daha ayrıntılı karakterizasyonu için nükleer manyetik rezonans spektroskopisi ve Fourier-dönüşümü kızılötesi spektroskopisi yapılmaktadır (Kim ve diğerleri, 2000; Galichet, Sockalingum, Belarbi ve Manfait, 2001).

2.4.2. Hücre parçalanması ve hücre duvarının kırılması

Hücre içeriğinden lizatin ayrıştırılması için birçok yöntem mevcuttur. Kimyasal, fiziksel veya enzimatik yollarla gerçekleştirilen glukan ekstraksiyonunda en işlevli yöntemler arasında 0,25-1 mm (Wheatcroft ve diğerleri, 2002) çaplarında cam boncuklarla öğütme, 55 °C'de otoliz (Liu ve diğerleri, 2008) ve enzim uygulaması gibi işlemler yer almaktadır (Javmen, Grigiskis ve Gliebute, 2012; Khoomrung, Chumnannpuen, Jansa-Ard, Nookaew ve

Nielsen, 2012). Bunların yanı sıra yüksek basınç ya da ultrasonik homojenizasyon yöntemleri de hücre duvarının parçalanması için yapılan bir diğer işlemlerdir (Thammakitti, Supphantharika, Phaesuwan ve Verduyn, 2004; Hunter ve diğerleri, 2002).

S. cerevisiae hücreleri çok dirençlidir ve hücre duvarının kalınlığı ve sertliği nedeniyle ultrasonik yöntemler hücre ölümü için yeterli değildir (Mendes-Costa ve Moraes, 1999). Öncelikle β -glukanları ne şekilde kullanılacağı belirlenmeli ve ona göre bir ekstraksiyon metodu uygulanmalıdır. Cam boncuklarla hücre lizizi veya kimyasal işlemler, hücrenin yırtılmasına neden olacaktır. Ozmotik şok veya dondurma/eritme de dahil olmak üzere diğer basit hücre parçalama yöntemleri, Kot ve diğerleri (2020), tarafından hücrel lipitlerin çıkarılması için kullanılmıştır (Kot, Gientka, Bzducha- Wrobel, Blazejak ve Kurcz, 2020).

2.4.3. Otoliz

Bir maya hücresinin ölümü için kullanılan en yaygın yöntemlerden biri, enzimatik mekanizmalarla hücre yıkımı sürecidir. Hidrolitik enzimlerin etkisi altında hücre içi biyopolimerlerin hidrolizi olarak tanımlanan otoliz, enzimlerinin etkisiyle hücre duvarının kısmen yok edildiği ve sitoplazmanın hücre dışına çıkmasına yol açan hücrel ölüm şeklidir (Javmen ve diğerleri, 2012). Otoliz işlemi 50-55 °C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleştirilmektedir (Liu ve diğerleri, 2008; Jacob, Hutzler ve Methner, 2019; Powell, Van Zandycke, Quain ve Smart, 2000). Bozulan enzimler nedeniyle, sitoplazmik içerik hücre zarında oluşan deliklerden tamamen salınır (Wang ve diğerleri, 2018).

2.4.4. Enzimatik uygulamalar

Hücre ölümünü hızlandırmak için çeşitli enzimler kullanılabilir. Bunlar, hücrel yapıları parçalayan zimolyaz, peptidaz, glukanaz, lipaz, lizozim veya glikosidaz enzimleri olabilmektedir (Liu, Ding, Sun, Boussetta ve Vorobiev, 2016). Hücre parçalanması ilk önce hücre duvarının yüzeyine nüfuz eden proteaz ve glukanazın etkisiyle meydana gelmektedir. β -glukanların ana yapısına zarar vermeden, sadece hücre içi içeriğin salınması amaçlanmaktadır (Javmen ve diğerleri, 2012).

2.4.5. Boncuklarla hücre bozulması

Homojenizasyon veya ultrasonikasyona ek olarak, cam veya zirkonyum boncukların kullanıldığı hücre parçalama yöntemleri de bulunmaktadır ki bu yöntem, hücresel bileşenlerin geri kazanılmasında hızlı ve kullanışlı mekanik bir yöntemdir (Avramia ve Amariei, 2021). Hücre parçalanması, büyük ölçüde boncukların boyutu ve maya süspansiyonunun konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak ilerleyen karmaşık bir süreçtir. İki aşamaya ayrılır: Bunlar hücre duvarının kırılması ile hücre içi içeriğin serbest bırakılması ve homojenleştirici bir faktör olarak kullanımlarıdır. Hücre parçalanmasına ek olarak, boncukların boyutu, maya hücresinin farklı kısımlarında bulunan enzimler üzerinde doğrudan bir etkiye sahiptir. Daha küçük boncuk çapı, daha yüksek bir enzimatik salınım sağlar (Melendres, Honda, Shiragami ve Unno, 1993). Bu aşamada süspansiyon konsantrasyonu da önemlidir; çünkü parçalanma oranındaki artış, boncukların temas yüzeyiyle karşılıklı bir blokaj etkisine sahiptir ve bu canlı hücrelerle yetersiz çarpışmaya neden olur (Heim, Kamionowska ve Solecki, 2007).

2.4.6. Yüksek basınçlı homojenizasyon

Yüksek basınçlarda homojenizasyon, hücre inaktivasyonu ve yırtılmasında yaygın mekanik yöntemlerden biridir. Bu işlem, mayanın parçalanmasını çeşitli hücresel bileşenlerin elde edilmesi için istenen seviyeye kadar hızlandırır (Dimopoulos, Tsantes ve Taoukis, 2020).

2.4.7. Kurutma

Çeşitli amaçlar doğrultusunda kullanılmaya hazır β -glukanların taşınmaları, kararlılıkları, depolanmaları ve ilaç şekillerinin hazırlanmaları amacıyla kuru halde bulunmaları gerekmektedir. β -glukanın kurutulması için literatürde farklı metotlar mevcuttur. Bunlar; dondurarak kurutma (freeze-drying), açık havada kurutma ve püskürterek kurutma (spray-drying) yöntemleridir. Püskürterek kurutma yöntemi β -glukan'ın yapısal özelliklerinde en az düzeyde değişikliğe neden olan başlıca yöntemdir (Thammakitti, Suphantharika, Phaesuwan ve Verduyn, 2004).

2.5. β -glukanın Antioksidan Özellikleri

Antioksidanlar, canlı organizmaları reaktif radikal türlerin saldırısından koruyabilen ve böylece birçok hastalığın riskini azaltan doğal maddelerdir. Çok sayıda araştırmacı askorbik asit (C vitamini) ve α -tokoferol (E vitamini) gibi doğal antioksidanları çalışmalarına rağmen, polisakkarit kaynaklı antioksidanlara ilgi fazladır (Xie, Xu ve Liu, 2001). Bu antioksidan sınıfının temsilcileri arasında, mantar ve bakterilerin hücre duvarlarında birincil bileşen olarak oluşan β -(1 $\rightarrow$ 3)- β -D bağlantılı glukoz polimerleri yer almaktadır (Bohn ve BeMiller, 1995). Yapılan araştırmalar, *S. cerevisiae* mayasının hücre duvarlarından β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glukanın, serbest radikal temizleme açısından anti-oksidatif aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Jaehrig ve diğerleri, 2008; Shah, Gani, Masoodi, Wani ve Ashwar, 2017; Deng ve diğerleri, 2012; Zhou ve Chen, 2011).

Vücudun oksidasyon ve anti-oksidasyon sistemleri dengesizdir. β -glukan ve mannan, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini iyileştirerek, ayrıca hidroksil radikalının ve süperoksit anyonunun süpürme aktivitesini iyileştirerek hayvan vücudunun antioksidan kapasitesini artırabilir (Tang ve diğerleri, 2017). β -glukan ve mannan hidroksil gruplarının ve metal iyonunun, hidroksil radikallerinin oluşumunu inhibe etmek ve lipid peroksidasyonunun zincirleme reaksiyonunu önlemek için birbiriyle birleştirildiği bilinmektedir (Tang ve diğerleri, 2017). Yine de β -glukan ve mannan'ın antioksidan enzim aktivitesinin ve süperoksit anyon temizleme aktivitesinin mekanizması açık değildir.

Galinari, Almeida-Lima, Macedo, Montovani ve Rocha, (2018) *Kluyveromyces marxianus*'tan β -glukan ve mannan ekstrakte emiş ve NaOH ve HCl ile muamele etmiştir. Beş fraksiyonun antioksidan aktivitesi, antioksidan prosesin başlangıç (toplam antioksidan kapasitesi ve indirgeme kapasitesi), yayılma (bakır ve demir şelatlama kapasitesi) ve sonlandırma (hidroksil radikal süpürme) yönleri incelenerek değerlendirilmiştir. Sonuçlar, tüm polisakkarit fraksiyonlarının antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ve hidroksil serbest radikalleri doza bağımlı bir şekilde temizlediğini göstermiştir. Ayrıca Liu ve Huang (2018), maya hücre duvarından bazik mannan ekstraksiyonu için yüksek sıcaklıkta NaOH kullanmış, izole edilen mannanın hidroksil radikal süpürme, süperoksit anyon radikal süpürme aktivitelerinin olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalar, β -glukan ve mannan'ın maya hücrelerinin antioksidan kapasitesini artırabileceğini kanıtlamıştır. Bir diğer

çalışmada, *Saccharomyces cerevisiae* hücre duvarı ekstresi sütten kesilmiş domuz yavrularının yemine karıştırılmıştır. Çalışmanın 21. Gününde *S. cerevisiae* hücre duvarı ekstresi grubunun serumundaki katalaz, glutatyon peroksidaz ile süperoksit dismutaz aktiviteleri artırılmış ve malondialdehit miktarı ölçülmüştür. *S. cerevisiae*'nın β -glukan açısından zengin hücre duvarı özütünün sütten kesilmiş domuz yavrularında oksidatif stresi azaltabildiği gösterilmiştir (Liu ve diğerleri, 2017). Ayrıca, piliçlerin dyemlerine maya hücre duvarının eklenmesinden sonra, bağırsaktaki indirgenmiş glutatyon ve glutatyon redüktaz seviyelerinin arttığı sonucuna varılarak, bu da maya hücre duvarının duodenal mukozadaki glutatyon yolunu etkili bir şekilde düzenleyebileceği şeklinde düşünülmüştür (Liu, Wang J. ve Wang Y., 2018). Çalışmalar, β -glukan ve mannan'ın canlılarda, antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak hayvanların antioksidan kapasitesini artırabildiğini göstermiştir (Shah, Gani, Masoodi, Wani ve Ashwar, 2017; Deng ve diğerleri, 2012; Zhou ve Chen, 2011).

β -glukan ve mannan'ın biyolojik aktivitelerine dayanarak, aşılarda hazırlanmasında bağışıklık uyarıcıları ve düzenleyiciler olarak yer almak, ilaçları taşıyıcı olarak makrofajlara ulaştırmak, hayvan yemine eklenmesi ve yem katkı maddesi olabilmesi gibi çeşitli alanlarda uygulanabilirliği bildirilmiştir (Liu ve diğerleri, 2021). β -glukan ve mannan birçok alanda uygulanmış olsa da hala ele alınması gereken birçok konu vardır. Farklı ekstraksiyon, ayırma ve saflaştırma yöntemleriyle elde edilen β -glukan ve mannan, farklı saflık, moleküler ağırlık ve uzaysal yapıya sahip olduğundan, farklı biyolojik aktivitelere sahip olabilmektedir. Ayrıca, β -glukan ve mannan, hayvanın fizyolojik aktivitesini artırarak esas olarak patojenik bakterilere ve strese karşı savaşabilir nitelikte olduğu için üretim uygulamasında çeşitli hayvanlar üzerinde farklı etkiler gösterebilmektedir (Liu ve diğerleri, 2021). β -glukan ve mannan'ın aktif mekanizması, uzamsal yapısı, moleküler ağırlığı ve bunların ilişkilerinin daha fazla araştırılması gerekmektedir. Dahası, mevcut modifikasyon yöntemleri, β -glukan ve mannan'ın biyolojik aktivitelerini önemli ölçüde geliştirmiştir, ancak fiziksel modifikasyonun dezavantajı; reaksiyonun rastgele olması ve ortaya çıkan polisakkaritlerin moleküler ağırlık aralığının belirsiz olmasıdır. β -glukanların biyolojik modifikasyonları pahalı ve daha düşük verime sahiptir. Ayrıca kimyasal modifikasyon, kontrol edilmesi zor ve çevreyi kirleten bir reaksiyon sürecidir. Bu nedenle, β -glukan ve mannan için, mannan'ın yan zincir bileşimine odaklanılmalıdır. Yan zincirlerle bağlanan bazı gruplar son derece yüksek biyolojik aktivitelere sahip olabilirler. En iyi biyolojik aktivitelere sahip moleküler ağırlık aralığı, polisakkaritlerin moleküler ağırlığı ile biyolojik aktiviteleri arasındaki doğrudan ilişki incelenerek belirlenebilmektedir (Liu ve diğerleri, 2021). β -glukan ve

mannan modifikasyonunda, β -glukan ve mannan'ın mevcut modifikasyon yöntemlerini, kararlı ve etkili modifikasyon yöntemlerini belirlemek için karşılaştırılmıştır (Liu ve diğerleri, 2021).

2.6. Prebiyotik Olarak β -glukan

Prebiyotik terimini ilk olarak Gibson ve Roberfroid (1995) tanımlamıştır. Prebiyotik kavramı, bağırsak sisteminde konakçı üzerinde yararlı etkiye sahip mikroorganizmaların varlığına dayanmaktadır. Bu etkiler arasında laktoz sindirimini güçlendirme, kolesterolün düşürülmesi, antimikrobiyal etkiler ve bağışıklık sistemi uyarımı bulunmaktadır (Laroche ve Michaud, 2007).

β -glukan'ın prebiyotik uygulamaları, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin, insanlarda sağlıklı etkiye sahip bağırsak yolunda yaşayan mikroorganizmaların büyümesini geliştirebilmesi üzerinedir (Gardiner, 2000). *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *Streptococcus salivarius* ssp. *termophilus* gibi mikroorganizmalar mide asiditesine ve safra tuzlarına dirençli olmadıkları için bağırsakta kolonizasyon yetenekleri düşüktür. Bu nedenle beslenmede prebiyotik gıdaların kullanılması faydalı bakteri popülasyonunu artırabilmesine yardımcı olmaktadır (Laroche ve Michaud, 2007).

Prebiyotik alımının; bağışıklık fonksiyonunu artırdığı, kolon bütünlüğünü iyileştirdiği, bağırsak enfeksiyonlarının görülme sıklığı ile süresini azalttığı, alerjik yanıtı azalttığı ve ayrıca dışkıının sindirimi ile eliminasyonunu iyileştirdiği bilinmektedir (Douglas ve Sanders, 2008). Bununla birlikte, bu etkiler prebiyotik sindirimin doğrudan etkileri değildir. Wang (2009), prebiyotiklerin etkisinin aslında dolaylı olduğunu, çünkü prebiyotik etkiye neden olan şeyin gastrointestinal mikrobiyota bileşimlerindeki (bifidobakteri, laktobasillus ve histolitikum alt grubu; bakteroidler ve klostridia) değişiklikler olduğunu öne sürmüştür. Bifidobakter ve laktobasil, faydalı bakterilerdir (Macfarlane T., Steed ve Macfarlane S., 2008). Prebiyotiğin olumlu bir etkisi, histolitikum alt grubunun gelişimini geciktirirken, bifidobakteriler ve laktobasillerin sayısındaki önemli artışı yansıtır (Palframan, Gibson ve Rastall, 2003; Probert ve Gibson, 2002; Langlands, Hopkins, Coleman ve Cummings, 2004). Macfarlane ve diğerleri (2008), prebiyotik etkinin bir sonucu olarak bağırsaktaki bifidobakteri ve laktobasil sayısındaki artışlarını bildirenler arasındadır. Gibson, Beatty, Wang ve Cumming (1995), bifidobakterilerin bağışıklık sistemini uyarabildiğini, B vitamini

üretebildiğini, patojen büyümesini engelleyebildiğini, kan amonyak ve kan kolesterol düzeylerini düşürdüğünü ve ayrıca antibiyotik tedavisinden sonra normal florayı geri kazanmaya yardımcı olduğunu bildirmiştir.

Prebiyotiklerdeki son gelişmeler, başka potansiyel prebiyotik kaynağı arama ihtiyacını artırmıştır. Mantarlar, kitin gibi karbonhidratlar içerdiğinden prebiyotikler için potansiyel bir aday gibi görünmektedir. β -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-glukanlar ve α -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanlar gibi farklı tipte glikosidik bağlara sahip glukanlar prebiyotik adaylar arasında yer almaktadır. Bununla birlikte, bazıları ana yan zincir bileşenleri olarak veya farklı kombinasyonlarda arabinoz, mannoz, fukoz, galaktoz, ksiloz, glukoz ve glukuronik asitleri içeren gerçek heteroglukanlardır. Mantar polisakkaritleri farklı kimyasal bileşime sahip olsalar da çoğu β -glukan grubuna aittir (Wasser, 2002).

Omurgalıların ve özellikle memelilerin pankreasından salgılanan sindirim enzimleri, β -glukozidik bağları hidrolize edemez. Bu onları midede asit hidrolizine dirençli hale getirir ve insan sindirim enzimleri tarafından sindirilemez halde vücutta kalır (Van Loo, 2006). Mantar karbonhidratının sindirilemez özelliği, prebiyotik tanımının bir bölümünü karşıladığı için potansiyel bir prebiyotik kaynağı olarak kabul edilmesine rağmen tüm diyet karbonhidratları prebiyotik olarak değerlendirilmemektedir (Gibson ve diğerleri, 2004).

Polisakkaritlerin prebiyotik olarak değerlendirilmesindeki ilk kriter, aslında prebiyotiklerin kolona ulaşmadan önce sindirim süreçlerine dayanabilmesini sağlamak ve böylece bifidobakter ve laktobasil gibi yararlı bakterileri etkili bir şekilde uyarmaktır (Macfarlane ve diğerleri, 2008). Mevcutta gıda bileşenleri olarak şu anda kullanılan veya geliştirilmekte olan sindirilemeyen oligosakaritlerin bazıları, monosakarit biriminin fruktoz, galaktoz, glukoz ve / veya ksiloz olduğu karbonhidratları içermektedir (Roberfroid, 2000). Sindirilemeyen oligosakaritler, bir, iki veya hatta üç monosakarıttan oluşmakta ve önemli beslenme özelliğini bulunmamaktadır (Roberfroid, 2000). Prebiyotiklerin suda çözünür duyuşal olarak tatlı olabildiği ve tatlılık derecesinin zincir uzunluğuna bağlı olduğu bildirilmiştir (Roberfroid, 2000).

Bir gıda bileşeninin prebiyotik olarak sınıflandırılması için, kolondaki potansiyel olarak faydalı bakteriler tarafından seçici olarak fermente edilebilmeleridir (Gibson ve diğerleri, 2004; Wang, 2009). Prebiyotiklerin fermentasyonu, kısa zincirli yağ asitlerinin

ekspresyonunda veya bileşiminde bir değişikliğe, dışkı ağırlığının artmasına, lümen kolon pH'nın da hafif bir azalmaya, azotlu son ürünler ile indirgeyici enzimlerde bir azalmaya ve artmış ekspresyona yol açabilmektedir (Douglas ve Sanders, 2008).

Potansiyel olarak sağlık ve esenlik ile ilişkili bağırsak bakterilerinin büyümesinin ve / veya aktivitesinin seçici olarak uyarılması, prebiyotiklerin kriterlerinden biri olarak kabul edilir (Gibson ve diğerleri, 2004). Prebiyotiklerin özellikle probiyotiklerin, bifidobakterilerin ve laktobasillerin (Wang, 2009) büyümesi ve aktivitelerine uygun olduğu ve clostridia ve bakteroidlerin büyümesini baskıladığı bildirilmektedir (Aida, Shuhaimi, Yazid ve Maaruf, 2009).

Ağızdan alınan β -glukan gıda maddelerinden farklıdır. Bu tip glukan aside dirençlidir, bu nedenle mideden neredeyse hiç değişmeden geçer. Bağırsak duvarının mukoz tabakasındaki makrofajlar, β -glukan reseptörleri yoluyla beta glukan partiküllerini alırlar. Bu hücrelerin hemen aktivasyonunu takip eder ve daha sonra sitokinleri serbest bırakmak ve sistematik immün aktivasyonu indüklemek için doğal antijen sunum fonksiyonlarının bir parçası olarak yerel lenf düğümlerine (Payer's Patch) geri dönebilirler. β -glukanlar, oral yollarla vücuda alındığı takdirde mide ve bağırsaklardaki gıdalardan kolesterol emilimini engelleyerek kan kolesterolünü düşürebilir. Bunun yanı sıra enjeksiyonla verilen beta glukanlar, enfeksiyonları önleyen kimyasalları artırarak bağışıklık sistemini uyarabilir (Rahar ve diğerleri 2011).

2.7. β -glukanın Fonksiyonel Uygulamaları

2.7.1. Sağlık uygulamaları

Hayvanlar ve insanlarda yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, mantarlardan ve mayalardan türetilen β -glukanların immüno-modüle edici özelliklere sahip olduğunu göstermektedir (Petravić-Tominac ve diğerleri, 2010). β -glukanların immün düzenleyici aktiviteleri, esas olarak, immün sistemde yer alan sitokinlerin makrofaj salınımını uyarma, inhibe etme veya makrofaj fagositozunu modüle etme kabiliyetine bağlıdır (Bohn ve BeMiller, 1995; Gardiner, 2000; Vetvicka, 2002). Hayvanlarda yapılan *in vivo* bir çalışma, oral yoldan verilen β -glukanın makrofajlar, granülositler ve monositler gibi beyaz kan hücrelerini aktive ettiğini göstermiştir (Vetvicka, 2002). Maya β -glukanı ile yapılan bir çalışmada ise β -

glukanın, konağın bağışıklık tepkisini etkileyen özellikle yüksek bağışıklık düzenleyici aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Petravić-Tominac ve diğerleri, 2010). *Candida albicans* mayasından elde edilen β -glukanlar makrofajları aktive eder ve *in vitro* olarak interlekin (IL-6) ve tümör nekroz faktörünü (TNF) indükler (Mantovani ve diğerleri, 2008). Hem mayalardan hem de mantardan elde edilen β -glukanın, makrofajların ve kemotaktik faktörün indüksiyonunda benzer kabiliyete sahip olduğu gösterilmiştir (Mantovani ve diğerleri, 2008).

β -glukanlar tarafından tümör üretiminin sinyal yollarının düzenlenmesi birçok anahtar unsuru içerir. Çeşitli hayvan deneyleri, bazı fungal β -glukanların çeşitli tümörler üzerindeki dikkate değer etkileri olduğunu ortaya çıkarmıştır (Chen ve Seviour, 2007). *Agaricus blazei basidiocarps*'tan türetilen β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glukanın, insan yumurtalık kanseri oluşturan HRA hücrelerinde apoptozu veya programlanmış hücre ölümünü indüklediği Kobayashi ve diğerleri, (2005) tarafından literatüre kazandırılmıştır.

Bulaşıcı hastalıkların sürveyansındaki en büyük güncel sorun antibiyotik direncidir. Bu nedenle, bazı fungal β -glukanlar, birçok farklı immün düzenleyici mekanizma aracılığıyla hareket ederek patojenik mikroplara karşı etkilidir (Chen ve Seviour, 2007). Çeşitli çalışmalar ve klinik testler, çözünür β -glukanların bakteriyel enfeksiyona karşı direnci iyileştirdiğini göstermiştir (Petravić-Tominac ve diğerleri, 2010). Vetvicka (2002), çözünmeyen maya β -glukan'ın (2–20 mg/kg) oral uygulamasının, antibiyotik kullanmadan farelerde maksimum şarbon koruyucu etki sağladığını göstermiştir.

β -glukan uygulamasının bakterilere antimikrobiyal etki göstererek, monosit ve nötrofil sayısını artırır. Sıçanlar üzerinde yapılan *in vivo* çalışmalar, β -glukan ve antibiyotiklerin sinerjik etkisinin olduğunu göstermiştir (Petravić-Tominac ve diğerleri, 2010). Chen ve Seviour (2007)'un yapmış olduğu bir çalışmada *S. cerevisiae* kaynaklı β -glukanın ise viral enfeksiyonlara karşı etkili olduğunu böylece, tamamlayıcı sistem ve interferon gama aktivasyonu ile Th hücre aracılı bağışıklığı aktive ederek insanlarda uygulanan immün yetmezlik virüsü (HIV) aşısının immün tepkisini arttırdığını belirlemişlerdir (Chen ve Seviour, 2007). Jung ve diğerleri (2004), β -glukanın influenza virüsü ile enfekte olan domuz hücrelerindeki viral nükleik asit seviyelerini düşürdüğünü ve interferon gama ve nitrik oksit seviyelerinin artmasına da katkıda bulunduğunu tespit etmişlerdir (Jung ve diğerleri, 2004).

Maya β -glukanlarının, kan kolesterol konsantrasyonlarını düşürmede etkili olduğu düşünülmekte, ancak mekanizması henüz belirlenmemiştir (Chen ve Seviour, 2007; Petravić-Tominac ve diğerleri, 2010). Birçok çalışma, β -glukanların kan kolesterolünü ve yüksek lipit seviyelerini düşürmenin ve dolayısıyla yüksek tansiyon ile arteriyoskleroza önlemede β -glukanların güvenli, güçlü ve ucuz bir yolu olduğunu göstermiştir (Petravić-Tominac ve diğerleri, 2010). Ayrıca, β -glukanların *in vivo* hipokolesterolemik etkisinin araştırılması, katyonik β -glukanların doğal forma kıyasla kolesterolü düşürmede daha güçlü bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Petravić-Tominac ve diğerleri, 2010). Bununla birlikte, sülfatlanmış β -glukanlar, düşük viskozite nedeniyle kolesterol seviyelerini düşürmede daha az etkilidir (Mantovani ve diğerleri, 2008). β -glukanların, muhtemelen dislipidemiye hafifletmek ve kardiyovasküler riskleri azaltmak için düşük yoğunluklu lipoproteini (LDL) düşürdüğü ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterolü artırdığı gösterilmiştir (Kapur, Ashen ve Blumenthal, 2008). Hem hayvan hem de insan çalışmalarında görüldüğü üzere, *S. cerevisiae*'dan elde edilen β -glukanlar tarafından uyarılan makrofaj aktivitelerinin, yara iyileşmesinde, ameliyat ve travma sonrası skar dokusu seviyelerinin düşürülmesinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Mayell, 2001).

β -glukanların, sağlık üzerindeki genel etkilerini test etmek ve sorumlu mekanizmaları açıklığa kavuşturmak için β -glukanlar yaygın bir kullanıma sahiptir (Tungland ve Meyer, 2002). Venkatachalam, Gumma ve Doble (2012), siklik glukanların daha büyük iç boşluk çapına sahip olması nedeniyle yara pansuman malzemesi olarak kullanımlarının mevcut olduğunu bildirmişlerdir. Kofuji ve diğerleri, (2010), β -glukan ve kitosan, β -glukan-kitosan kompleks yapısını farelerin yüzeyinde oluşturulan yaralarda deneyerek, ticari β -glukanlardan daha fazla teröpatik bir etkiye sahip olduğu sonucuna varmışlardır. Bebeklerde ve küçük çocuklarda, β -glukanların, yara bakımını önemli ölçüde iyileştirdiği ve yaralanma sonrası ağrıyı önemli ölçüde azalttığı görülmüştür (Delatte ve diğerleri, 2001). Kim, Lee J., Lee M., Kwon ve Park (2012), β -glukan içeren poli (laktik-ko-glikolik asit) yapılarının yara iyileştirici etkilerini araştırmıştır. Bulgular, membranların etkileşimi, hücrelerin proliferasyonunu ve anjiyogenezi iyileştirerek yara iyileşmesini hızlandığını böylece yara iyileşmesini arttırmak için bir deri ikame maddesi olarak yararlı olabileceklerini göstermiştir.

Aşı bilimindeki en büyük zorluk, koruyucu T hücresi ve antikör yanıtlarını etkili bir şekilde destekleyen platformların ve adjuvanların geliştirilmesidir. Levitz (2014) yeni bir aşı

platformu olarak β -glukanları kullanmıştır. β -glukanların, fagositozu takiben "yük" salınacak şekilde antijenler ve immünomodülatörler ile yüklenebileceğini göstermiştir. Antikorla "kapsüllenmiş" β -glukan ile farelerin immünizasyonunu takiben güçlü ve uzun süreli antijene özgü T hücresi ve antikor tepkileri olduğunu literatüre kazandırmıştır.

2.7.2. Kozmetik uygulamaları

β -glukanlar, ikibinli yıllardan beri genel olarak koruyucu kremler, merhemler, tozlar ve çeşitli süspansiyonlarda kullanılmaktadır. β -glukan aktivitesi, kollajen üretimini arttırırsa yaş çizgilerini, kaz ayaklarını, kırışıklıkları, selülitleri, akne, dermatit, egzama, sedef hastalığı ve diğer olumsuz cilt durumlarını azaltacağı bildirilmiştir (Zhu ve diğerleri, 2016). β -glukanın film oluşturan bir nemlendirici ve yara iyileşmesinin destekleyicisi olduğu gözlemlenmiştir (Zhu ve diğerleri, 2016). Pillai, Redmond ve Röding (2005), insan derisi modellerinde yulaf β -glukan'ının penetrasyonunu, ince çizgileri ve kırışıklıkları azaltmadaki etkinliğini klinik olarak bulmuşlardır. Sonuçlar, β -glukan'ın deriye epidermis ve dermise derinlemesine nüfuz ettiğini göstermiştir. Araştırmalar, β -glukan'ın sağlıklı cildin bakımı ve yaşlanma belirtilerinin kozmetik tedavisinde kullanılabileceğini desteklemektedir. Glukan bileşimi, cilt veya mukozanın nemlendirilmesi gibi avantajlı etkilere işaret eder ve cilt üzerinde yaşlanmayı geciktirici ve canlandırıcı bir etkiye sahiptir (Baschong, Monglat ve Ochs, 2009). Chen (2014), β -glukan'ın büyük nem tutma özelliğine sahip olduğunu ve kseroftalmiyi hafifletmek için göz damlalarında kullanılabileceğini bulmuştur (Zhu ve diğerleri, 2016).

2.7.3. Yem endüstrisi uygulamaları

β -glukanlar, yalnızca gıda ile ilaç endüstrisinde antikanser ve immüno-modüle edici ajanlar olarak değil, aynı zamanda hayvanların doğal bağışıklığını arttırmak için su ürünleri yetiştiriciliği ve hayvancılık endüstrilerinde de kullanılmaktadır (Jung ve diğerleri, 2007). Jung ve diğerleri, (2007) *Paenibacillus polymyxa* JB115 suşundan elde edilen β -glukanın, bağışıklığı arttırmak amacıyla, hayvan yemi katkı maddesi olarak ve çiftlik hayvanları için potansiyel antitümör ajan olarak kullanılabileceğini öne sürmüştür. Ayrıca, gökkuşağı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*), günde 0,5 g/100 g pelet (%0,5) dozunda β -glukan içeren peletlerle beslenmesi sonucu β -glukanın, serumda bulunan spesifik antikor salgılayan hücrelerin sayısını ve spesifik Ig seviyelerini arttığı bulunmuştur (Siwicki ve diğerleri, 2004).

2.7.4. Gıda sektörü uygulamaları

β -glukanlar, gıda endüstrisinde hidrokolloidler olarak yaygın bir kullanıma sahiptir, bu kullanım esas olarak β -glukanların reolojik özelliklerine, yani jelleşme kapasitelerine ve sulu çözeltilerin viskozitesini artırma yeteneklerine dayanır. Bu nedenle β -glukanlar, gıda formülasyonlarının dokusunu ve görünümünü değiştirmek için koyulaştırıcı ajanlar olarak kullanılmaktadır. Ayrıca salata sosları, kurabiyeler, dondurmalar, yoğurtlar ve peynir gibi az yağlı ürünlerin imalatında stabilizatör olarak kullanılabilirler (Laroche ve Michaud, 2007).

β -glukan, gıda sistemlerinde iyi su tutma, stabilizasyon ve dokusal özellikleriyle bilinir. Bu özellikler, yalnızca özel amaçlı bir dizi gıda ürününde β -glukan kullanımını artırmakla kalmaz, aynı zamanda tüketicilere potansiyel sağlık avantajları da sağlar. Sudaki çözünürlüğü nedeniyle, β -glukan gıda sistemlerinde kullanıldığında reoloji ve doku ile ilgili özellikler gibi fonksiyonel özelliklerin iyileştirilmesinde önemli bir rol oynar. Büyük miktarda suyu hapsedebilmesi ve içsel reolojik özellikleri, gıda ürünlerine daha iyi bir doku ve istenilen duyu özellikler sağladığı için onu ideal bir koyulaştırıcı yapar (Methacanon, Weerawatsophon, Tanjak, Rachtawee ve Prathumpai, 2011).

β -glukan ve türevleri, unlu mamuller ve etler gibi gıda ürünlerinde yağ ikame / mimetikleri olarak da kullanılabilir (Cleary, Andersson ve Brennan, 2007). Liu, Wang, Li ve Zhang (2015), yulaf β -glukanı ve hidrolize türevlerini köftelerin fizyokimyasal parametreleri üzerindeki etkilerini incelemek için yağ ikame maddesi olarak köfte içine dahil edilmiştir. Yüksek performanslı boyut dışlama kromatografisi (HPSEC) yardımıyla β -glukan'ın moleküler ağırlığı belirlenmiş ve enzimatik hidroliz (selülaz) ile muamele edilen yulaf β -glukan'ın moleküler ağırlığının 6600 kDa ile 9400 kDa arasında değiştiği bildirilmiştir. Unlu mamullerde, zengin bir β -glukan kaynağı olan tahıllar, yağ ikame maddeleri olarak kullanılabilir ve aynı zamanda diyet lifi şeklinde olumlu sağlık yararları sağlar. Bazı çalışmalarda, %10 β -glukan içerikli (kuru bazda) Nutrim yulaf kepeğinin (OB) kolesterol seviyesini düşürerek insan sağlığı üzerinde olumlu bir etkisi olduğu bildirilmiştir (Cleary, Andersson ve Brennan, 2007).

2.8. *Pichia kudriavzevii* ve Hücresel Özellikleri

Domain: *Eukaryota*

Şube: *Ascomycota*

Sınıf: *Saccharomycetes*

Takım: *Saccharomycetales*

Aile: *Pichiaceae*

Cins: *Pichia*

Pichia kudriavzevii mayası, *Candida krusei* mayasının bir teleomorfudur. Teleomorf, bir organizmanın cinsel üreme aşaması olarak adlandırılmaktadır, yani *Pichia kudriavzevii* mayası, haploid hücrelerin füzyonu aracılığıyla cinsel olarak çoğalan bir maya türüdür (Guarro, Gene ve Stchigel, 1999).

P. kudriavzevii hücrelerinin şekli, oval veya elipsoidal yapıda olabilmektedir (Oberoi ve diğerleri, 2012). Doğada çok bol miktarda bulunur ve genellikle toprakta, meyvelerin kabuklarında ve fermente içeceklerde bulunmaktadır. *P. kudriavzevii*, 45 °C'ye kadar olan yüksek sıcaklıklara ve pH 2-3'lerde bile metabolik olarak aktif kalabilmektedir. Ayrıca biyoyakıt endüstrisi için büyük yararı bulunan etanolün yüksek verimde üretilmesine olanak sağlayan önemli bir mikroorganizmadır (Oberoi ve diğerleri, 2012). Çoğu maya gibi, *P. kudriavzevii* de şarap ve biranın fermantasyonunda önemli ölçüde yer almaktadır; bununla birlikte, kakao çekirdeği fermentasyonunda da çok değerlidir ve kakao çekirdekleri için daha fazla lezzet ile aroma oluşturur. *P. kudriavzevii* mayasının belgelenen yalnızca birkaç patojenik vakası rapor edilmiştir (Oberoi ve diğerleri, 2012). Yapılan araştırmalar *P. kudriavzevii* mayasının bazı suşlarının sadece immün yetmezliği olan hastaları enfekte ettiğini göstermektedir (Hurst, 2016). Diğer birçok maya hücresinde olduğu gibi, *P. kudriavzevii* hücresi de sitoplazma, çekirdek, hücre zarı, hücre duvarı, mitokondri ve vakuol içermektedir. Glukoz en çok kullandıkları karbonhidrat kaynağı olmasına rağmen, sukroz, galaktoz, fruktoz ve mannozu da karbon kaynağı olarak kullanabilmektedirler (Oberoi ve diğerleri, 2012).

P. kudriavzevii mayasında bulunan fitaz enzimi, fitik asiti hidrolize ederek fitik asidin insanlar tarafından kullanılmasında büyük yarar sağlar. Fosfatazlar, organo-fosfatlarda bulunan monofosfoester bağlarının koparılmasında katalizör olarak görev yapan

enzimlerdir. Bu enzimler fitik asit içerisinde bulunan monofosfoester bağlarını parçalayamazlar. Fitik asidi hidrolize eden fitazlar çevre koruma, insan sağlığı, beslenme gibi birçok alanda önemli olan enzimlerdir (Berikten ve Kıvanç, 2018). Fitik asit çoğu memeli tarafından sindirilemez, *P. kudriavzevii* mayasının sahip olduğu hidroliz yeteneği, bu maya türünü diğer mayalardan ayıran önemli bir özelliktir (Oberoi ve diğerleri, 2012).

Birçok maya türü etanol üretme kabiliyetine sahip olmasına rağmen, pek çoğu ksiloz üretemez. Ksiloz, bitkilerin hücre duvarında bulunan ve vücutta metabolize edilemeyen beş karbonlu bir şekerdir. Ksiloz, biyoyakıt endüstrisinde özellikle etanol üretimine bir alternatif olarak kullanılabilmektedir (Oberoi ve diğerleri, 2012). *P. kudriavzevii* mayasının çok sayıda probiyotik özelliğe sahip olması gıdaların folat içeriğini arttırmasından kaynaklanmaktadır (Greppi ve diğerleri, 2017; Qvirist, Vorontsov, Veide ve Andlid, 2017). Yapılan çalışmalar, yaygın probiyotik mayaların farklı kanser tipleri üzerindeki yararlı etkilerini doğrulamaktadır (Ghoneum ve Gollapudi, 2005; Saber, Alipur, Faghfoori ve Khosroushahi, 2016). Bununla birlikte, *P. kudriavzevii* gibi diğer bilinmeyen probiyotik mayalar ve bunların salgı metabolitleri gibi bileşenlerin kanser tedavisi üzerindeki çalışma mekanizmaları net değildir (Saber, Alipur ve Faghfoori, 2017).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan cihaz ve ekipmanlar

Çalışma süresince Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda bulunan cihazlar kullanılmıştır. Bunlar: Manyetik Karıştırıcı (Velp), Soğutmalı Santrifüj (Sigma 2-16KC), -80 ve -30 °C Derin Dondurucu (Sanyo), Otoklav (Tomy-Sx 700E), Hassas Terazî (0,1-10 Mg), Çeker Ocak (Vortice), Santrifüj (Nüve), Mini Santrifüj (Selecta), Etüv (Raypa/Incuberm/Dıgıt), CO₂'li etüv (Sanyo), Evaporatör (Heidolph), Su Banyosu (GFL), Vorteks (Dragonlab), pH Metre (Jenco 6173), Spektrofotometre (Digilab Hitachi U-1800), Buzdolabı (Beko), Işık Mikroskobu (Leica), Distile Su Cihazı (Mes/MES06), Otomatik Pipetler (Ependorf), McFarland Densitometre (Biosan Den-1), Liyofilizatör (Christ Alpha 2-4 LD plus), Mikroplate Okuyucu (Epoch, BioTek) ve Inverted Mikroskop (Leica)'tur.

3.1.2. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonunda bulunan peynirden izole edilen, 18S rRNA analizi ile moleküler olarak tanımlanmış ve probiyotik özellikleri belirlenmiş beş farklı *Pichia kudriavzevii* maya suşu kullanılmıştır. Bu maya suşları Çizelge 3.1.'de sunulmuştur. Çalışmalarda kullanılan diğer test mikroorganizmaları ise G. Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan *Pichia kudriavzevii* maya suşları

Tür İsmi	İzolasyon Kaynağı	Suş Kodu
<i>Pichia kudriavzevii</i>	Beyaz peynir	M10
<i>Pichia kudriavzevii</i>	Beyaz peynir	M13
<i>Pichia kudriavzevii</i>	Tulum peynir	M16
<i>Pichia kudriavzevii</i>	Tulum peynir	M17
<i>Pichia kudriavzevii</i>	Tulum peynir	M57

Prebiyotik denemeleri için ise laboratuvarımızda probiyotik bakteriler olarak kullanımı yaygın olan suşlar seçilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Prebiyotik etkilerin belirlenmesinde kullanılan mikroorganizmalar

Tür İsmi	Kullanıldığı Çalışmalar
<i>Ligilactobacillus plantarum</i> GD2	Laktobasil Gelişimini Düzenleyici Aktivite
<i>Bifidobacterium bifidum</i> A12	Bifido Gelişimini Düzenleyici Aktivite
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BD1	Maya Gelişimini Düzenleyici Aktivite

3.1.3. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve çözeltiler

Mayaların geliştirilmesinde kullanılan besiyerleri

Araştırmada, *Pichia kudriavzevii* ve *Saccharomyces cerevisiae* BD1 maya suşları Yeast Ekstrakt Glukoz Kloramfenicol (YGC) sıvı besi ortamında geliştirilmiştir. Besiyeri içeriği Çizelge 3.3'te verilmiştir. Çizelgede bulunan maddeler belirli miktarlarda tartılmış ve ardından bir miktar distile su ile manyetik karıştırıcıda tamamen homojen hale gelinceye kadar karıştırılmıştır. Son hacim 1000 mL olacak şekilde üzeri distile su ile tamamlanıp, pH $6,5 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmıştır. Hazırlanan besiyeri otoklavda $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dk steril edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) Agar besiyeri (Çizelge 3.4) hazırlamak için ise YGC broth besiyerine pH ayarı yapıldıktan sonra, 1000 mL besiyeri içerisinde 15 g Agar (Merck) olacak şekilde tartılmış ve otoklavda $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dk steril edilmiştir. Oda koşullarında sıcaklık yaklaşık $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye düştüğünde petri kaplarına aktarılmış ve agarlar donduktan sonra $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'lik etüve kaldırılmıştır. 1 gece etüvde kalan petrilerin temizliğinden emin olunduktan sonra petriler $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.3. Yeast Ekstrakt Glukoz Kloramfenicol (YGC) besi yeri içeriği

Maddeler	Miktar (g/L)
D-Glukoz	20
Yeast Extract	10
Pepton	20

Çizelge 3.4. Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) besi yeri içeriği

Maddeler	Miktar (g/L)
D- Glukoz	20
Yeast Extract	10
Pepton	20
Kloramfenikol	0,1
Agar-agar	15

Ligilactobacillus plantarum GD2 suşunun geliştirilmesinde kullanılan besiyerleri

L. plantarum GD2 kültürünün geliştirilmesinde De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri içeriği Çizelge 3.5'te verilmiştir. Çizelgedeki maddeler belirtilen miktarlarda tartılıp, bir miktar distile su ile manyetik karıştırıcıda homojen hale gelinceye kadar karıştırılmış ve son hacim 1000 mL olmak üzere pH 6,2±0,2'ye ayarlanmıştır. Besiyeri otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edilerek hazırlanmıştır. MRS Agar besiyeri hazırlamak için ise pH ayarı yapıldıktan sonra 1000 mL besiyeri içerisinde 15 g Agar (Merck) olacak şekilde tartılmış ve otoklavda 121 °C'de 15 dk. steril edilmiştir. Oda koşullarında sıcaklık yaklaşık 50 °C'ye düştüğünde petri kaplarına aktarılmıştır. Agarlar donduktan sonra 37 °C'lik etüve kaldırılmıştır. 1 gece etüvde kalan petrilerin kontaminasyon kontrolü yapıldıktan sonra petriler +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.5. De Man Rogosa Sharpe (MRS) besi yeri içeriği

Maddeler	Miktar (g/L)	Maddeler	Miktar (g/L)
Pepton	10	Sodyum asetat.3H ₂ O	5
Yeast ekstrakt	4	Magnezyum sülfat.7H ₂ O	0,2
Beef ekstrakt	8	Amonyum sitrat	2
Glukoz	20	MangenezİIsülfat.4H ₂ O	0,05
Dipotasyumhidrojen fosfat	2	Tween 80	1 mL

Bifidobacterium bifidum A12 suşunun geliştirilmesinde kullanılan besiyerleri

B. bifidum A12 kültürünün geliştirilmesinde, Bifidobacterium Selective Besiyeri (BSM) kullanılmıştır. BSM besiyeri içeriği Çizelge 3.6'da belirtilmiştir. Belirtilen miktarlarda maddeler tartıldıktan sonra son hacim 1000 mL olacak şekilde distile suyla tamamlanıp, maddelerin manyetik karıştırıcıyla çözünmesi sağlanarak içerik homojen hale getirilmiştir. Ardından besiyerinin içeriği pH 6,20±0,2'ye ayarlanmıştır. Besiyeri otoklavda 121 °C sıcaklıkta 15 dk boyunca steril edilmiştir. BSM Agar besiyeri hazırlamak için ise pH ayarı yapıldıktan sonra 1000 mL besiyeri içerisinde 15 g Agar (Merck) olacak şekilde tartılmış ve otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edilmiştir. Oda koşullarında sıcaklık yaklaşık 50 °C'ye düştüğünde petri kaplarına aktarılmış ve agarlar donduktan sonra 37 °C'lik etüve kaldırılmıştır. 1 gece etüvde kalan petrilerin temizliğinden emin olunduktan sonra petriler +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.6. Bifidobacterium Selective Besi yeri (BSM) içeriği

Maddeler	Miktar (g/L)	Maddeler	Miktar (g/L)
Pepton	10	Sodyum klorit	5
Sodyum asetat	3	Glukoz	5
Yeast ekstrakt	3	Sistein hidroklorit	0,5
Sodyum propiyonat	3	Lityum klorit	2
Beef ekstrakt	10	Nişasta	1

Çalışmamızda kullanılan Sodyum-fosfat tamponu 0,2 M NaH₂PO₄.H₂O ve 0,2 M Na₂HPO₄ hazırlandıktan sonra, 250'şer mL distile su ile manyetik karıştırıcıda karıştırılıp ardından pH'nın 7,5±0,2'ye ayarlanması ile elde edilmiştir. 500 mL olacak şekilde çözeltiler bir araya getirilmiş ve tampon otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edilmiştir.

Çalışmalarda kullanılan serum fizyolojik (SF) çözeltisi ise %0,875 oranında sodyum klorür (NaCl, Merck)'ün tartılarak distile su içerisinde çözündürülmesi ve otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edilerek hazırlanmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Maya ve bakterilerin aktifleştirilmesi

Mayalar ve bakterilerin inokülasyon miktarları %2 olacak şekilde uygun besi yerlerine ekimleri yapılmış ve 37 °C’de uygun sürelerde (24 veya 48 saat) geliştirilen kültürler en az iki kez aktifleştirildikten sonra çalışmalara alınmıştır.

3.2.2. Maya ve Bakterilerin muhafazası

Maya ve bakteri kültürleri uygun besi ortamında iki kez aktifleştirilmiş ve Gram boyama yapılarak mikroorganizmaların kontaminasyon kontrolü yapılmıştır. Maya ve bakterilerin yapılan çalışmalarda kullanılan kültür stokları gliserol ve uygun besiyeri içinde -80 °C’lik derin dondurucu içerisinde, ana stoklar ise liyofilize edilerek +4 °C’de muhafaza edilmiştir (Harrigan ve McCance, 1976).

Gliserol içerisinde muhafaza:

1,2 mL’lik ağzı kapaklı kriyo tüpler içerisine 400 µL gliserol konularak, otoklavda 121 °C’de 15 dk steril edilmiştir. Gliserol içeren steril kriyo tüplere iki kez aktifleştirilip kontaminasyon kontrolü yapılmıştır. Kültürlerden 400 µL ilave edilerek, maya ve bakteri suşları -80 °C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Stoklar üç ayda bir yenilenmiştir (Strasser, Neureiter, Geppl, Braun ve Danner, 2009).

Liyofilizasyon yöntemi ile muhafaza:

Bakterilerin liyofilizasyon yöntemi ile muhafazası literatürdeki metotlar uygulanmıştır (de Valdez, de Giori, de Ruiz Holgado ve Oliver, 1985; Cody ve diğerleri, 2008). Aktifleştirilen kültürlerden katı besi ortamına ekim yapılmış ve petriler 37 °C’de 24- 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan koloniler, içerisinde 750 µL steril serum fizyolojik bulunan ependorflara aktarılaraq (yaklaşık 50-60 koloni), pipetle homojenize edilmiştir. İçinde 750 µL steril Skimmed Milk Broth (LAB) bulunan vialler içerisine, bakteri süspansiyonundan 250 µL aktarılmıştır. Vialler -80 °C’ye alınarak, 1 gece bekletilmiş ve ertesi gün liyofilizatör

cihazında liyofilize işlemine geçilmiştir (Resim 3.1). Liyofilize bakteri kültürleri +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.3. Bakterilerin sayımı

Bu tez kapsamında yapılan çalışmaların standart şekilde gerçekleştirilebilmesi amacıyla, çalışmada kullanılan mikroorganizmaların 10^8 kob/mL canlılık oranını verdiği optik yoğunluklar belirlenmiştir. Öncelikle mikroorganizmalar McFarland densitometre cihazında ya da spektrofotometre cihazında farklı optik yoğunluklara ayarlanmış ve sonrasında uygun katı besiyerlerine alınarak canlılık sayımları yapılmıştır. Her mikroorganizma için 10^8 kob/mL canlılık oranını veren optik yoğunluklar bu şekilde belirlenmiş ve bu çalışmada uygulanan yöntem de çalışmamızda belirlenen standart değerler üzerinden açıklanarak aşağıda sunulmuştur.

Mikroorganizmaların optik yoğunluklarının ayarlanması

Çalışmada kullanılan suşlar 5 mL besiyerinde 2 kez aktifleştirilmiştir. Sonrasında 3000 rpm’de santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve pellet 5 mL steril SF ile çözülerek tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant atılmış SF ile 2 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiş, pellet elde edilmiştir. Optik yoğunluğun ayarlanmasında mikroorganizmaların için McFarland densitometre cihazı kullanılmıştır. Santrifüj ile çöktürülmüş bakteri pelleti steril SF içine alınarak mikroorganizma yoğunluğu 7’ye ayarlanmıştır. Bu şekilde optik yoğunlukları ayarlanan mikroorganizmaların canlı hücre sayımının yapılabilmesi için katı besi ortamlarına ekilmiştir.

Canlı hücre sayımı ve hesaplaması

Optik yoğunlukları ayarlanmış olan mikroorganizmalar, seri dilüsyon yöntemiyle dilüe edilmiştir. Elde edilen 6 farklı dilüsyonun her birinden 100 µL alınarak, Bölüm 3.1.4’te belirtilen uygun katı besi ortamlarına drigalski ile yayma ekim yapılmıştır. Çalışmalar 3 paralelli olacak şekilde yürütülmüştür. 37 °C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılan petri kutularında oluşan koloniler sayılarak örneklerde canlı mikroorganizma sayıları belirlenmiştir (Gürgün ve Halkman, 1990: 7-20). Her mikroorganizma için 10^8 kob/mL canlı yoğunluğunu veren dalga boyu bu şekilde belirlenerek, çalışmalarda suşlar McFarland

densitometre cihazında 7'ye ayarlanmıştır. Canlı mikroorganizma sayımı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

$$\text{kob/mL} = \frac{\text{Ortalama Koloni sayısı} \times \text{Dilüsyon faktörü}}{\text{Petri kutularına aktarılan inokulum miktarı (0,1 mL)}}$$

3.2.4. β -glukan ekstraksiyonu

Pichia kudriavzevii maya suşları (M5, M10, M13, M16, M57) öncelikle 5 mL besiyerine %2 oranında ekilmiş ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Maya suşlarının saflık kontrolleri, her çalışmada çizgi ekim ve mikroskopik incelemelerle yapılmıştır.

β -glukan ekstraksiyon işlemlerinde Liu ve diğerleri, 2008; Magnani ve diğerleri, 2009 ve Freimund ve diğerleri, 2003 çalışmalarından yararlanılmıştır. Hazırlanan hücre süspansiyonuna, otoliz promotörü olarak %3 sodyum klorit (NaClO_2) ilave edilmiş ve pH 5,0'da, 120 rpm'lik çalkalamalı inkübatörde 24 saat 55 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra otolizat 80 °C'de 15 dk boyunca sıcak su banyosunda bekletilmiş sonra oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Otolize edilmiş hücreleri, diğer maya özütlerinden ayırmak için oda sıcaklığında 10 dakika boyunca 3900 g'de santrifüjlenmiştir. Hücreler, bir sonraki adım için 4 °C'de muhafaza edilmiştir. 0,02 M sodyum-fosfat tamponu ile hazırlanan süspansiyon, içerisine cam boncuk ilave edilerek 121 °C'de 4 saat otoklavlanmıştır. Çözünmeyen tortu 3900 g'de santrifüj ile ayrılmış, distile su ile 2 kez yıkanmıştır. Elde edilen hücre duvarı muhafaza için +4 °C'ye alınmıştır. Örneklerin 6 dk sonikasyonundan sonra lipidlerin uzaklaştırılması amacıyla sonike edilen maya hücreleri izopropanol ile 2 saat reflux cihazında muamele edilmiştir. Bunun için numune, filtre kâğıdı ile sarılmış ve numuneden akışın olabileceği şekilde konumlandırılmıştır. Lipitleri uzaklaştırılmış pellet, diğer kalıntılardan da arındırılmak için asetonla 1:1 oranında yıkanmış, ardından santrifüjlenip, +4 °C'de muhafazaya alınmıştır. Hücre duvarının proteolizi aşamasında protamex enzimi yardımıyla kalan proteinler ekstrakte edilmiştir. 0,4 U protamex enzimi, 55 °C'de optimum pH 5 ve pH 7,5'te etkili olduğu göze alınarak 5 saat süspansiyon ile birlikte enzim aktivasyonu sağlanmıştır. Enzim 80 °C' de sıcak su banyosunda inaktive edilerek, 10 dk 3900 g'de 2 kez ddH₂O ile yıkanmış ve elde edilen hücre duvarı +4 °C'de depolanmıştır. Elde edilen örnekler, ağız tıpalı viyallerin içerisine 2 mL olacak şekilde paylaştırılarak, çalışmalar ve muhafaza için -80 °C'de bir gece bekletilmiş ve liyofilizatör cihazında (Christ alpha 2- 4 LD Plus freeze) 24 saat kurutulmuştur (Resim 3.1).



Resim 3.1. Liyofilize edilmiş β -glukan örneği

3.2.5. β -glukan ekstraksiyonun optimizasyonu

Diğer aşamalar Bölüm 3.2.4’de verilen metot gibi yapılmıştır. *S. cerevisiae* BD1 suşu tüm β -glukan ekstraksiyonun optimizasyonu basamaklarında pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

İnokülasyon miktarı

Yüksek hacimde β -glukan’ın ekstrakte edilebilmesi amacıyla, 1000 mL YPD sıvı besiyerine %5, %10, %20, %40’lık ekimler yapılarak, mayaların 37 °C’de 80 rpm’lik çalkalamalı inkübatörde 24 saat inkübasyonları gerçekleştirilmiştir.

Otoliz

1. Biyomas örneklerine farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 15, 20 mL) %3’lük NaClO₂,
2. Besiyeri+biyomas örneklerine farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 15, 20 mL) %3’lük NaClO₂,
3. Belirlenen en iyi %3’lük sodyum klorit konsantrasyonunda (10 mL) sıcak su banyosunda bekletme süreleri (20 ve 30 dk) uygulanmıştır.

Sıcak su muamelesi

1. Dört farklı hacimde (5 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL) 0,02 M sodyum-fosfat tamponu (pH 7,5) biyomasa ilave edilerek,
2. Hücre duvarının dayanıklılığının azaltılıp, hücre lizatının çıkarılması için, farklı miktarlarda (2, 4, 8 g) cam boncuk (çap 0,3-0,4 cm) biyomasa ilave edilmiştir.

3. Mekanik darbenin hücre duvarının parçalanmasına katkısını görmek amacıyla, kullanılan metotlarda bulunmayan vorteks aşaması otoklavdan önce ve sonra 5'er dk olarak uygulanmıştır.

Sonikasyon

Sıcak su muamelesinden elde edilen maya hücre duvarlarının dayanıklılığının azaltılmasına,

1. Farklı çözeltilerde (distile su, serum fizyolojik ve sodyum sitrat),
2. Seçilen çözeltinin (su) değişen miktarlarında (10 mL, 20 mL, 30 mL),
3. Uygun çözelti miktarı kullanılarak farklı sonikasyon sürelerinin (10 dk, 20 dk. ve 30 dk) etkisi belirlenmiştir.

3.2.6. β -glukan miktarlarının hesaplanması

P. kudriavzevii maya suşlarından ekstrakte β -glukan miktarları Enzimatik Maya β -Glukan Kiti (K-EBHLG 03/13 Megazyme, Bray, İrlanda) kullanılarak belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak *S. cerevisiae* BD1 ve ticari β -glukan kullanılmıştır.

β -glukan numunesinden enzim kitinin kullanım prosedürüne göre 100 mg kuru örnek alınarak kapaklı test tüpüne aktarılmıştır. Üzerine 0,4 mL 2 M KOH çözeltisi eklenmiştir ve kapağı kapatılarak vorteks cihazında karıştırıldıktan sonra 30 dakika 100 °C'deki buzlu su banyosunda karıştırılmıştır. Bekleme süresinin sonunda tüplerin kapakları açılarak 16 mL 1,2 M sodyum asetat tamponu (pH 3,8) eklenmiş, iyice karıştırıldıktan sonra 40 μ L Glucazyme™ ilave edilmiştir. Ardından her bir tüpe 10 mL su ekleyiş karıştırıldıktan sonra tüpler 3.000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Numunenin 0,1 mL'si iki paralel halinde ölçüme alınmıştır. İşlemin sonunda her bir tüpe 4 mL glikoz oksidaz-peroksidaz karışımı (GOPOD ayracı) eklenip 40 °C sıcaklıkta 20 dk bekletilmiştir. Bekleme işlemi sonunda UV spektrofotometrede 510 nm dalga boyunda absorbands ölçülmüştür. Ayrıca her bir numune için 1 tane kontrol maya preparatı, 4 glikoz standardı (1 mg/mL) ve blank hazırlanmıştır. Yapılan okumalar sonucu elde edilen β -glukan miktarına göre hesaplanmıştır.

$$\beta\text{-glukan (w/w)} = \Delta E \times F \times 12.04/0.1 \times 100/W \times 1/1000 \times 162/180$$

ΔE = Reaksiyon absorbansı – blank absorbansı

F = D-glukoz absorbansını μg 'a çevirme faktörü

12,04 / 0,1 = Hacim düzeltmesi (12,04 mL'den 0,1 mL alınır)

GOPOD absorbansı

100/W = 100 mg'a çevirme W = Numune miktarı (g)

162/180 = Serbest D-glukozdan anhidroglukoza çevirme faktörü

1/1000 = μg 'den mg'ye dönüşüm

3.2.7. Kuru madde miktarı

Kuru madde tayini; kuru veya yaş maddenin bir kısmının, belirli bir ısıda içeriğindeki su miktarı uçurulduktan sonra, elde edilen maddenin yüzde olarak hesaplanmasını esas alan bir yöntemdir. Maya örnekleri petrilere koyularak etüvde $100 \pm 5^\circ\text{C}$ sıcaklıkta ~15 saat kurumaya bırakılmıştır. Oda sıcaklığına alınıp soğutulduktan sonra tartılmış ve gerekli hesaplamalar yapılmıştır.

$$\% \text{ Kuru Madde} = (c-a) / (b-a) \times 100$$

a =Dara (g)

b =Dara+numune (g)

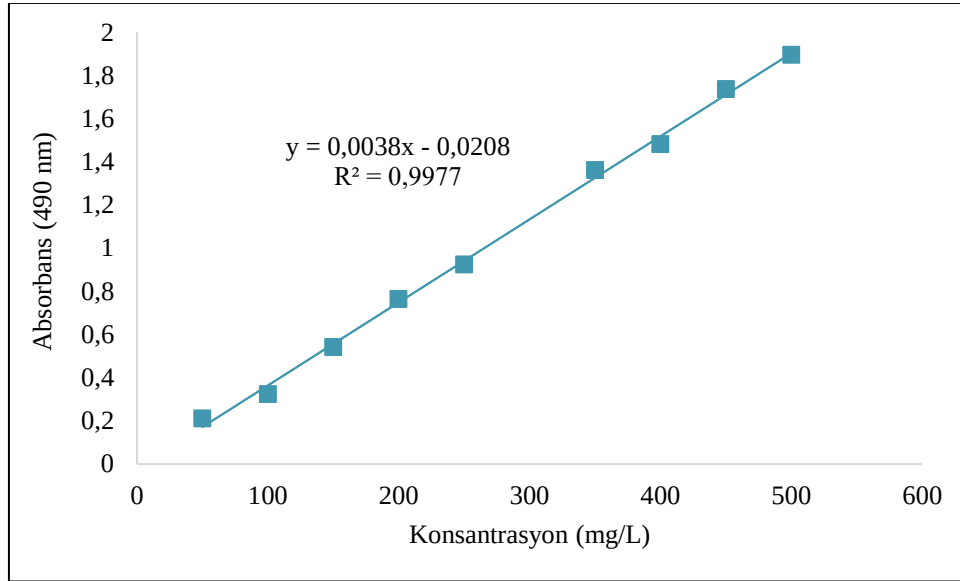
c =Dara+kuru madde (g)

3.2.8. β -glukanlarda toplam karbonhidrat miktarının belirlenmesi

β -glukanların toplam karbonhidrat miktarı fenol-sülfürik asit metodu ile belirlenmiştir. 1 mL distile su içerisinde 0,1 g liyofilize β -glukan çözündürülmüştür. Kör olarak 1 mL ultra saf su kullanılmıştır. Önceden steril edilmiş cam tüpler içerisindeki örneklerin üzerine çeker ocağın içerisinde 0,5 mL fenol (Sigma) ve 5 mL sülfürik asit (Merck) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dk bekletilen örnekler, vorteks yardımıyla iyice karıştırılmış ve 37°C 'lik etüv içerisinde 15-20 dk bekletilmiştir. Örneklerin optik yoğunlukları 490 nm dalga boyunda spektrofotometrik (Digilab Hitachi U-1800) olarak ölçülmüştür (Dubois ve diğerleri, 1956)

Glukoz standardının hazırlanması

Standart olarak kullanılan glukoz (Merck), 50-500 mg/L arasında değişen oranlarda tartılmış ve örnekler ile aynı koşullarda fenol-sülfürik asit metodu uygulanmıştır. Standartların 490 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülerek standart eğri oluşturularak formül elde edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Glukoz standart eğrisi

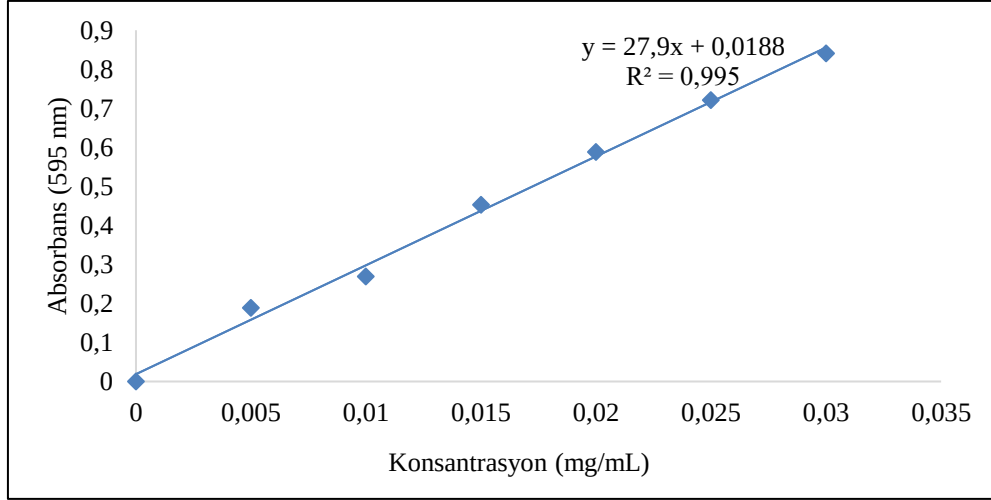
3.2.9. Toplam protein miktarı

Suda çözünebilir protein içeriği Thermo Scientific™ Pierce™ BCA kiti kullanılarak belirlenmiştir. Standart olarak bovine serum albumin kullanılmıştır. Ekstraktların toplam protein miktarı BSA ile standart eğri oluşturularak belirlenmiştir (Şekil 3.2).

Kit Uygulaması:

- 1) Kit içeriğinde belirtildiği şekilde standartlar hazırlanmıştır ve blank de dahil olmak üzere her standart 25 µL olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara eklenmiştir.
- 2) Protein miktarı bilinmeyen hücre örnekleri de her örnekten 25 µL olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara eklenmiştir.
- 3) Kit içerisinde yer alan çalışma solüsyonu her örnek ve standart için 200 µL olacak şekilde kuyucuklara eklenerek 30 saniye karıştırılmıştır.

- 4) 96 kuyucuklu plak alüminyum folyo ile sarılarak 37 °C inkübatörde 30 dk inkübe edilmiştir.
- 5) İnkübasyon süresinin ardından plak soğutularak 540-590 nm dalga boyunda mikropalak okuyuda okutulmuştur.



Şekil 3.2. Protein standart eğrisi

3.2.10. Toplam lipit içeriği

Toplam lipit içeriği AOAC (1990) resmi metodu kullanılarak belirlenmiştir (Williams, 1984). Analiz edilecek örnekte nem oranının %10'un altında olması gerekmektedir bunun için örnek, öncelikle bir kurutma kabına konularak 80 °C'den fazla olmayan bir sıcaklıkta etüvde kurutulmuştur. Örneğin koyulacağı balon daha önce steril edilip, etüvde kurutulup, soğutulmuştur. Balonun içerisine iki tane cam boncuk koyularak balon 1 mg duyarlılıkta tartılarak darası alınmıştır. Örnekten yaklaşık 5-10 mg tartılmıştır. Toplam lipit miktarının belirlenebilmesi için tartılan numune, kurutma kağıdına sarılarak reflükse yerleştirilmiştir. Balona 100 mL izopropanol ilave edilmiştir. Balon, ekstraktör ve soğutucu birbirine bağlanmıştır. Balon ısıtıcı tabla üzerine yerleştirilmiştir. Organik çözücü yavaş yavaş kaynayacak şekilde sıcaklık 82,5 °C ayarlanmıştır. Reflüks hızı dakikada en az iki-üç damla olacak şekilde 6-8 saatlik ekstraksiyon uygulanmıştır. Geriye kalan az miktardaki çözücünün uzaklaştırılması için cam balon evaporatöre alınmış, kalan çözünün 75 °C, 500 atm basınçta buharlaştırılması sağlanmıştır. Organik çözücü tamamen uzaklaştırıldıktan sonra balon tartılmış ve 37 °C'deki etüvde 10 dakika bekletildikten sonra oda sıcaklığında soğutulup tekrar tartılmıştır (Resim 3.2). Balonun son ağırlığı kaydedildikten sonra içindeki lipit içeriği % lipit olarak aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Lipit (g/100 g) } = (M_2 - M_1) / m \times 100$$

M_1 = Sabit tartıma getirilmiş balonun ağırlığı (g)

M_2 = Balonda son tartımda bulunan toplam lipit içeriği (g)

m = Alınan örneğin ağırlığı (g)



Resim 3.2. Lipit içeriğinin reflüks cihazı ile belirlenmesi

3.2.11. β -gluM13'ün prebiyotik etkileri

β -gluM13'ün *Ligilactobacillus plantarum* GD2 tarafından fermente edilebilme kapasitesi

Bu çalışmada G. Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonunda bulunan probiyotik *L. plantarum* GD2 test bakterisi olarak, pozitif kontrol olarak MRS besiyeri, negatif kontrol olarak ise glukozsuz MRS besiyeri kullanılmıştır. β -gluM13'ün *L. plantarum* GD2 tarafından fermente edilebilme kapasitesi, glukozsuz MRS sıvı besiyerine 0,45 μ m por çaplı disposable filtreden geçirilen ve glukoz ile aynı oranda (%2) β -gluM13 ilave edilen besiyerinde tespit edilmiştir. *L. plantarum* GD2, besiyerlerine %2 oranında aşıl原因arak 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiş ve inkübasyonun ardından bakteriler vortexlenmiştir. 30 dk 3000 rpm de santrifüjlendikten sonra süpernatantlar dökülmüştür. Pelletlerin üzerine 5 mL SF ilave edilip vortexlenmiş ve bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır. Pelletler 1 mL SF içerisinde çözülerek McFarland 7 bulanıklık değerine (~7,3 log kob/mL) ayarlanmıştır. İçerisinde 900 μ L steril SF bulunan ependorflara 100'er μ L aktararak 10^{-1} ile 10^{-8} dilüsyonları arasında MRS agar besiyerlerine yayma ekimleri yapılmış ve 37 °C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası besiyerinde oluşan tüm koloniler sayılmış ve koloni sayım formülüne göre (bkz Bölüm 3.2.3) toplam bakteri sayısı log kob/mL cinsinden hesaplanmıştır.

β -gluM13'ün *Bifidobacterium bifidum* A12 tarafından fermente edilebilme kapasitesi

Bu çalışmada G. Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonunda bulunan probiyotik *B. bifidum* A12 test bakterisi, pozitif kontrol olarak BSM besiyeri, negatif kontrol olarak ise glukozsuz ve nişastasız BSM besiyeri kullanılmıştır. β -gluM13'ün *B. bifidum* A12 tarafından fermente edilebilme kapasitesi, glukozsuz ve nişastasız BSM sıvı besiyerine 0,45 μ m por çaplı disposable filtreden geçirilen ve glukoz ile aynı oranda (%2) β -gluM13 ilave edilen besiyerinde tespit edilmiştir. *B. bifidum* A12, besiyerlerine %2 oranında aşıl原因arak 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiş ve ardından bakteriler vortexlenmiştir. 30 dk 3000 rpm de santrifüjlendikten sonra süpernatantlar dökülmüştür. Pelletlerin üzerine 5 mL SF ilave edilip vortexlenmiş ve bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır. Pelletler 1 mL SF içerisinde çözülerek McFarland 7 bulanıklık değerine (~7,3 log kob/mL) ayarlanmıştır. İçerisinde 900 μ L steril SF bulunan ependorflara 100'er μ L aktararak 10^{-1} ile 10^{-8} dilüsyonları arasında BSM agar besiyerlerine yayma ekimleri yapılmış ve 37 °C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası besiyerinde oluşan tüm koloniler sayılmış ve koloni sayım formülüne göre (bkz Bölüm 3.2.3) toplam bakteri sayısı log kob/mL cinsinden hesaplanmıştır.

β -gluM13'ün *Saccharomyces cerevisiae* BD1 tarafından fermente edilebilme kapasitesi

Bu çalışmada G. Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonunda bulunan probiyotik *S. cerevisiae* BD1 test mayası, pozitif kontrol olarak YPD besiyeri, negatif kontrol olarak ise glukozsuz YPD besiyeri kullanılmıştır. β -gluM13'ün *S. cerevisiae* BD1 tarafından fermente edilebilme kapasitesi, glukozsuz YPD sıvı besiyerine 0,45 μ m por çaplı disposable filtreden geçirilen ve glukoz ile aynı oranda (%2) β -gluM13 ilave edilen besiyerinde tespit edilmiştir. *S. cerevisiae* BD1, besiyerlerine %2 oranında aşıl原因arak 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiş ve ardından mayalar vortexlenmiştir. 30 dk 3000 rpm de santrifüjlendikten sonra süpernatantlar dökülmüştür. Pelletlerin üzerine 5 mL SF ilave edilip vortexlenmiş ve bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır. Pelletler 1 mL SF içerisinde çözülerek McFarland 7 bulanıklık değerine (~7,3 log kob/mL) ayarlanmıştır. İçerisinde 900 μ L steril SF bulunan ependorflara 100'er μ L aktararak 10^{-1} ile 10^{-8} dilüsyonları arasında YPD agar besiyerlerine yayma ekimleri yapılmış ve 37 °C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası besiyerinde oluşan tüm koloniler sayılmış

β -gluM13'ün Bifido Gelişimi Düzenleyici (BGD) Etkisinin Belirlenmesi

β -gluM13'ün BGD etkisinin belirlenmesinde, BSM besi ortamına glukoz ve nişasta yerine, farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 5, 10 mg/mL) β -gluM13 ilave edilen besiyerleri kullanılmıştır. β -gluM13, 0,45 μ m por çaplı disposable filtrelerden geçirilerek, glukozsuz steril 5 mL BSM besiyerlerine son konsantrasyon 0,5, 1, 5, 10 mg/mL olacak şekilde ilave edilmiştir. McFarland 7 bulanıklık değerine ($\sim 7,3$ log kob/mL) ayarlanan *B. bifidum* A12 kültürü %2 oranında besiyerlerine aşılanmıştır. Glukozsuz BSM (C-BSM) besiyeri negatif kontrol, BSM sıvı besiyeri ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

β -gluM13'ün BGD etkisini ticari olarak kullanılan inülin prebiyotiği ile karşılaştırmak için 5 mL C-BSM besiyeri bulunan deney tüplerine glukoz ile aynı oranlarda (%2) 0,5, 1, 5, 10 mg/mL'lik inülin eklenmiştir. Pozitif ve negatif kontrol grubu deney tüpleri ile inülin eklenen deney tüplerine *B. bifidum* A12 suşu %2 oranında aşılanmıştır. Örnekler 37 °C'de 18 saat, inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda içerisinde 900 μ L steril SF bulunan ependorflara 100'er μ L bakteri aktarılarak 10^{-1} 'den 10^{-8} 'e kadar seri dilüsyonlar üç paralel olarak yapılmıştır. 10^{-1} - 10^{-8} dilüsyonları arasından BSM agar besiyerlerine yayma ekim yapılmış ve 37 °C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası besiyerinde oluşan tüm koloniler sayılmış (Resim 3.3) ve koloni sayım formülüne (bkz Bölüm 3.2.3) göre toplam canlı hücre sayısı log kob/mL cinsinden hesaplanmıştır.

β -gluM13'ün Maya Gelişimi Düzenleyici (MGD) Etkisinin Belirlenmesi

β -gluM13'ün MGD etkisinin belirlenmesinde, YPD besi ortamına glukoz yerine, farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 5, 10 mg/mL) β -gluM13 ilave edilen besiyerleri kullanılmıştır. β -gluM13, 0,45 μ m por çaplı disposable filtrelerden geçirilerek, glukozsuz steril 5 mL YPD besiyerlerine son konsantrasyon 0,5, 1, 5, 10 mg/mL olacak şekilde ilave edilmiştir. McFarland 7 bulanıklık değerine ($\sim 7,3$ log kob/mL) ayarlanan *S. cerevisiae* BD1 kültürü %2 oranında besiyerlerine aşılanmıştır. Glukozsuz YPD (C-YPD) besiyeri negatif kontrol, YPD sıvı besiyeri ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

β -gluM13'ün MGD etkisini ticari olarak kullanılan inülin prebiyotiği ile karşılaştırmak için 5 mL C-YPD besiyeri bulunan deney tüplerine glukoz ile aynı oranlarda (%2) 0,5, 1, 5, 10 mg/mL'lik inülin eklenen besiyerlerine *S. cerevisiae* BD1 suşu %2 oranında aşılanmıştır ve 37

°C’de 18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda içerisinde 900 µL steril SF bulunan ependorflara 100’er µL bakteri aktarılarak 10^{-1} ’den 10^{-8} ’e kadar seri dilüsyonlar üç paralel olarak yapılmıştır. 10^{-1} - 10^{-8} dilüsyonları arasından YPD agar besiyerlerine yayma ekim yapılmış ve 37 °C’de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası besiyerinde oluşan tüm koloniler sayılmış (Resim 3.3) ve koloni sayım formülüne göre (bkz Bölüm 3.2.2) toplam canlı hücre sayısı log kob/mL cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.12. Antioksidan aktivite

β-gluM13’ün radikal süpürücü aktivitesi 1,1-difenil-2-pikrilhidraz (DPPH) yöntemi ile belirlenmiştir (Li ve diğerleri, 2012). 0,4 mg DPPH 10 mL Dimetil sülfosit (DMSO) içerisinde çözülmüş ve çözelti 1 dk 20 kHz’de sonike edilmiştir. Hazırlanan DPPH çözeltisi ışık görmemesi amacıyla alüminyum folyo ile sarılmıştır. 0,2, 0,5, 1, 5, 10, 20, 30 ve 100 mg/mL’lik 7 farklı konsantrasyonda β-glukan numunesi 1 mL DMSO’da çözülmüştür. Örneklerin üzerine 1 mL DPPH çözeltisi ve 1 mL DMSO ilave edilmiş ardından 1 dk. vortekslenmiştir. 20 °C’lik sıcak su banyosunda 40 dk inkübe edilmiştir. Bu işlem sırasında örneklerin ışık almadığından emin olunmalıdır. İnkübasyon sonunda örnekler spektrofotometre cihazında 517 nm absorbansta okunmuştur. Kör için DMSO, kontrol için DMSO+DPPH kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak askorbik asit kullanılmıştır. Analizler 2 tekrarlı olarak yapılmıştır.

β-glukanın DPPH radikalini % giderimi;

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

3.2.13. β-gluM13’ün gastrointestinal sistemde dayanıklılığı

β-gluM13’ün gastrointestinal sistemde dayanıklılığı Shi ve diğerleri, 2018 metodu değiştirilerek belirlenmiştir.

Yapay mide sıvısı, %0,5’lik serum fizyolojik çözeltisi içerisine, son konsantrasyon 3 g/L olacak şekilde pepsin ilave edilerek hazırlanmıştır. Çözelti manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve pH’sı 1 M HCl ve 0,1 M NaOH çözeltileri ile 2 ve 3’e ayarlanmıştır. Hazırlanan yapay mide sıvısının taze olmasına dikkat edilmiştir.

Yapay ince bağırsak sıvısı, %0,5'lik serum fizyolojik çözeltisi içerisine son konsantrasyon 1 g/L olacak şekilde %0,3'lük pankreatinin ilave edilerek manyetik karıştırıcıda hazırlanmıştır. Hazırlanan bağırsak sıvısına %0,3 ve %0,5 safra tuzu eklenerek süspanse edilmiş ve 0,1 M NaOH çözeltisi ile pH 8'e ayarlanmıştır. Hazırlanan yapay ince bağırsak sıvısının taze olmasına dikkat edilmiştir.

β -gluM13, yapay mide ortamında pH 2 ve pH 3'te 90dk ve 180 dk inkübe edilmiştir. Yapay ince bağırsak sıvısında ise, %0,3 ve %0,5 safra konsantrasyonunda 240 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyondan önce ve sonra her iki ortamdaki β -glukanların karbonhidrat miktarı fenol-sülfürik asit metoduyla (bkz Bölüm 3.2.8) ölçülmüştür. Hidroliz olma yüzdeleri aşağıda belirtilen formül ile hesaplanmış ve böylece β -gluM13'ün gastrointestinal ortamdaki dayanıklılıkları tespit edilmiştir.

Hidroliz yüzdesi (%) =

$$\frac{\text{Başlangıç karbonhidrat miktarı} - \text{Başlangıç ve son karbonhidrat miktar farkı}}{\text{Son karbonhidrat miktarı} - \text{Başlangıç ve son karbonhidrat miktar farkı}}$$

3.2.14. İstatistiksel analizler

Tüm çalışmalar, her çalışma için paralel sayısı değişmekle birlikte genel olarak iki paralelli ve iki tekerrürlü olacak şekilde yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen veriler bu tekrarların ortalaması $\pm$ standart sapma (SD) şeklinde verilmiştir. Çalışmalarda kullanılan istatistiksel analizlerde SPSS Inc. Software (22.0 Versiyonu; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kullanılmıştır. İstatistiksel analiz yapılan çalışmalar;

1. Optimizasyon çalışmasındaki maya biyoması-karbonhidrat miktarı ve biyomas-protein miktarı, ekstraksiyonun her bir basamağındaki karbonhidrat- β -glukan miktarı, karbonhidrat-protein miktarı, karbonhidrat-lipit miktarı arasında,
2. β -gluM13'ün farklı konsantrasyonları (0,5, 1, 5 ve 10 mg/mL) ile laktobasil, bifido ve maya gelişimi düzenleyici aktiviteler arasında,
3. β -gluM13'ün farklı konsantrasyonları (0,2-50 mg/mL) ile DPPH radikalini giderme etkisi arasında,
4. β -gluM13'ün farklı konsantrasyonları (0,5, 1, 5 ve 10 mg/mL) ile yapay mide ve yapay bağırsak sıvısında β -gluM13'ün hidroliz olma durumları arasında bir korelasyon olup

olmadığı Korelasyon ($r= 0,00- 0,25$ çok zayıf ilişki, $0,26- 0,49$ zayıf ilişki, $0,50 - 0,69$ orta ilişki, $0,70 - 0,89$ yüksek ilişki, $0,90 - 1,0$ çok yüksek ilişki) testleri ile analiz edilmiştir.





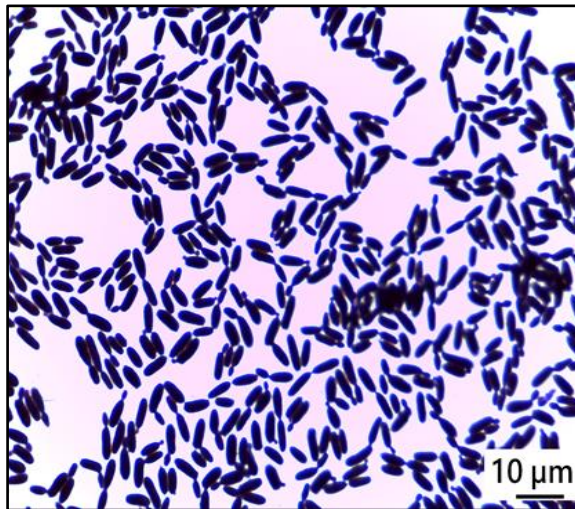
4. BULGULAR

4.1. Mikroorganizma İnokülasyon Miktarının Belirlenmesi

Bu çalışmada peynirden izole edilen ve 18S rRNA analizi ile moleküler olarak tanımlanmış beş farklı *Pichia kudriavzevii* maya suşu kullanılmıştır. Çalışma kapsamında kullanılan *P. kudriavzevii* M5, M10, M13, M16, M57 maya suşlarının saflık kontrolleri her çalışmada çizgi ekim ve mikroskopik inceleme ile yapılmıştır. En iyi gelişmeyi gösteren suşun belirlenmesi amacıyla, mayalar aktifleştirilmiş, canlı mikroorganizma sayısı hesaplanmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, M10 suşunun diğer mayalardan daha iyi gelişme yeteneğine sahip olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.1). Bu sebeple optimizasyon işlemleri M10 suşu ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan *P. kudriavzevii* M10 suşunun basit boyama sonucunda ışık mikroskopundaki (Leica, Germany) görüntüsü Resim 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. *P. kudriavzevii* maya suşlarına ait canlı hücre sayısı

Suş	Canlılık Hücre Sayısı (log kob/mL)
M5	5,4±0,2
M10	6,5±0,1
M13	6,4±0,0
M16	5,9±0,3
M57	6,2±0,3



Resim 4.1. Çalışmada kullanılan *P. kudriavzevii* M10 maya suşunun ışık mikroskopundaki görüntüsü (100X)

Maya hücre duvarında bulunan β -glukan'ın ekstraksiyonunda fazla miktarda biyomas elde edilmesi amacıyla, en iyi gelişme yeteneğine sahip olan *P. kudriavzevii* M10 suşundan 1000 mL'lik YEPD besiyerine farklı inokülasyon miktarlarında (%5, 10, 20 ve 40) ekim yapılmış, biyomas (gram), karbonhidrat (mg/L) ve protein (mg/mL) miktarları belirlenmiştir (Çizelge 4.2). En iyi biyomas miktarı 2,48 g ile %10 inokülasyon yapılan örnekte, en fazla karbonhidrat miktarı 312 mg/mL ile %10 inokülasyon yapılan örnekte ve en fazla protein miktarı ise %5 ekim yapılan örnekte tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda inokülasyon oranı ve biyomas miktarı arasında herhangi bir korelasyon belirlenemezken, biyomas miktarı ile karbonhidrat miktarı arasında pozitif yönde çok güçlü bir ilişki ($r=0,934$) tespit edilmiş, biyomass miktarı arttıkça karbonhidrat miktarı artmıştır, karbonhidrat miktarı ile protein miktarı arasında ise negatif yönde güçlü bir ilişki ($r=-0,775$) tespit edilmiştir, karbonhidrat miktarı arttıkça protein miktarı azalmaktadır.

Çizelge 4.2. *P. kudriavzevii* M10 suşundan elde edilen biyomas, karbonhidrat ve protein miktarı

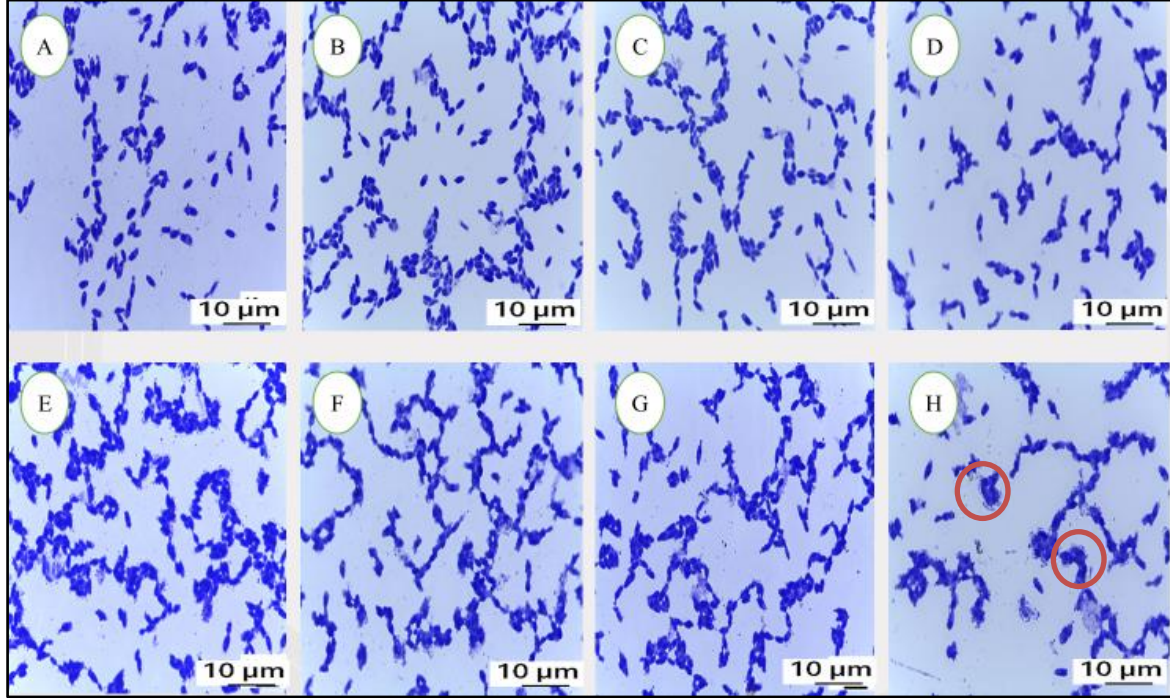
İnokülasyon miktarı (%)	Biyomass miktarı (g)	Karbonhidrat miktarı (mg/L)	Protein miktarı (mg/mL)
5	1,02	308±0,00	0,674±0,00
10	2,48	312±0,00	0,634±0,00
20	1,54	310±0,00	0,635±0,00
40	1,27	310±0,00	0,628±0,00

4.2. β -glukanın Ekstraksiyonunun Optimizasyonu

4.2.1. Otoliz

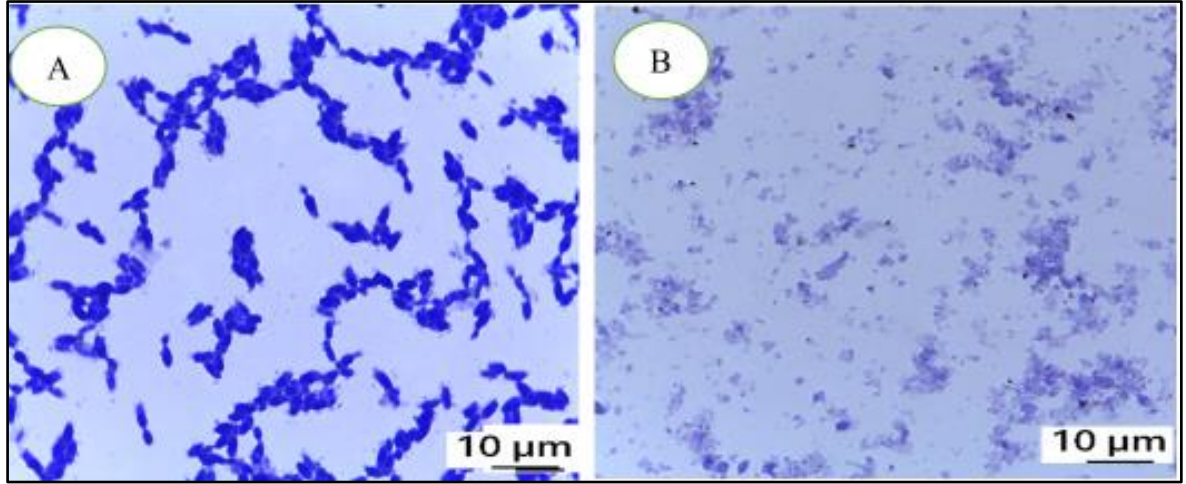
Otoliz işleminde kullanılan promotörü hücre otolizi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğundan, bu çalışmada biyomas ve besiyeri+biyomas örneklerine farklı miktarlarda (5, 10, 15, 20 mL) otoliz promotörü (NaClO_2) uygulanmıştır. Farklı miktarlarda NaClO_2 ile muamele edilen biyomas ve besiyeri+biyomas örnekleri kristal viyole ile boyanmış, ışık mikroskopunda 100X'lük objektifte örneklerin hücre yapılarındaki değişimler gözlenmiştir (Resim 4.2). besiyeri+biyomas (Resim 4.2A-D) örneklerinin NaClO_2 ile muamele edilen biyomas örneklerine (Resim 4.2E-H) kıyasla hücre duvarının çok daha az otolize olduğu tespit edilmiştir. NaClO_2 miktarındaki artış hücre yapısının kristalleşmesine neden olmuştur.

Bundan dolayı biyomas örnekleri üzerine uygulanan 10 mL'lik NaClO_2 ilavesinin, mayaların hücre lizatının çıkarılmasında daha etkili olduğu düşünülmüştür (Resim 4.2F).



Resim 4.2. Farklı miktarlarda NaClO_2 ile muamele edilen *P. kudriavzevii* M10 maya suşunun mikroskopik görüntüsü. (A: Besiyeri+biyomas+5mL NaClO_2 , B: Besiyeri+biyomas+10 mL NaClO_2 , C: Besiyeri+biyomas+15 mL NaClO_2 , D: Besiyeri+biyomas+20 mL NaClO_2 , E: Biyomas+5 mL NaClO_2 , F: Biyomas+10 mL NaClO_2 , G: Biyomas+15 mL NaClO_2 , H: Biyomas+ 20 mL NaClO_2)

Otoliz işleminin son basamağında örneklerin su banyosunda bekletilmesi gerekmektedir. Örnekler 20 dk ve 30 dk olmak üzere farklı iki sürede 80 °C'lik su banyosunda bekletilmiş ve kristal viyole ile boyanarak ışık mikroskopunda (100X) hücre yapılarındaki değişimler gözlenmiştir (Resim 4.3). 20 dk sıcak su banyosunda bekletilen biyomas örneklerinde hücre duvarının dayanıklılığının azaldığı (Resim 4.3A), 30 dk sıcak su banyosunda bekletmede ise hücre duvar yapısının tamamen bozulduğu gözlenmiştir (Resim 4.3B).



Resim 4.3. Sıcak su banyosunda bekletilen *P. kudriavzevii* M10 maya suşunun mikroskopik görüntüsü (A: 20 dk, B: 30 dk)

4.2.2. Sıcak su muamelesi

Yüksek saflıkta β -glukan elde etmek için M10 suşunun hücre duvarının mekanik dayanıklılığının azaltılması, hücre lizatının ve hücre duvarında yer alan mannoproteinlerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla sıcak su muamelesinde kullanılan sodyum-fosfat tamponunun miktarının, cam boncuk miktarının ve vorteks kullanımının hücre yapısı üzerine etkisi araştırılmıştır.

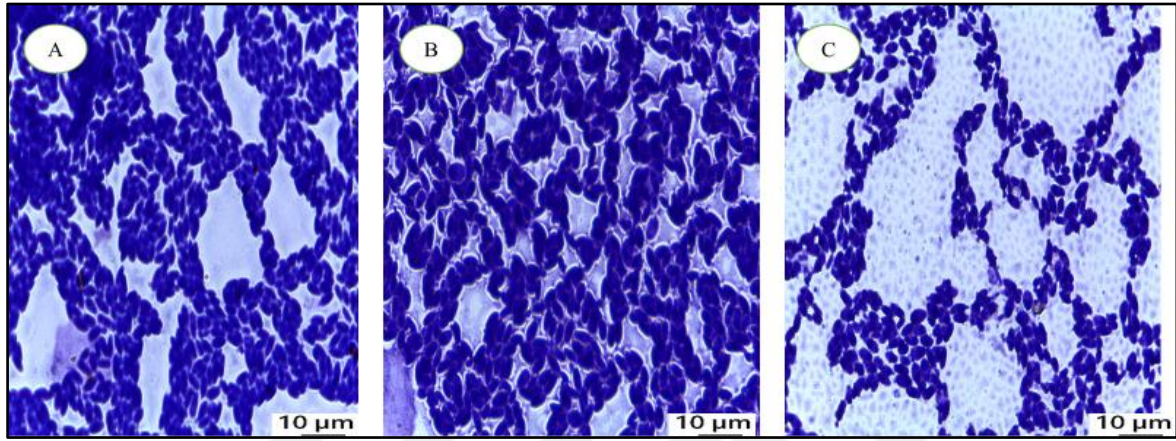
M10 biyomasından hücre lizatının ortamdaki uzaklaşma miktarı (g) belirlenerek tespit edilmiştir. Farklı miktarlarda sodyum-fosfat tamponu (5, 10, 15 ve 20 mL) ilave edilen hücrelerde, 20 mL tampon ilave edilen biyomastaki kuru madde miktarının diğer miktarlara göre daha az (0,24 g) olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Farklı miktarlarda sodyum fosfat ilave edilen pelletlerden elde edilen kuru madde miktarları (g)

Sodyum-Fosfat Tampon miktarı (mL)	Kuru Madde Miktarı (g)
5	0,27
10	0,27
15	0,25
20	0,24

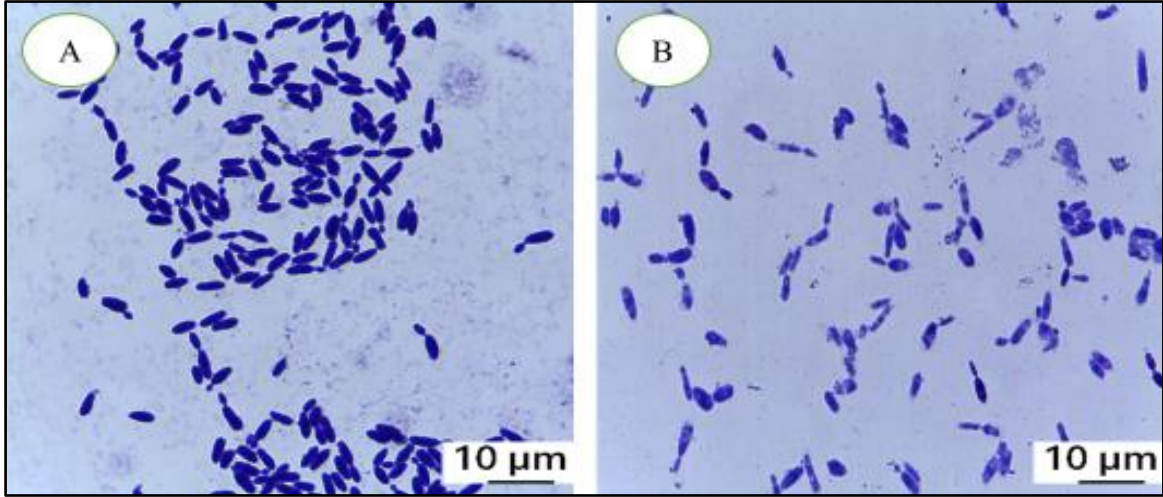
Başlangıçtaki pellet miktarı=0,28 g

Maya hücre duvarının mekanik parçalanmasında kullanılan cam boncukların sayısı ve kullanılan tampon miktarı da ekstraksiyon işleminde etkilidir. Belirlenen sodyum fosfat tamponu (20 mL) üzerine farklı miktarlarda cam boncuk (2, 4 ve 8 gram) ilave edilmiş (Resim 4.4) ve hücrelerin yapısı ışık mikroskopunda incelenmiştir (Resim 4.4). 8 g cam bonuk içeren 20 mL'lik sodyum fosfat tampon ilave edilen örneğin hücre duvarının diğer örneklere göre daha fazla zayıfladığı görülmüştür (Resim 4.4C).



Resim 4.4. Cam boncukla muamele edilen *P. kudriavzevii* M10 maya suşunun mikroskopik görüntüsü (A: 2 g, B: 4 g, C:8 g)

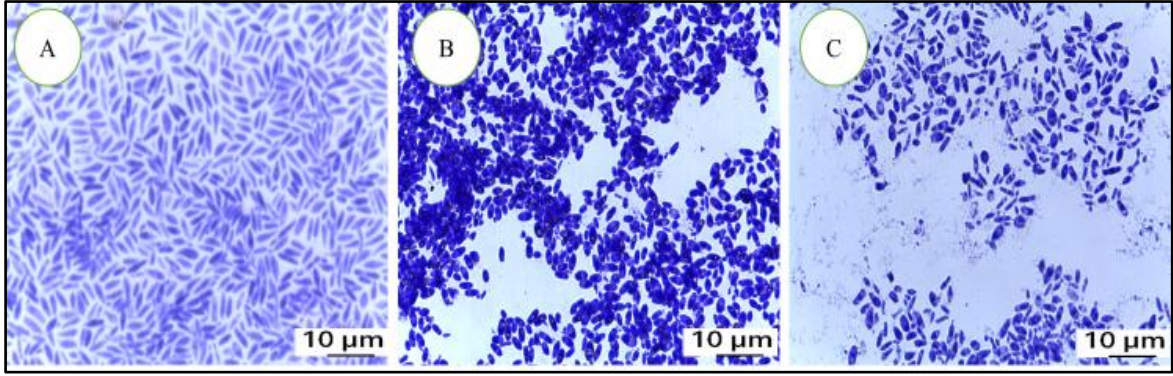
Maya hücre duvarının tam anlamıyla parçalanmasında vorteks kullanımının etkisinin olup olmadığı da belirlenmiştir. Bu amaçla, 20 mL sodyum fosfat tamponu içerisine 8 gram cam boncuk ilave edilmiş, örnekler otoklava girmeden önce ve sonra 5 dk vortekslenmiştir. Vortekslenen süspansiyonda hücre duvarının daha fazla zayıfladığı görülmüştür (Resim 4.5B).



Resim 4.5. Vorteks uygulanmayan (A) ve uygulanan (B) *P. kudriavzevii* M10 maya suşunun mikroskopik görüntüsü

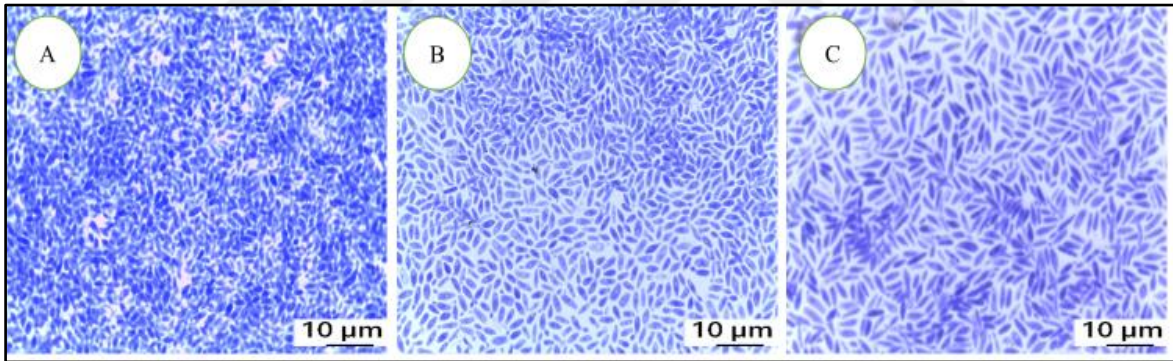
4.2.3. Sonikasyon

Maya hücrelerinin, hücre duvarı oldukça dirençli bir yapıya sahip olduğundan yalnızca otoliz etmek ve sıcak su muamelesi yapmak duvarı parçalamak için yeterli değildir. Bu sebeple hücreler sonike edilmiştir. Sonikasyon süresi, sonikasyonda kullanılan solüsyonlar ve solüsyon miktarları hücre duvarının yapısal direncinin azaltılmasında etkilidir. Bu aşamada hücre parçalanmasına sonikasyon solüsyonunun, miktarının ve süresinin etkisi belirlenmiştir. Üç farklı sonikasyon solüsyonu (ddH₂O, SF ve sodyum-sitrat) ile 5'er dk sonike edilen hücrelerde sonikasyon solüsyonundan kaynaklanan önemli bir fark görülmemiştir (Resim 4.6). Fakat SF ile sonike edilen hücreler tuzun varlığından kaynaklı kristalleşmiştir. Sodyum sitrat kullanılarak sonike edilen hücrelerde de parçalanma olmasına rağmen, ddH₂O kullanılarak sonike edilen hücrelerin mikroskopik görüntülerinde, hücre duvarının parçalanmasının daha fazla olduğu gözlenmiştir (Resim 4.6A).



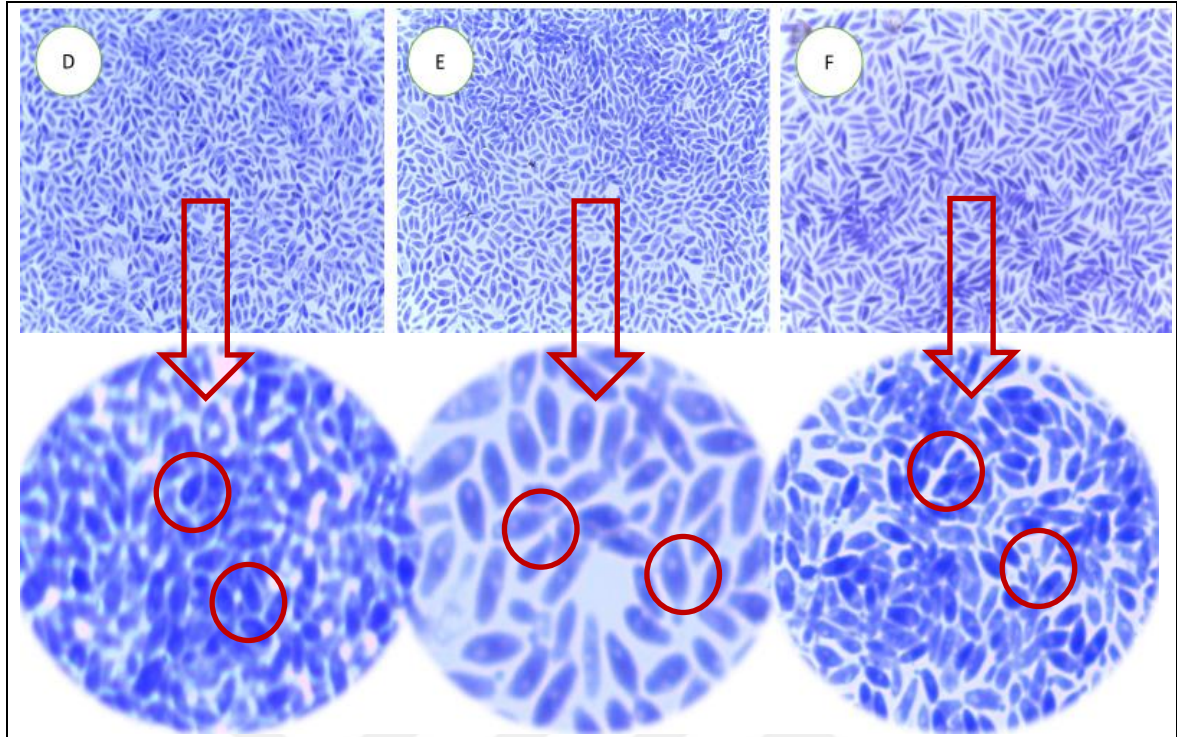
Resim 4.6. Farklı sonikasyon çözeltisi uygulanan *P. kudriavzevii* M10 maya suşunun mikroskopik görüntüsü (A: ddH₂O, B: SF, C: Sodyum-sitrat)

Uygun sonikasyon solüsyonunun belirlenmesinin ardından solüsyon miktarı (10, 20 ve 30 mL) ile yapılan denemeler sonucu en iyi hacimin 20 mL olduğu belirlenmiştir (Resim 4.7B). Sonikasyon sürelerinin hücre duvarına etkisinin belirlenebilmesi amacıyla ise 10 dk, 20 dk ve 30 dk olmak üzere 3 farklı sürede denemeler yapılmıştır. 20 dk'lık sonikasyonda diğer sürelerle göre hücre muhteviyatının daha fazla açığa çıktığı görülmüştür (Resim 4.8E).



Resim 4.7. Farklı miktarlarda sonike edilen *P. kudriavzevii* M10 maya suşunun mikroskopik görüntüsü (A: 10 mL, B: 20 mL, C: 30 mL)

Ayrıca çalışmada, belirlenen uygun solüsyon (ddH₂O) ve miktarlarda (20 mL), farklı sürelerde sonike edilen (10, 20 ve 30 dk) örneklerin toplam karbonhidrat ve protein miktarları tayin edilmiştir. En yüksek karbonhidrat miktarı (750,2 mg/L) ve en düşük protein miktarını (0,11 mg/mL) veren optimizasyon koşulun 20 dk sonike edilen hücrelerde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Sonuçlar, sonikasyondan sonra proteinlerin uzaklaştığını ve karbonhidrat içeriğinin arttığını göstermiştir.



Resim 4.8. Farklı sürelerde sonike edilen *P. kudriavzevii* M10 maya suşunun mikroskopik görüntüsü (D: 10 dk, E: 20 dk, F: 30 dk)

Çizelge 4.4. Farklı sürelerde yapılan sonikasyon sonrası *P. kudriavzevii* M10 maya suşunun toplam karbonhidrat ve toplam protein miktarı

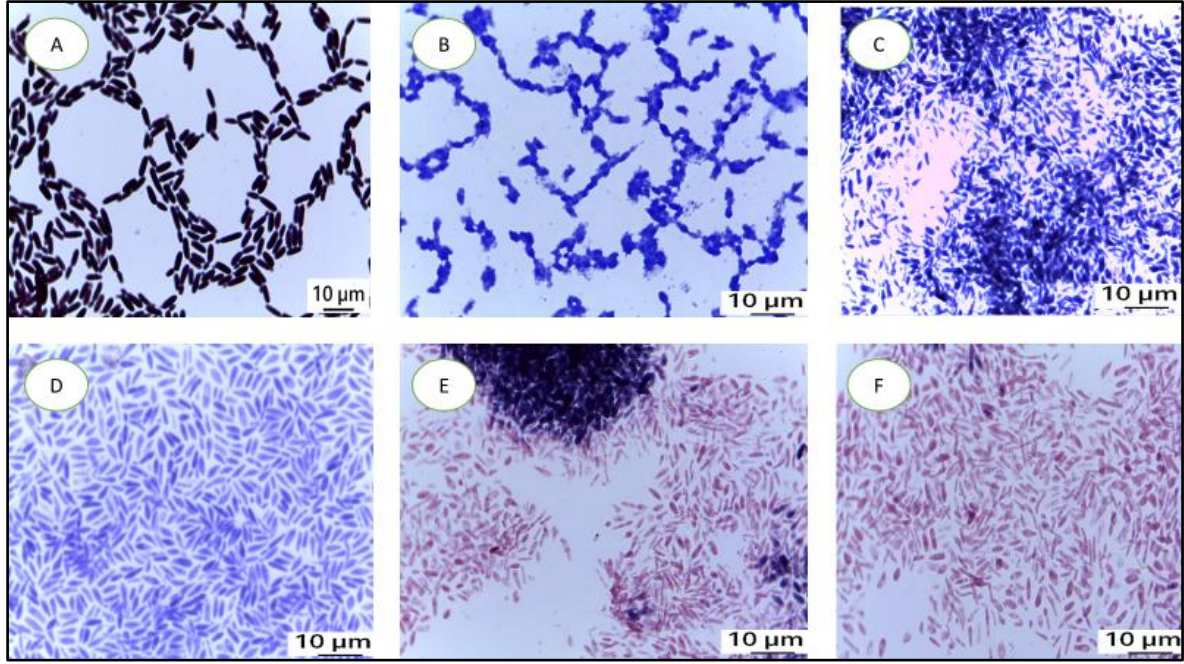
Sonikasyon süresi (dk)	Toplam karbonhidrat miktarı (mg/L)	Toplam protein miktarı (mg/mL)
10	700,2±0,00	0,12±0,00
20	750,2±0,00	0,11±0,00
30	730,3±0,00	0,11±0,00
Kontrol	312,0±0,00	0,63±0,00

4.2.4. Proteaz enzim uygulaması

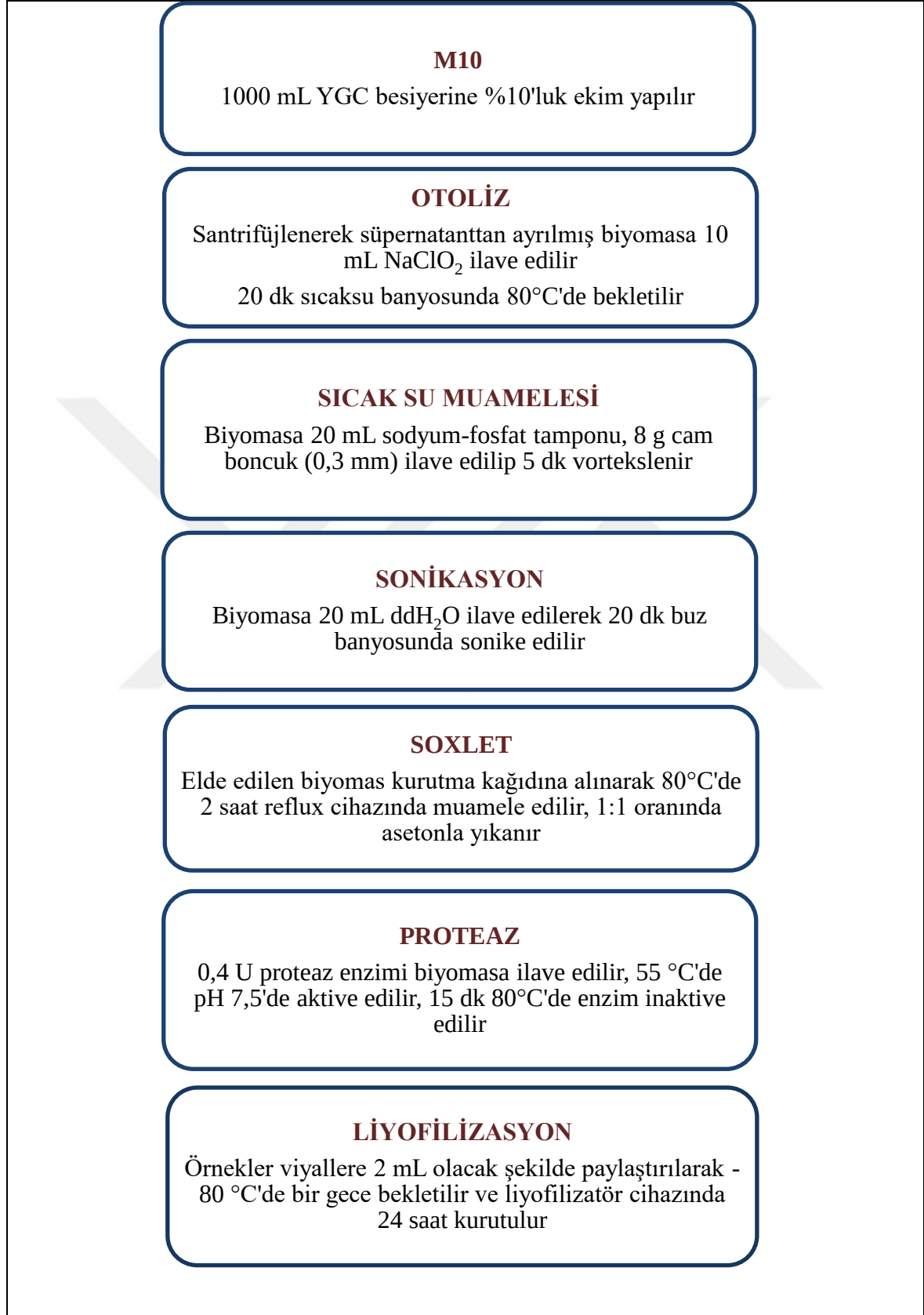
Lipit içeriği soxled ile uzaklaştırılan β -gluM13'ün saflaştırılması amacıyla, çözünmeyen mannan kalıntılarının ve proteinlerin hücre duvarından uzaklaştırılması gerekmektedir. Bunun için örneklere proteaz muamlesi yapılmıştır. Başlangıçta 0,136 mg/mL olan protein içeriği proteaz enziminin uygulanmasıyla 0,016 mg/mL'ye düşürülmüştür. Bu uygulama ile asit veya alkali gibi tahrip edici ekstraksiyon koşullarından kaçınılmıştır. Son olarak glukanlar liyofilize edilerek kurutulmuştur.

4.3. *Pichia kudriavzevii* Maya Suşlarının β -glukan Miktarı

β -glukan verimliliğini artırmaya yönelik yapılan denemeler sonucu en iyi ekstraksiyon koşullarının Çizelge 4.5 belirtildiği şekilde olduğu bulunmuştur. *P. kudriavzevii* M10 maya suşundaki glukan ekstraksiyonunun aşamalarının mikroskopik görüntüsü Resim 4.9.'da verilmiştir.

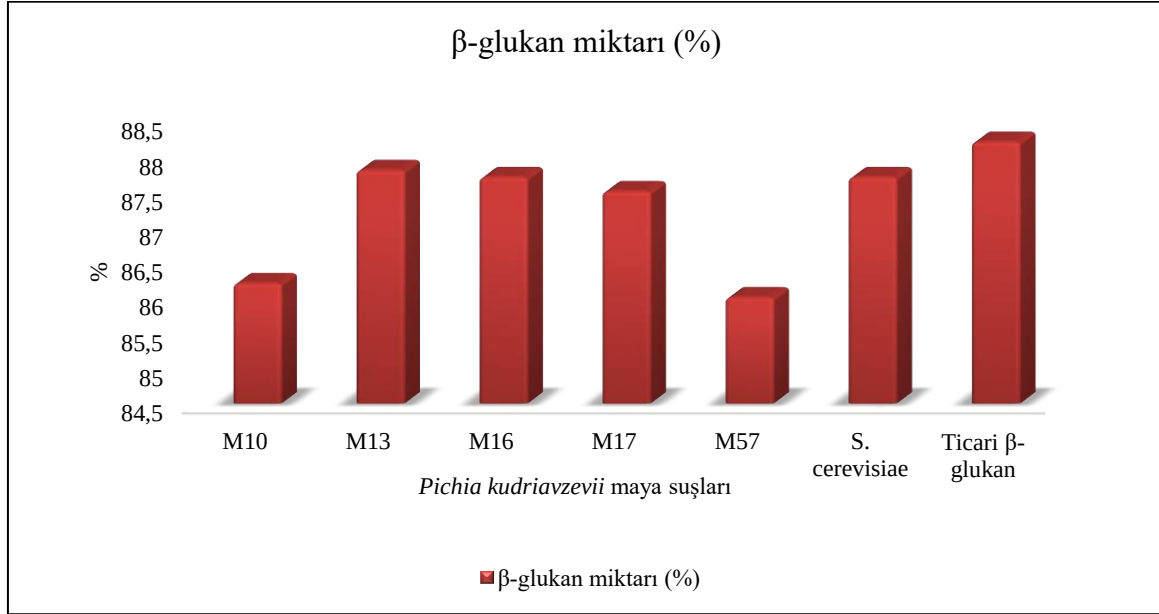


Resim 4.9. *P. kudriavzevii* M10 suşundaki glukan ekstraksiyonunun aşamalarının mikroskopik görüntüsü A: *P. kudriavzevii* M10, B: Otoliz, C: Sıcak su muamelesi, D: Sonikasyon, E: Soxled, F: Proteaz

Çizelge 4.5. β -glukan ekstraksiyonunun optimizasyonu sonucu elde edilen koşullar

+Her basamaktan sonra örnekler 3900 g'de 10 dk boyunca 2 kez santrifüjlenmiştir

β -glukan ekstraksiyonunun optimizasyonu sonucu elde edilen koşullar (Çizelge 4.5) tüm *P. kudriavzevii* maya suşlarına ve kontrol gruplarına uygulanarak, β glukan miktarı Megazym Enzymatic Kit ile ölçülmüştür (Şekil 4.1 ve Resim 4.10).



Şekil 4.1. *Pichia kudriavzevii* maya suşlarında β -glukan miktarları (%)



Resim 4.10. *Pichia kudriavzevii* maya suşlarında β -glukan örnekleri

β -glukan miktarı, en yüksek *P. kudriavzevii* M13 maya suşunda belirlenmiştir (%87,8). Kontrol olarak kullanılan *S. cerevisiae* BD1 de β -glukan miktarı %87,7 ve ticari β -glukan da ise %88,2 olarak tespit edilmiştir. *P. kudriavzevii* maya suşlarındaki β -glukan miktarlarının kontrol gruplarına benzer sonuçlar verdiği görülmüştür.

4.4. Optimum Koşulların Uygulandığı *P. kudriavzevii* M13 Maya Suşundan Elde Edilen β -glukan (β -gluM13)'ın Karbonhidrat, Lipit ve Protein Miktarı

β -glukan miktarı en yüksek *P. kudriavzevii* M13 (%87,8) maya suşunda belirlendiğinden, bundan sonraki çalışmalara bu suş ile devam edilmiştir. β -gluM13'ün her bir ekstraksiyon basamağındaki karbonhidrat, protein, lipit ve β -glukan içeriği Çizelge 4.6 da verilmiştir.

Çizelge 4.6. β -gluM13'ün karbonhidrat, lipit, protein ve β -glukan miktarı

Ekstraksiyon Basamakları	Karbonhidrat miktarı (mg/L)	Protein miktarı (mg/mL)	Lipit miktarı (%)	β -glukan miktarı (%)
M13	316 $\pm$ 0,00	0,612 $\pm$ 0,30	5,43 $\pm$ 0,00	12,31 $\pm$ 0,00
Otoliz	455 $\pm$ 0,00	0,151 $\pm$ 0,30	3,36 $\pm$ 0,00	28,08 $\pm$ 0,00
Sıcaksu muamelesi	447 $\pm$ 0,00	0,089 $\pm$ 0,10	3,85 $\pm$ 0,00	36,42 $\pm$ 0,00
Sonikasyon	750 $\pm$ 0,00	0,032 $\pm$ 0,20	2,08 $\pm$ 0,00	69,76 $\pm$ 0,00
Soxlet	737 $\pm$ 0,00	0,030 $\pm$ 0,60	1,94 $\pm$ 0,00	74,92 $\pm$ 0,00
Proteaz Uygulaması	800 $\pm$ 0,00	0,019 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,00	87,81 $\pm$ 0,00

Çalışmanın sonucunda karbonhidrat ve β -glukan miktarının yapılan her ekstraksiyon basamağında arttığı, lipit ve protein miktarlarının ise her ekstraksiyon basamağında daha fazla uzaklaştırıldığı bulunmuştur. Karbonhidrat içeriği başlangıçta 316 mg/L olarak bulunurken son basamakta karbonhidrat miktarı 800 mg/L; lipit miktarı başlangıçta %5,43, son basamakta %0,05; toplam protein içeriği ise ilk basamakta 0,612 mg/mL bulunurken, proteaz enziminin uygulanmasının ardından 0,019 mg/mL olarak bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda karbonhidrat miktarı ile β -glukan miktarı arasındaki farklılığın anlamlı ($p<0,01$) ve karbonhidrat miktarı ile β -glukan miktarı arasında pozitif yönde çok güçlü bir ilişki ($r=0,988$) olduğu tespit edilmiştir.

Ayrıca, karbonhidrat miktarı artarken, protein miktarı azalmıştır. Aralarında negatif yönde güçlü bir ilişki ($r=-0,784$) ve karbonhidrat miktarı ile lipit miktarı arasındaki farklılığın anlamlı olduğu ($p<0,01$), ilişkinin negatif yönde ve çok güçlü ($r=-0,942$) olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre, her bir ekstraksiyon basamağı sayesinde başlangıçta yüksek miktarda bulunan mannoproteinlerin ve lipitlerin hücre duvarından uzaklaştırıldığı görülmüştür.

4.5. β -gluM13'ün Prebiyotik Etkileri

4.5.1. β -gluM13'ün *Ligilactobacillus plantarum* GD2 tarafından fermente edilebilme kapasitesi

L. plantarum GD2 suşu, β -gluM13'ün fermente edilebilme kapasitesinin belirlenmesi amacıyla test bakterisi olarak kullanılmıştır. Probiyotik *L. plantarum* GD2'nin, glukozsuz MRS (karbon kaynağı içermeyen-C-MRS) besiyerinde, kontrol besi yerine (MRS) göre canlılığı azalmıştır. *L. plantarum* GD2 suşunun, glukoz çıkarılıp, yerine aynı oranda (%2) β -gluM13'ün eklendiği MRS besi ortamındaki (C-MRS+ β -gluM13) ($7,2 \log \text{ kob/mL}$) canlılığı, kontrol besi ortamındaki ($6,9 \log \text{ kob/mL}$) canlılığından daha fazla bulunmuştur. Böylece *L. plantarum* GD2, β -gluM13'ü glukoz gibi fermente ederek gelişme göstermiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. *L. plantarum* GD2 suşunun farklı besi ortamlarındaki canlı hücre sayısı

	Besi Ortamı	Canlı Hücre Sayısı ($\log \text{ kob/mL}$)
<i>L. plantarum</i> GD2	MRS ^a	$6,9 \pm 0,1$
	C-MRS ^b	$5,7 \pm 0,1$
	C-MRS+ β -gluM13	$7,2 \pm 0,1$

a: Kontrol besi yeri (pozitif kontrol)

b: Glukozsuz MRS besi yeri (negatif kontrol)

4.5.2. β -gluM13'ün *Bifidobacterium bifidum* A12 tarafından fermente edilebilme kapasitesi

Bu çalışmada *B. bifidum* A12 bakterisi kullanılmıştır. Bu suşun *P. kudriavzevii* M13 maya suşundan elde edilen β -glukanı (β -gluM13) fermente edebilme kapasitesi araştırılmıştır.

Probiyotik *B. bifidum* A12'nin, glukozsuz ve nişastasız BSM (karbon kaynağı içermeyen-C-BSM) besiyerinde, kontrol besi yerine (BSM) göre canlılığı azalmıştır. *B. bifidum* A12 suşunun, glukoz ve nişasta çıkarılıp yerine aynı oranda (%2) β -gluM13'ün eklendiği BSM besi ortamındaki (C-BSM+ β -gluM13) canlılığı (8,0 log kob/mL), kontrol besi ortamındaki (6,5 log kob/mL) canlılığından daha fazla bulunmuştur. Böylece *B. bifidum* A12, β -gluM13'ü glukoz ve nişasta gibi fermente ederek gelişme göstermiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. *B. bifidum* A12 suşunun farklı besi ortamlarındaki canlı hücre sayısı

	Besiyeri İçeriği	Canlılık Sayısı (log kob/mL)
	BSM ^a	6,5±0,2
<i>B. bifidum</i> A12	C-BSM ^b	3,5±0,1
	C-BSM+ β -gluM13	8,0±0,1

a: Kontrol besi yeri (pozitif kontrol)

b: Glukoz ve nişastasız BSM besi yeri (negatif kontrol)

4.5.3. β -gluM13'ün *Saccharomyces cerevisiae* BD1 tarafından fermente edilebilme kapasitesi

Bu çalışmada *S. cerevisiae* BD1 mayası kullanılmıştır. Bu suşun *P. kudriavzevii* M13 maya suşundan elde edilen β -glukanı (β -gluM13) fermente edebilme kapasitesi araştırılmıştır. Probiyotik *S. cerevisiae* BD1'in, glukozsuz YPD (karbon kaynağı içermeyen-C-YPD) besiyerinde, kontrol besi yerine (YPD) göre canlılığı azalmıştır. *S. cerevisiae* BD1 suşunun, glukozu çıkarılıp yerine aynı oranda (%2) β -gluM13'ün eklendiği YPD besi ortamındaki (C-YPD+ β -gluM13) canlılığı (7,3 log kob/mL), kontrol besi ortamındaki (6,5 log kob/mL) canlılığından daha fazla bulunmuştur. Böylece *S. cerevisiae* BD1, β -gluM13'ü glukoz gibi fermente ederek gelişme göstermiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. *S. cerevisiae* BD1 suşunun farklı besi ortamlarındaki canlı hücre sayısı

	Besiyeri İçeriği	Canlılık Sayısı (log kob/mL)
<i>S. cerevisiae</i> BD1	YPD ^a	6,5±0,1
	C-YPD ^b	5,6±0,1
	C-YPD+β-gluM13	7,3±0,1

a: Kontrol besi yeri (pozitif kontrol)

b: Glukozsuz YPD besi yeri (negatif kontrol)

4.5.4. β-gluM13'ün Laktobasil Gelişimini Düzenleyici (LGD) Etkisinin Belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 5 ve 10 mg/mL) β-gluM13 ilave edilmiş glukozsuz MRS besiyerlerinde *L. plantarum* GD2'in gelişimi belirlenerek, ticari prebiyotik olan inülin ile karşılaştırılmıştır. Artan konsantrasyonlarda β-gluM13, *L. plantarum* GD2'in gelişimini kontrol besi ortamına (MRS) (6,9±0,1 log kob/mL) göre önemli ölçüde arttırmıştır. *L. plantarum* GD2 en yüksek LGD etkisini 10 mg/mL β-gluM13 (9,4±0,1 log kob/mL) ilave edilmiş besi yerinde göstermiştir. *P. kudriavzevii* maya suşundan elde edilen β-glukanın (β-gluM13) ticari olarak kullanılan bitkisel kaynaklı inülin prebiyotiğinden daha yüksek LGD etkisine (8,3±0,1 log kob/mL) sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. *L. plantarum* GD2 suşunun farklı konsantrasyonlarda β-gluM13 içeren besi ortamlarındaki canlı hücre sayısı

	<i>L. plantarum</i> GD2 (log kob/mL)
MRS ^a	6,9±0,1
C-MRS ^b	5,7±0,1
β-gluM13 (mg/mL) *	
0,5	7,2±0,1
1	7,3±0,2
5	8,3±0,1
10	9,4±0,1
Inülin (mg/mL)	
0,5	6,5±0,1
1	7,2±0,3
5	7,3±0,1
10	8,3±0,1

a: Kontrol besi yeri (pozitif kontrol)

b: Glukozsuz MRS besi yeri (negatif kontrol)

* $p < 0,01$ düzeyinde konsantrasyon artışı ile β-glukan miktarı arasında anlamlı korelasyon

4.5.5. β -gluM13'ün Bifido Gelişimini Düzenleyici (BGD) Etkisinin Belirlenmesi

BSM besi ortamına glukoz ve nişasta yerine, farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 5 ve 10 mg/mL) β -gluM13 ilave edilmiştir. Bu besiyerlerinde *B. bifidum* A12'nin gelişimi belirlenerek, ticari prebiyotik inülin ile karşılaştırılmıştır. Artan konsantrasyonlarda β -gluM13 *B. bifidum* A12'nin gelişimini kontrol besi ortamına (BSM) ($6,5 \pm 0,1$ log kob/mL) göre önemli ölçüde arttırmıştır. *B. bifidum* A12, en yüksek BGD etkisini 5 mg/mL β -gluM13 ilave edilmiş ($9,4 \pm 0,1$ log kob/mL) besi yerinde göstermiştir. *P. kudriavzevii* maya suşundan elde edilen β -glukanın (β -gluM13) ticari olarak kullanılan bitkisel kaynaklı inülin prebiyotiğinden daha yüksek ($7,9 \pm 0,4$ log kob/mL) BGD etkisine sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. *B. bifidum* A12 suşunun farklı konsantrasyonlarda β -gluM13 içeren besi ortamlarındaki canlı hücre sayısı

<i>B. bifidum</i> (log kob/mL)	
BSM ^a	$6,5 \pm 0,1$
C-BSM ^b	$3,5 \pm 0,2$
β -glukan (mg/mL)	
0,5	$8,3 \pm 0,1$
1	$8,8 \pm 0,1$
5	$9,4 \pm 0,2$
10	$9,3 \pm 0,3$
İnülin (mg/mL)	
0,5	$6,6 \pm 0,1$
1	$7,8 \pm 0,3$
5	$7,9 \pm 0,4$
10	$8,0 \pm 0,4$

a: Kontrol besi yeri (pozitif kontrol)

b: Nişastasız ve glukozsuz BSM besi yeri (negatif kontrol)

4.5.6. β -gluM13'ün Maya Gelişimini Düzenleyici (MGD) Etkisinin Belirlenmesi

YPD besi ortamına glukoz yerine, farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 5 ve 10 mg/mL) β -gluM13 ilave edilmiştir. Bu besiyerlerinde *S. cerevisiae* BD1'in gelişimi belirlenerek, ticari prebiyotik inülin ile karşılaştırılmıştır. Artan konsantrasyonlarda β -gluM13, *S. cerevisiae* BD1'nin gelişimini kontrol besi ortamına (YPD) ($6,5 \pm 0,1$ log kob/mL) göre önemli ölçüde arttırmıştır. *S. cerevisiae* BD1 en yüksek MGD etkisini 10 mg/mL β -gluM13 ilave edilmiş ($9,4 \pm 0,3$ log kob/mL) besi yerinde göstermiştir. *P. kudriavzevii* maya suşundan elde edilen β -glukanın (β -gluM13) ticari olarak kullanılan bitkisel kaynaklı inülin prebiyotiğinden daha yüksek ($8,5 \pm 0,5$ log kob/mL) MGD etkisine sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. *S. cerevisiae* BD1 suşunun farklı konsantrasyonlarda β -gluM13 içeren besi ortamlarındaki canlı hücre sayısı

<i>S. cerevisiae</i> BD1 (log kob/mL)	
YPD ^a	$6,5 \pm 0,1$
C-YPD ^b	$5,6 \pm 0,1$
β -glukan (mg/mL)	
0,5	$7,5 \pm 0,1$
1	$8,3 \pm 0,1$
5	$9,2 \pm 0,1$
10	$9,4 \pm 0,3$
İnülin (mg/mL)	
0,5	$6,6 \pm 0,1$
1	$7,8 \pm 0,0$
5	$8,4 \pm 0,4$
10	$8,5 \pm 0,5$

a: Kontrol besi yeri (pozitif kontrol)

b: Glukozsuz YPD besi yeri (negatif kontrol)

4.5.7. 1,1-difenil-2-pikrilhidraz (DPPH) radikalini giderme etkisi

Farklı konsantrasyonlardaki (0,2-50 mg/mL) β -gluM13'ün antioksidan aktivitesi DPPH ile belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.13 ve Resim 4.11'de verilmiştir. En yüksek radikal süpürücü aktivitenin 5 mg/mL β -gluM13 konsantrasyonunda (%57), en düşük aktivitenin ise 0,2 mg/mL'de (%43) olduğunu tespit edilmiştir.

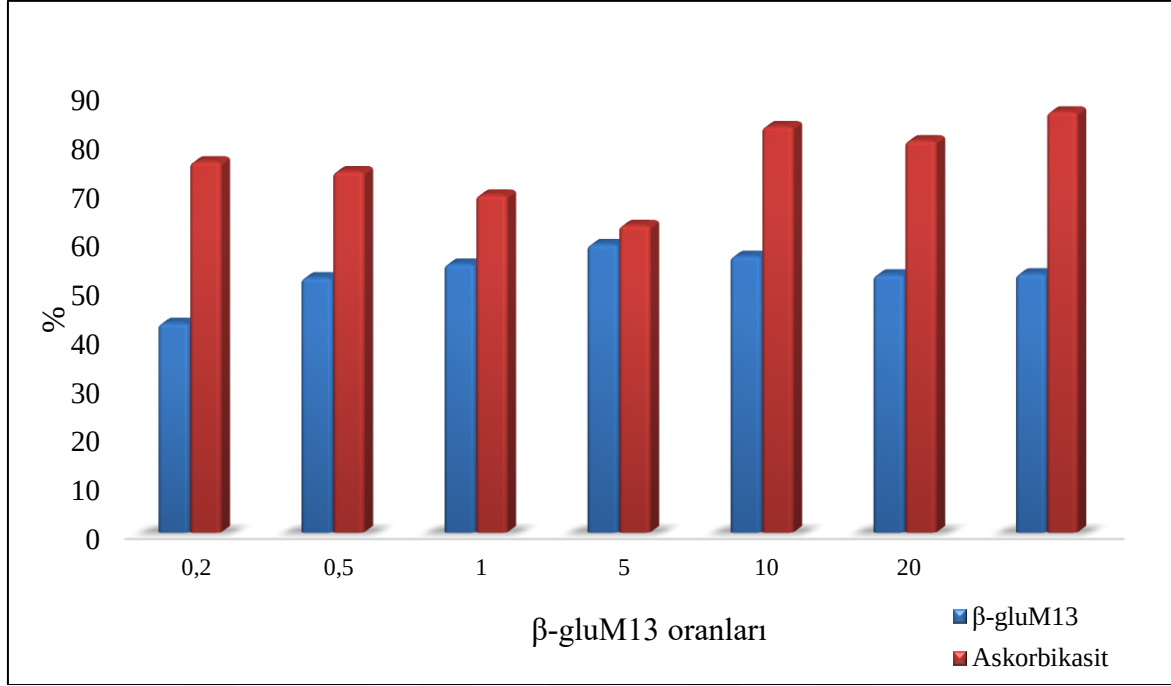
Yapılan istatistiksel analizler sonucunda konsantrasyon artışı ile DPPH radikalini giderme etkisi arasındaki farklılığın anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Sonuçlar pozitif kontrol olan askorbik asit ile karşılaştırılmış ve elde edilen bulgular Şekil 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.13. β -gluM13'ün 1,1-difenil-2-pikrilhidraz (DPPH) radikalini giderme etkisinin askorbik asitle karşılaştırılması

β -gluM13 (mg/mL)	DPPH radikalini giderme etkisi (%)	Askorbik asit (C Vit) mg/mL	DPPH radikalini giderme etkisi (%)
0,2	43,0 $\pm$ 0,7	0,2	76,0 $\pm$ 0,6
0,5	52,9 $\pm$ 0,8	0,5	74,0 $\pm$ 0,7
1	55,1 $\pm$ 0,4	1	69,2 $\pm$ 0,6
5	59,1 $\pm$ 0,6	5	63,0 $\pm$ 0,7
10	56,7 $\pm$ 0,6	10	83,2 $\pm$ 0,5
20	52,9 $\pm$ 0,6	20	80,3 $\pm$ 0,5
50	53,1 $\pm$ 0,4	50	86,2 $\pm$ 0,6



Resim 4.11. β -gluM13'ün 1,1-difenil-2-pikrilhidraz (DPPH) radikalini giderme etkisi



Şekil 4.2. β-gluM13'ün 1,1-difenil-2-pikrilhidraz (DPPH) radikalini giderme etkisinin askorbikasıit ile kıyaslanması

4.6. β-gluM13'ün Gastrointestinal Sistemde Dayanıklılığı

Farklı konsantrasyonlarda (0,5-10 mg/mL) β-gluM13'ün yapay mide ve yapay bağırsak sıvısındaki hidroliz olma durumları belirlenmiştir (Çizelge 4.14). Yapay mide sıvısında β-gluM13'ün hidrolizi %0,91-1,17 ve yapay bağırsak sıvısında β-gluM13'ün hidrolizinin ise %1,04-1,16 arasında değiştiği tespit edilmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda (0,5-10 mg/mL) β-gluM13'ün pH 2 ve pH 3 yapay mide sıvısında farklı sürelerdeki (90 ve 180 dk) hidroliz yüzdeleri değerlendirildiğinde; pH değerleri ve kullanılan farklı konsantrasyonlar arasında süreye bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$).

Farklı konsantrasyonlarda (0,5-10 mg/mL) β-gluM13'ün %0,3 ve %0,5 farklı safra koşullarında 240 dk yapay bağırsak sıvısında hidroliz yüzdeleri değerlendirildiğinde; kullanılan farklı konsantrasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$).

Çizelge 4.14. Farklı konsantrasyonlarda β -gluM13'ün yapay mide ve yapay bağırsak sıvısındaki hidroliz yüzdeleri

β - gluM13 (mg/mL)	Yapay mide sıvısı				Yapay bağırsak sıvısı	
	90 dk (%)		180 dk (%)		240 dk (%)	
	pH 2	pH 3	pH 2	pH 3	%0,3	%0,5
0,5	1,08±0,01	1,02±0,01	1,09±0,01	1,05±0,01	1,04±0,01	1,06±0,01
1	1,11±0,03	0,91±0,03	1,13±0,01	1,05±0,03	1,08±0,07	1,09±0,07
5	1,09±0,06	1,05±0,09	1,14±0,01	1,13±0,07	1,06±0,04	1,07±0,01
10	1,10±0,01	1,02±0,01	1,07±0,01	1,06±0,01	1,10±0,01	1,16±0,02

5. TARTIŞMA

S. cerevisiae mayası, onlarca yıldır yoğun bir araştırma konusu olmasına rağmen, hücre duvarının yapısı ancak ikibinli yıllarda ayrıntılı olarak aydınlatılmıştır. İlk çalışmalar, esas olarak hücre duvarı bileşenlerinin ve bunların kimyasal yapılarının nicel olarak belirlenmesi için kullanılan yöntemlerdir. Daha sonra yapılan çalışmalarda maya hücre duvarının olası bileşenlerinin kimyasal yapısı ve ara bağlantıları açıklanmıştır (Arvindekar ve Patil, 2002; Magnelli, Cipollo ve Abeijon, 2002). Bu bilgiler dahilinde maya hücre duvarının yapısında; kitin, glikojen, lipitler, mannoprotein, polimannoz, diğer proteinler, β -1,3-glukan ve β -1,6-glukan gibi ana bileşenler olduğu bildirilmiştir. Bu yapılar büyük ölçüde birbirlerine kovalent bağ ile bağlıdır. Bu bileşenlerin hücrede bulunma oranları, mayanın büyümesi ve gelişimi sırasındaki koşullara göre farklılık gösterebilmektedir. Hücre duvarı yapısında bulunan bileşenlerin yüksek miktarda ve saflıkta elde edilmesi zordur. Hücre duvarı bileşenlerinin biyoteknolojik olarak kullanılabilmesi için, bileşenlerin ekstraksiyonunun düşük maliyette ve kolay elde edilebilir olması gerekmektedir (Li ve diğerleri, 2021).

Mayaların hücre duvar yapısında yer alan ve plazma membranının yaklaşık %50-55 kuru ağırlığını oluşturan β -glukanlar, biyolojik aktiviteleri nedeniyle, gıda maddelerinde prebiyotik olarak kullanılmaktadır (Laroche ve Michaud, 2007). β -glukanların sahip oldukları önemli biyolojik aktivitelerinden dolayı, bu tez çalışmasında *Pichia kudriavzevii* M13 maya suşundan ekstraksiyonu optimize edilen β -glukanın, prebiyotik özelliklerinin ve gastrointestinal sistemde dayanıklılığının belirlenmesi hedeflenmiştir.

Maya hücre duvarı yapısında bulunan ve biyoteknolojinin pek çok alanında kullanım potansiyeline sahip β -glukanların ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri, molekülün yapısal, fonksiyonel özelliklerini ve saflığını önemli ölçüde etkilemektedir. Bu nedenle tez çalışmasında, maya hücre duvarlarından β -glukan'ın yüksek verimde elde edilmesi için her bir ekstraksiyon basamağında optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Optimizasyon koşullarının belirlenmesinde beş farklı *P. kudriavzevii* maya suşundan iyi gelişme yeteneğine sahip olan M10 suşu ($6,5 \pm 0,1$ log kob/mL) kullanılmıştır.

β -glukan verimini etkileyen en önemli faktörlerden biri olan mikroorganizmanın gelişimini arttırmaya yönelik farklı denemeler yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda başlangıçta kullanılan mikroorganizma miktarları belirtilmediğinden tez çalışmasında, en iyi biyomasın elde edileceği inokülasyon miktarı tespit edilmiştir. Bu amaçla besiyerine farklı inokülasyon miktarları (%5, 10, 20 ve 40) denenmiş, yapılan ekim sonucunda mayadaki biyomas, karbonhidrat ve protein miktarındaki değişim belirlenmiştir. İnokülasyon miktarı ile biyomas arasında herhangi bir korelasyon olmadığı ancak biyomas miktarı ile karbonhidrat miktarı ($r=0,934$) ve karbonhidrat miktarı ile protein miktarı arasında ($r=-0,775$) güçlü bir ilişki olduğu bulunmuştur. İnokülasyon miktarı ile biyomas arasında anlamlı bir ilişki olmadığından çalışmada en fazla biyomasın (2,48 g) ve karbonhidrat miktarının (312 mg/L) elde edildiği %10'luk inokülasyon oranı kullanılmıştır.

Mayalardan β -glukan ekstraksiyonunda kullanılan birçok farklı metot bulunmaktadır (Liu ve diğerleri, 2008; Magnani ve diğerleri, 2009; Freimund ve diğerleri, 2003; Jaehrig ve diğerleri, 2008). Kullanılan ekstraksiyon metotları, β -glukanın saflığını ve verimini de etkilemektedir (Bzducha-Wróbel ve diğerleri, 2014). Hunter ve diğerleri (2002), *S. cerevisiae*'nin hücre duvarından β -glukanları ekstrakte etmek için bir asit-alkalin yöntemi kullanırken, Mueller ve diğerleri (1994), asit-alkalin yönteminin bazı dezavantajları olduğunu, ortamda bulunan asitin β -glukanın yapısının bozulmasına ve süpernatanta dağılmasına neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu durumun hücre duvarlarındaki başlangıç içeriğine göre daha düşük β -glukan verimine yol açtığını ve bununla β -glukan'ın biyolojik işlevini önemli ölçüde etkilediğini rapor etmişlerdir. Mayalarda, glukan ekstraksiyonu ile ilgili problemlerin, hücre duvarının karmaşıklığı ve ekstraktlarda istenmeyen bileşenlerin varlığı ile ilgili olduğu belirtilmektedir (Laroche ve Michaud, 2007). Bu nedenlerden dolayı tez çalışmasında, ekstraksiyon basamaklarına farklı işlemler uygulanarak β -gluM10 suşunda optimize koşullar belirlenmiştir.

Ökaryotik organizma olan mayaların hücre duvarının parçalanması zordur. Aynı zamanda hücre duvarı bileşenleri kovalent bağlarla bağlandığından birbirlerinden ayırmak maliyetli ve zaman alıcıdır. Öncelikle maya hücre duvarının kimyasal ve fiziksel yöntemler ile zayıflatılması, daha sonra da enzimatik yöntem ile hücre bileşenlerinin birbirinden ayrılması gerekmektedir (Liu ve diğerleri, 2021).

Ekstraksiyon işleminin ilk basamağı otolizdir. Otolizde, birçok farklı işlem kullanılmaktadır. Kullanılan yöntemler hücre duvarının parçalanmasını veya zayıflatılmasını sağlayan metotlar içermektedir. β -glukanın ekstraksiyonunda sıcaklığı artırılmış bir şekilde uygulanan sodyum veya potasyum hidroksitin maya hücre duvarlarından proteinleri ve alkali çözünür polisakkaritleri uzaklaştırmada çok etkili olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca, lipitler bazik koşullar altında gliserin ve lipit asitlerine hidrolize edilebilmektedir. Böylece, ilk bildirilen glukan izolasyon yöntemlerinden (Bzducha-Wróbel ve diğerleri, 2014) son yıllara kadar, çok sayıda makale ve patentte, maya hücre duvarlarının 0,75–1,0 M'lık NaOH veya KOH konsantrasyonlarında 60–100 °C sıcaklıklara dayandığı bildirilmektedir (Freimund, Sauter, Kappeli ve Dutler, 2003). Ekstraksiyonda, çözünmeyen kalıntı, genellikle glukan, proteinler ve polisakkaritler arasındaki bağların ayrılmasına ve karışımın nötrleştirilmesine yardımcı olan asitlerle yıkanır. Ardından, organik çözücüler kullanılarak bir lipit giderme gerçekleştirilir. Bununla birlikte uygulanan hem sıcak alkali hem de asitler glukan zincirleri üzerinde aynı etkiye sahiptir. Asit kullanımı ile elde edilen sonuçlar, hücre duvarlarındaki orijinal içeriğe kıyasla az çok belirgin bir glukan kaybının olduğunu göstermektedir (Freimund, Sauter, Kappeli ve Dutler, 2003). Freimund ve diğerleri (2009) otoliz ile elde edilen maya hücre duvarı preparasyonlarının toplam şeker ve protein içeriklerinde önemli ölçüde farklılık olduğunu göstermişlerdir. Bu tez çalışmasında, hücre duvarının zayıflatılarak lipitlerin uzaklaştırılmasına yardımcı olmak amacıyla; otoliz basamağında biyomas ve besiyeri+biyomas örneklerine farklı miktarlarda NaClO₂ (5, 10, 15, 20 mL) uygulanmıştır. Uygulamalar sonucunda en iyi sonuç 2,48 g pelletin üzerine 10 mL NaClO₂ ilave edilen örnekten alınmıştır. Diğer uygulamalarda hücre duvarının ya hiç otoliz olmadığı ya da fazla yoğun otoliz koşullarından deformasyona uğradığı görülmüştür. Hücre duvarının zayıflatılarak hücre lizatının çıkarılması otoliz basamağının son aşaması olan sıcak su banyosuyla olmaktadır. Sıcak suda 20 dk bekletilen örneklerin yapısal bozunma olmadan lizatın uzaklaştırıldığı görülmüştür.

Maya hücre duvar yapısında yer alan mannoproteinlerin β -glukandan ayrıştırılması ekstraksiyonun en zor aşamalarından birini oluşturmaktadır. Sodyum-fosfat tamponu, cam küreler ve yüksek basınçlı otoklav uygulaması, moleküller arasındaki bağların zayıflamasına dolayısıyla proteinlerin, özellikle mannoproteinlerin uzaklaştırılmasına katkı sağlamaktadır (Liu ve diğerleri, 2008). *Basidiomycetes aphylophorales* mantarlarında güçlü bir alkali koşul altında ekstraksiyon yapılması hücre duvarının parçalanmasını kolaylaştırmıştır (Laroche ve Michaud, 2007). Laroche ve Michaud (2008)'un yapmış olduğu bir başka

çalışmada mannoprotein, püstülen ve suda çözünür proteinleri uzaklaştırmak için sıcak su ekstraksiyonu kullanılmıştır. Bu araştırmacılar hücre duvarını parçalamada, ekstraksiyon ve fraksiyonlama işlemlerinde sıcak su uygulamasının hücre duvarlarındaki hidrojen bağının zayıflamasına veya tahrip olmasına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Maya hücre duvarında yer alan mannoproteinlerden kurtulmak ve yüksek saflıkta β -glukanlar elde etmek için hücre duvarının mekanik dayanıklılığının daha fazla azaltılması gerekmektedir. Tez çalışmasında, otoliz basamağında zayıflatılan hücre duvarından mannoproteinlerin uzaklaştırılması için, biyomasa uygulanan sodyum-fosfat tamponu miktarında, cam boncuk miktarında ve vorteksleme işlemlerinde optimizasyonlar yapılmıştır. Otoliz basamağından sonra kuru madde miktarı 0,28 g olan biyomasa 20 mL sodyum fosfat tamponu ilave edilip 121 °C dört saatlik otoklavlanma yapılmış ve kuru madde miktarının 0,28g dan 0,24 g'a düştüğü görülmüştür. Bu da bize hücre lizatının süpernatanta salındığını göstermiştir. Freimund ve diğerleri (2003) hücre duvarının yapısının bozulmadan hücre lizatının çıkarılmasını kuru madde miktarındaki azalma ile açıklamışlardır. Yapmış oldukları çalışmada, *S. cerevisiae* hücre duvarına uygulanan sıcak su ekstraksiyonu ile mannoprotein daha sonra düşük protein ve mannoz içeriğinin uzaklaştırılması ile hücre kuru ağırlığının yaklaşık üçte birlik bir kayba uğradığını bildirmişlerdir. Toplam proteinlerin yaklaşık %80'i ve mannoprotein %60'ı başlangıç materyalinden çıkarılırken, lipidlerin önemli bir kısmının (%26) tükendiğini (bu muhtemelen lipid fraksiyonundaki fosfolipitler veya hidrolize gliseridler gibi suda çözünür bileşenlerden kaynaklanmaktadır) rapor etmişlerdir (Freimund ve diğerleri, 2003). Yaptığımız sodyum-fosfat tamponundaki optimizasyonlar sonucu belirlenen ağırlık kaybının bu çalışmayla uyumlu olduğu görülmektedir. Otoklav işleminden sonra ışık mikroskopuyla yapılan incelemeler sonucu 8 g cam boncuk ilave edilip vortekslenen hücrelerin muhtemelen duvarda bulunan kovalent bağların kırılmasıyla hücre önce hacimsel bir artış göstermiş ve ardından hücre lizatının süpernatanta salınması sağlanmıştır.

Maya hücre duvarının kalınlığı ve sertliği nedeniyle otoliz ve sıcak su muamelesi, duvarı parçalamak için yeterli değildir. Hücre duvarının kalınlığı ve sertliği nedeniyle sonikasyon işleminin de yapılması gerekmektedir. Sonikasyon, hızlı ve ucuz olmasının yanı sıra sonikasyon, çevreye potansiyel olarak zararlı kimyasallara olan ihtiyacı da ortadan kaldırmak gibi avantajları bulunmaktadır (Magnani ve diğerleri, 2009). Hücre duvarının yapısı, dış basınca karşı direnç kazandıran ve mekanik destek sağlayan mannoproteinlerin

tamamen uzaklaştırılmasından sonra değişmektedir. Mannoproteinlerin çıkarılmasından sonra, β -glukan şişer, duvarın yapısal dayanıklılığı değiştirir, bu da hücre duvarının mekanik mukavemetinde bir azalmaya yol açar (Thanardkit, Khunrae, Supphantharika ve Verduyn, 2002; Bzducha-Wróbel ve diğerleri, 2014). Bu nedenle, sıcak su ile yapılan işlemin sonunda hücre duvarı kırılmaya karşı daha hassastır. Maya hücre duvarı preparasyonlarındaki tek tek bileşenlerin içeriği, sonike etme yöntemine, bu işlemin koşullarına (sıcaklık, sonikasyon süresi, ortam türü ve hücre konsantrasyonu) bağlı olarak farklılık gösterir. Ayrıca analiz edilen maya türünün biyokütlesinin ve hücre duvarının kimyasal bileşimi ve mikroorganizmaların kültür koşulları da önemlidir (Wang, Yao ve Wu, 2003; Marinescu ve Stoicescu, 2009; Thanardkit, Khunrae, Supphantharika ve Verduyn, 2002; Bzducha-Wróbel ve diğerleri, 2014).

Liu ve diğerleri (2008) sonikasyon kullanımı ile *S. cerevisiae* maya bozulması sürecini optimize etmişlerdir. 20 dakikalık sonikasyondan (600 W) sonra hücrelerden proteinlerin daha etkili bir şekilde ayrıştırıldığını ve %10'luk konsantrasyonda 6 dakikadan fazla sonikasyondan sonra hücre duvarının parçalanmasında bir artış olduğunu bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında, *P. kudriavzevii* M10 maya suşunun hücre duvarının yapısını bozmadan sonikasyon koşullarının optimizasyonu hedeflenmiştir. Bu amaçla sonikasyon çözeltisi, sonikasyon süresi ve sonikasyon çözelti miktarı optimize edilmiştir. Hücre duvarının sonikasyonunda, solüsyon olarak ddH₂O, SF ve sodyum-sitrat kullanılmıştır. Kullanılan solüsyonlar arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Fakat SF içerisinde barındırdığı tuz nedeniyle sonikasyon sonrası pellette kristallenmeler gözlemlenmiştir. Bu çalışmanın devamlılığı açısından problem yaratabileceği için sonikasyon solüsyonu olarak SF tercih edilmemiştir. ddH₂O, saflığın ve kimyasal yapının etkilenmemesi açısından en uygun solüsyon olarak tercih edilmiştir. Magnani ve diğerleri (2009) hücre konsantrasyonu ile sonikasyonda kullanılan solüsyonun hacmi arasında bir ilişki olduğu rapor ettiklerinden bu tez çalışmasında farklı (10, 20 ve 30 mL) solüsyon miktarlarında sonikasyon denenmiştir. 20 mL ddH₂O içerisinde 20 dk kesikli olarak sonike edilen hücreler daha az boyandıklarından lizatin daha iyi bir şekilde ayrılmış olduğu düşünülmüştür. Optimize sonikasyon süresinin 20 dk olduğu tespit edilmiştir. Magnani ve diğerleri (2009) en iyi sonikasyon süresinin sürenin 6 dk olduğu ifade etmişlerdir. Kullanılan sonikasyon çözeltisi sonikasyon yoğunluğunda önemli bir rol oynar. Sıcaklık, yüzey gerilimi, buhar basıncı ve viskozite de sonikasyon açısından önemli faktörlerdir ve bu faktörlerin değerleri birbirini karşılıklı olarak etkileyebilir. Yüksek sıcaklıklar, daha yüksek basınç ve daha düşük yüzey

gerilimi ile sonuçlanır. Bu, sonikasyon kabarcıklarının oluşma eğilimini artırır. Sıcaklığın artmasıyla, hassas hücreleri daha kolay bir şekilde parçalamak mümkün olabilir (Wong, Tan ve Geow, 2019). Sabit ısıda kalabilen, soğutma banyosu kullanarak, mümkün olan en düşük sıcaklıklarla sonikasyonun yapılması bu nedenden dolayı önemlidir. Bu farklılığın çalışmamızda sonikasyonun buzlu beherde gerçekleştirilmesinden dolayı ortam sıcaklığının sabit tutulamamasından ve kullanılan cihazın güç (W) farklılığından olabileceği düşünülmektedir. Optimize edilen sonikasyon sonucunda örneklerin toplam karbonhidrat ve toplam protein miktarları ölçülmüştür. Karbonhidrat miktarı ekstraksiyona başlamadan önce 312 mg/L olarak bulunurken, yapılan işlemler sonucunda 750,2 mg/L olarak tespit edilmiştir. Protein miktarında gözlemlenen azalma ise (başlangıçta 0,11 mg/mL, sonikasyonun ardından 0,63 mg/mL), mannoproteinlerin kovalent bağlarla bağlandığı karbonhidratlardan ayrıştığını göstermektedir. Bu ayrışma, hücre duvarında yer alan karbonhidratların artışı desteklemektedir.

Maya hücre duvarında bulunan lipidlerin uzaklaştırılması amacıyla reflüks vb. cihazlar kullanılmaktadır (Liu ve diğerleri, 2008). Freimund ve diğerleri, (2003) sıcak su ekstraksiyonu ve proteaz işleminden sonra çözünmeyen örnekte sadece glukan ve lipidlerin kaldığını ve alkali muamele kullanıldığında, lipidlerin gliserol ve yağ asitlerine hidroliz olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar polar lipidlerin çözünebilir ve alkali ile muameleden sonra süpernatantla atıldığını; bu nedenle, β -glukan ekstraksiyon işlemlerinin sonucunda örneklerin lipid içermediğini rapor etmişlerdir. Liu ve diğerleri (2008), sonikasyondan sonra örneğin %2,08 lipid içerdiğini ve enzimlerin aktivitesini gösterebilmesi için muameleden önce lipidlerin hücre duvarından uzaklaştırılması gerektiğini ifade etmişlerdir (Liu ve diğerleri, 2008). Bu araştırmacılar aynı zamanda *S. cerevisiae*'den β -glukanın çıkarılması sırasında lipidlerin ekstraksiyonu için izopropanol organik çözücüsü önerilmiştir (Liu ve diğerleri, 2008). Bu tez çalışmasında lipidlerin uzaklaştırılması amacıyla herhangi bir optimizasyon yapılmamıştır. Liu ve diğerleri (2008)'nin yapmış olduğu şekilde soxlet cihazında, izopropanol organik çözültisiyle birlikte, örnekler 2 saat muamele edilmiştir. Lipitlerin uzaklaştırılmasıyla örneklerin, protein kalıntılarından ayrıştırılması kolaylaştırılmıştır.

β -glukan'ın protein içeriği, fonksiyonel bir bileşen olarak kullanılan β -glukanın eklendiği ürünlerin, çeşitli fonksiyonel özelliklerini etkileyebilmektedir. Bu nedenle beta glukandan proteinlerin özellikle mannoproteinlerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Proteinlerin

ayrıştırılmasında asit-alkali koşullara bir alternatif, enzimlerdir. Enzimatik uygulamalar, doğal yapıyı koruma ve zincir bozulmasını önleme avantajına sahiptirler (Kath ve Kulicke, 1999). Glukanazlar, kitinazlar ve proteazlar, maya hücre duvarlarının ayrıştırılmak istenen bileşenlerini çözündürmek için kullanılmaktadır (Osumi, 1998). Bazı araştırmacılar, önemli miktarda proteinin uzaklaştırılmasının, sıcak su muamelesi ve proteaz enziminin etkisiyle olabileceğini bildirmiştir (Freimund ve diğerleri, 2003, Jaehrig ve diğerleri, 2008, Liu ve diğerleri, 2008). Protamex enzimi gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır, güvenli olduğu kanıtlanmıştır ek olarak, ucuzdur, kullanımı ve saklaması kolaydır (Shen, Wang, Wang, Wu ve Chen, 2008). Protamex enziminin, 55 °C'de ve pH 7,5'te 5 saatlik optimum koşullarla sıcak su ekstraksiyonundan kalan proteinlerin çıkarılması için etkili olduğu rapor edilmiştir (Liu ve diğerleri, 2008). Bu tez çalışmasında da kalan proteinlerin tamamen uzaklaştırılması için Liu ve diğerleri, (2008) tarafından bildirilen koşullar kullanılmıştır.

Çalışmamızda yapılan tüm ekstraksiyon koşulları (maya inokülasyon miktarı, otoliz ve sıcak su muamelesi aşamaları, sonikasyon basamağında yapılan optimizasyonlar) göz önüne alınarak, β -glukan ekstraksiyonu için optimum koşul belirlenmiştir (Çizelge 4.5). Oluşturulan metot, beş farklı *P. kudriavzevii* maya suşlarında uygulanmış ve her ekstraksiyon basamağında saflık değerlendirmelerinin yapılabilmesi amacıyla örneklerin toplam karbonhidrat, lipid ve protein içerikleri ve β -glukan miktarları tayin edilmiştir. β -gluM13'ün, karbonhidrat miktarı başlangıçta 316 mg/L'iken, son ekstraksiyon basamağı olan protamex uygulaması sonrası 800 mg/L'ye (%253 artış) yükselmiştir. β -gluM13'ün, lipid miktarı %5,43'ten %0,05'e (%92'lik kayıp), protein miktarı ise 0,612 mg/mL, son basamakta 0,019 mg/mL düşmüştür (%97'lik kayıp). β -gluM13'teki, β -glukan miktarı başlangıçta %12,3 iken ekstraksiyondan sonra %87,8 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda her basamakta karbonhidrat miktarının artış gösterip, lipid ve protein miktarının azalması, istenmeyen hücre duvarı materyallerinin ve hücre lizatinin uzaklaştırıldığını kanıtlar niteliktedir.

Liu ve diğerleri (2008) *S. cerevisiae* hücre duvarından lipidlerin uzaklaştırılması için, çalışmamızdan farklı olarak maya hücre duvarına homojenizasyon işlemi uygulamışlardır. Bu araştırmacılar test ettikleri ekstraksiyon metodu ile %91 verime sahip β -glukan elde etmişlerdir. Magnani ve diğerleri, (2009)'nin yapmış olduğu çalışma ise Liu ve diğerleri (2008)'nin yapmış olduğu çalışmadan farklı olarak lipid ekstraksiyonunda hücre duvarının

sonikasyonunu içermektedir. Uygulanan ekstraksiyon metodu ile %93 verimde β -glukan elde edilmiştir. Freimund ve diğerleri (2003) ise düşük olmayan pH ve etil alkol ile muamele yapılan β -glukanları %87 verimde elde etmiştir. Yapılan tüm ekstraksiyon bu çalışmaları *S. cerevisiae* mayasından β -glukan ekstraksiyonuna dayanmaktadır. Bu çalışmalar göz önüne alındığında elde etmiş olduğumuz %87 verime sahip β -glukan farklılığının çalışılan mayanın farklılığından olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca yapılan çalışmalarda kullanılan mayanın miktarı, ekstraksiyon koşulları net olarak belirtilmemiştir. Bu sebeple optimize bir metot oluşturulmuş ve laboratuvar koşullarında yüksek verimde β -glukan eldesi sağlanmıştır. Oluşturulan optimize metot birçok biyoteknolojik çalışmada β -glukanların kullanımını arttıracak nitelik taşımaktadır.

Bir gıda bileşenini prebiyotik olarak adlandırmak ve sınıflandırmak için çeşitli *in vitro* testler kullanılır. Prebiyotiklerin mide asidi, sindirim enzimleri veya hidroliz yoluyla bozulmaya karşı gösterdikleri direnç; bağırsak mikroorganizmaları tarafından fermente edilme durumları (yıkım, metabolizma) ve bağırsaktaki yararlı mikroorganizmaların büyümesinin seçici olarak uyarılması bu testler arasında yer almaktadır (Das, Baruah ve Goyal, 2014). Prebiyotikler, bağırsaktaki yararlı mikrobiyotanın gelişimini teşvik ederek sindirimin düzenli ve sağlıklı bir şekilde gerçekleşmesi için olumlu etkide bulunur, bağırsakta mineral emilimini artırır ve bağışıklık sistemini güçlendirerek sağlığa yararlı olurlar (Dankowiakowska, Kozłowska ve Bednarczyk, 2013; Yadav ve diğerleri, 2016; Sugiharto, 2016). Bir besinsel bileşenin prebiyotik olarak kullanılabilmesi için sindirim sisteminin üst bölgelerinde hidrolize uğramadan kolona ulaşması gerekmektedir. Ek olarak kolondaki bir ya da sınırlı sayıda yararlı bakteriler için enerji kaynağı olarak kullanılmalı, yararlı bakterileri seçici bir şekilde zenginleştirmesi gerekmektedir (Vegas ve diğerleri, 2006; Di Gioia ve Biavati, 2018). Laktik asit ve diğer bağırsak yararlı bakteriler tarafından prebiyotiklerin kullanılması, prebiyotikler için spesifik bir hidroliz varlığını gerektirir. Mikroorganizmalarda bu metabolik sistemleri kodlayan genler, farklı suşlarda mevcut olabilmektedir. Laktobasiller için gözlemlenen metabolik çeşitliliğin aksine, farklı prebiyotikler üzerindeki bifidobakteriler için prebiyotik aktivite skorları, çoğu skor 0,2 ile 0,4 arasında olmak üzere (*B. bifidum* hariç) nispeten daha az değişiklik göstermiştir (Huebner, Wehling ve Hutkins, 2007). Bu nedenle bu tez çalışmasında *P. kudriavzevii* M13 maya suşundan elde edilen β -glukan'ın probiyotik *L. plantarum* GD2, *B. bifidum* A12, *S. cerevisiae* BD1 mikroorganizmaları kullanılarak, fermente edilebilme yetenekleri araştırılmıştır. *L. plantarum* GD2, *B. Bifidum* A12, *S. cerevisiae* BD1 suşlarının hem uygun

kontrol besi ortamında (sırasıyla, MRS, BSM ve YPD), karbon kaynağı çıkarılmış C-MRS, C-BSM ve C-YPD besi ortamında hem de içerisinde %2 β -glukan barındıran besi ortamında fermente etme durumları araştırılmıştır. *L. plantarum* GD2 suşu; MRS ortamında 6,9 log kob/mL’lik bir gelişme gösterirken, C-MRS ortamında 5,7 log kob/mL, C-MRS+ β -gluM13 ortamında 7,2 log kob/mL’lik bir gelişme göstermiştir. *B. bifidum* A12 suşu; BSM besi ortamında 6,5 log kob/mL’lik bir gelişme gösterirken, C-BSM ortamında 3,5 log kob/mL, C-BSM+ β -gluM13 ortamında ise 8,0 log kob/mL’lik bir gelişme göstermiştir. *S. cerevisiae* BD1 maya suşu; YPD besi ortamında ise 6,5 log kob/mL’lik bir gelişme gösterirken, C-YPD ortamında 5,6 log kob/mL, C-YPD+ β -gluM13 ortamında ise 7,3 log kob/mL’lik bir gelişme göstermiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, her üç mikroorganizma da (*L. plantarum* GD2, *B. bifidum* A12, *S. cerevisiae* BD1) β -gluM13 karbon kaynağı olarak kullanarak (C-MRS+ β -gluM13, C-BSM+ β -gluM13 ve C-YPD+ β -gluM13) fermente etmişlerdir. β -glukan'ların *Ligilactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Saccharomyces* gibi mikroorganizmalar tarafından fermente edilmeleri ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu sebeple prebiyotik olarak kullanılma potansiyeline sahip bir diğer polisakkarit olan EPS ile karşılaştırılmıştır. Sarıkaya, Aslim ve Yüksekdağ, (2017), *L. rhamnosus* GD-11 suşundan elde ettikleri l-EPS’nin *B. breve* BASO-1 tarafından fermente edildiğini ifade etmişlerdir. Bikric ve diğerleri, (2021), tavuk bağırsağı kaynaklı *Ligilactobacillus salivarius* suşundan elde ettikleri EPS’lerin (EPSBIS312 ve EPSBIS722) tavuk prebiyotiği olarak kullanılabilirliğini araştırdıkları bir çalışmada, %2 oranında EPS’leri içeren besi ortamında *L. salivarius* BIS820 suşunun canlı hücre sayısının 7,1 log kob/mL olduğunu ve *L. salivarius* BIS820 suşunun EPS’leri fermente edebildiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmalar bizim çalışmalarımızla fermente edilebilmeleri bakımından benzerlik göstermektedir. Bu da β -GluM13’ün prebiyotik bir potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir.

Polisakkaritlerin prebiyotik özelliklerinden biri mikroorganizmalar tarafından fermente edilmeleri iken diğeri yararlı mikroorganizmaların gelişimine pozitif yönde etki etmeleridir. Prebiyotiklerin bağırsak sağlığına katkıda bulunmasındaki en temel etki mekanizmaları, sindirim sisteminin mikrobiyal dengesini sağlamalarıdır. Bağırsaktaki yararlı bakterilerin prebiyotikleri kullanması ile, prebiyotiklerden kısa zincirli yağ asitleri oluşumu da artış göstermektedir. Kısa zincirli yağ asitleri, bağırsak çevre pH’sını düşürüp müsin üretimini artırarak, bağırsakla ilişkili lenfoid dokularda yer alan immun hücreler üzerindeki özel reseptörlere kısa zincirli yağ asitlerinin bağlanmasını artırır. Böylece IgA, T hücreleri ve NK (naturel killer) hücrelerinin sayısında artışa neden olarak *Salmonella*, *Camphylobacter*,

Clostridium perfringens, *Escherichia coli* gibi patojen bakterilerin gelişmesini engellerler (Kim, Seo, Kim ve Paik, 2011; Alloui, Szczurek ve Świątkiewicz, 2013). Buradan yola çıkarak bu tez çalışmasında, *P. kudriavzevii* M13 maya suşundan elde edilen β -glukanın (β -gluM13) prebiyotik olarak kullanılabilirliği değerlendirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda β -gluM13'ün, Laktobasil Gelişimini Düzenleyici (LGD), Bifido Gelişimini Düzenleyici (BGD) ve Maya Gelişimini Düzenleyici (MGD) etkileri belirlenmiştir. Glukoz yerine farklı konsantrasyonlarda β -gluM13 ilave edilen MRS besi ortamlarında, konsantrasyon artışına bağlı olarak canlı hücre sayılasında kontrol grubuna göre (MRS) %136'lık artış olduğu tespit edilmiştir. En yüksek LGD etkisi 10 mg/mL (9,4 log kob/mL) ilave edilmiş besi yerinde belirlenmiştir. β -gluM13, ticari olarak kullanılan ve bitkisel kaynaklı olan inülin prebiyotiğinden (8,3 log kob/mL) daha yüksek LGD etkisi göstermiştir. Bifidobacterium Selective Medium (BSM) sıvı besiyerinde bulunan glukoz yerine, β -gluM13'ten farklı konsantrasyonlarda ilave edilmiştir. En yüksek BGD etkisi, 5 mg/mL β -gluM13 ilave edilmiş besi yerinde (9,4 log kob/mL, %147'lik artış) tespit edilmiştir. β -gluM13, ticari ve bitkisel kaynaklı inülininden daha (7,9 log kob/mL) yüksek BGD etkisi göstermiştir. Glukoz yerine farklı konsantrasyonlarda β -gluM13 ilave edilen YPD besi ortamlarında, konsantrasyon artışına bağlı olarak canlı hücre sayılasında kontrol grubuna göre (YPD) %144'lük artış olduğu tespit edilmiştir. En yüksek MGD etkisi 10 mg/mL (9,4 log kob/mL) ilave edilmiş besi yerinde belirlenmiştir. β -gluM13, ticari olarak kullanılan ve bitkisel kaynaklı prebiyotik olan inülininden (8,5 $\pm$ 0,5 log kob/mL) daha yüksek MGD etkisi göstermiştir. Bu sonuçlar bize β -gluM13'ün mikrobiyotada yararlı bakterilerin gelişimini teşvik etmek için kullanılabileceğini göstermektedir. β -gluM13'ün LGD, BGD ve MGD etkisi üzerine elde edilen tüm sonuçlar ticari olarak kullanılan inülin prebiyotiği ile mukayese edildiğinde, β -gluM13'ün kullanıldığı tüm besi ortamlarında inülininden daha yüksek etki göstermiştir. İnülinin yaygın bir şekilde yem katkı maddesi olarak kullanılmasına rağmen yapılan bazı *in vitro* çalışmalarda laktik asit bakteri için düşük prebiyotik etkiler gösterdiği rapor edilmiştir (Gopal, Prasad, Smart ve Gill, 2001; Huebner, Wehling ve Hutkins, 2007). İnülin, doğada birçok bitkide bulunmasına karşın çalışmalarda genellikle ticari olarak hindiba bitkisinden elde edilmektedir. Ancak inülinin transgenik bitkilerden de elde edildiğine dair çalışmalar mevcuttur. Bu durumun mikrobiyal üretime göre birçok dezavantajı olduğu bilinmektedir. Transgenik bitkilerin ileride insan sağlığı üzerine ne gibi etkiler göstereceği tam olarak bilinmemekle birlikte, toksik etkiler, antibiyotik direnci, kanser riski ve alerji gibi sağlık üzerine olumsuz etkilere yol açabileceği bildirilmiştir (Haspolat, 2012; Singla ve Chakkaravarthi, 2017). Beta glukanların insan

sağlığına herhangi bir zararlı etkisinin bildirilmemesi, enerji verimi, endüstriyel atıkların değerlendirilebilirliği, çevreye zarar vermeyişi, kısa sürede yüksek hacimde ürün elde edilebilmesi gibi birçok avantajlara sahip olması nedeniyle (Liu ve diğerleri, 2008) ve bu özelliklere ilaveten prebiyotik özelliklerinin de iyi olmasından dolayı β -gluM13'ün inüline alternatif olabileceği düşünülmüştür.

β -glukan'ların LGD, BGD ve MGD etkisi ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu sebeple prebiyotik olarak kullanılma potansiyeline sahip bir diğer polisakkarit olan EPS ile karşılaştırılmıştır. Sarikaya, Aslim ve Yuksekdağ, (2017), EPS'nin bağırsak mikrobiyotası için yararlı olan bifidobakterilerin gelişimini düzenlediğini bildirmişlerdir. Bikric ve diğerleri (2021), *L. salivarius* suşundan elde ettikleri EPS'lerin (EPSBIS312 ve EPSBIS722) %10 oranında EPS'leri içeren besi ortamlarında *L. salivarius* BIS820 suşunun canlı hücre sayısının sırasıyla; 8,2 log kob/mL ve 8,3 log kob/mL olduğunu bundan dolayı EPS'lerin LGD etkisine sahip olduklarını rapor etmişlerdir. Bu araştırmaların sonuçları bizim çalışmamızın sonuçlarına benzerlik göstermektedir. Bu da bize β -gluM13'ün prebiyotik bir potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir.

Inülin prebiyotiğine alternatif olarak düşünülen EPS'ler ile yapılan çalışmalar göz önüne alındığında, bizim çalışmamız elde ettiğimiz β -glukanın prebiyotik olarak kullanılabilirliğinin daha fazla olduğunu ve inülin haricinde EPS'lere de alternatif olabileceğini düşündürmektedir.

Antioksidanlar, radikallerle hızlı bir şekilde reaksiyona girerek otooksidasyonun/peroksidasyonun ilerlemesini önleyen maddelerdir (Dündar, 1999). Antioksidanların rolleri arasında serbest radikallerin fazlasını etkisizleştirmek, serbest radikallerin toksik etkilerine karşı hücreleri korumak ve hastalıkları önlemede katkı sağlamak sayılabilir (Pham-Huy L. A, He ve Pham-Huy C., 2008). Ratnam, Ankola, Dhardwaj, Shana ve Kumar, (2006) antioksidanların nörolojik hastalıklar, otoimmün hastalıklar ve diğer hastalıklara karşı tedavi edici, iyileştirici ve önleyici rolleri olduğunu bulmuşlardır. Antioksidan bileşikler kronik inflamasyon, kanser, ateroskleroz ve kardiyovasküler bozuklukların tedavisinde ve kısıtlanmasında önemli bir rol oynamaktadır (Liu ve diğerleri, 2009). Çoğu organizma antioksidan savunma ve onarım sistemine sahip olmasına rağmen proteinlerin veya DNA'nın zarar görmesini önlemek için yeteri kadar işlevsel değildir. Tersiyer butilhidrokinon (TBHQ), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve bütıl hidroksil anizd (BHA)

gibi birçok sentetik bileşik antioksidan olarak görev almaktadır (Ananthi ve diğerleri, 2010). Kullanılan sentetik antioksidanların karsinojenezden ve karaciğer hasarından sorumlu oldukları bildirilmektedir. Bu sebeple, birçok kronik hastalığın olası etkilerini önlemek için daha etkili olabileceği düşünülen doğal antioksidanlara ilgi artmıştır (Kanmani ve diğerleri, 2011). Biyo-aktif doğal polimerlerin önemli bir sınıfı olarak, polisakkaritler umut verici antioksidanlardır ve *in vitro* ve *in vivo* olarak etkili, toksik olmayan ilaçlar ve gıda katkı maddelerinin adayları olarak kabul edilmişlerdir (Zhang ve diğerleri, 2013).

Farklı kaynaklardan elde edilen ve moleküler ağırlıkları farklı olan β -glukan'ların çeşitli biyolojik aktiviteleri bulunmaktadır. Antioksidan aktivite, polisakkaritlerin biyoaktivitesini değerlendirmek için önemli parametrelerden biri olarak kabul edilmektedir. İyi bir antioksidan aktiviteye sahip polisakkaritin, anti-aging, immün regülasyon ve anti-tümör etkiye sahip olduğu rapor edilmektedir (Yuan, Lan, He, Li ve Ma, 2020).

β -glukan'ların antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde birçok farklı yöntem kullanılmaktadır (Robak ve Gryglewski, 1988; Zheng, Li, Wang, 2014; M Zhang, Cheung, L Zhang, 2001). DPPH metodu, biyoaktif bileşiklerin antioksidan aktivitesini değerlendirmekte kullanılan yaygın bir metottur (Xie ve diğerleri, 2012; Wen ve diğerleri, 2011; Fan, Li, Deng ve Ai, 2012). DPPH radikalleri, DPPH-H'nin stabil nötr formuna dönüştürmek için bir antioksidan ajandan elektron bağışını (hidrojen) kabul eden 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil'in serbest nitrojen radikalleridir. Metanol çözeltisinde, DPPH'nin serbest radikalleri, mor renkleriyle temsil edilen 517 nm'de karakteristik UV görünür absorpsiyona sahiptir. Renkte bir solma veya sarıya dönüşme, DPPH'nin molar absorpsiyonundaki azalma ile ilişkilidir (Zhou ve Chen, 2011). Alzorqi, Ketabchi, Sutherr ve Manickam (2016)'nin yapmış olduğu çalışma neticesinde, standart olan kullanılan askorbik asitin, konsantrasyonunu %1'den %5'e yükselterek, farklılaşan bu oranlarda, DPPH süpürme aktivitesinin %70,5'ten %95,26'ya bir artış gösterdiğini bulmuşlardır. *Ganoderma lucidum* mantarından elde edilen β -glukanın da DPPH süpürme oranı %40,3 olarak belirlemişlerdir.

Yulaf ve arpadan elde edilen β -glukanlar ile yapılan başka bir çalışmada ise örnek çözeltilerin radikal süpürücü etkisi, renkteki değişiklikler ölçülerek ve 517 nm absorbansta okunarak incelenmiştir (Shah, Gani, Masoodi, Wani ve Ashwar, 2017). 20 mg/mL'lik bir konsantrasyonda yulaftan elde edilen β -glukan %15,22 ve arpadan elde edilen 100 mg/mL'lik β -glukan %47,31'lik süpürücü aktivite göstermiş, ancak standart olarak

kullanılan α - tokoferol'e (%69,28) kıyasla β -glukan'ların daha az süpürme etkisi olduğu bulunmuştur. *Dictyophora indusiata* mantarı kaynaklı β -glukan'da DPPH radikali temizleme aktivitesinde de benzer bir artış rapor edilmiştir. 1 mg/mL saflaştırılmış numunenin DPPH süpürme oranı %50,27, askorbik asitin ise %81,92 olarak bulunmuştur (Deng ve diğerleri, 2012).

Mayalardan elde edilen β -glukan'ların antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Çalışmamızda farklı konsantrasyonlardaki (0,5-50 mg/mL) β -gluM13'ün DPPH radikali giderme etkisi, pozitif kontrol olarak yaygın kullanıma sahip askorbik asit ile kıyaslanmıştır. 0,2 mg/mL'den 5 mg/mL konsantrasyonuna kadar, konsantrasyon artışına bağlı olarak β -gluM13'ün DPPH radikalini giderme aktivitesi artarken, 10 mg/mL'den sonra düşmüştür. 5 mg/mL β -gluM13'ün %59,1'lik radikal süpürücü etkisi olduğu ve yine aynı miktardaki pozitif kontrolün ise %63'lük bir süpürücü aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Diğer araştırmalara benzer şekilde β -gluM13'ün DPPH radikalini giderme aktivitesi askorbik asitten (kontrol) düşük çıkmıştır. Buna ilaveten, çalışmamız diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında β -gluM13'ün DPPH radikali giderme etkisinin daha yüksek bir düzeyde olduğu görülmektedir. Poliakkaritlerin özellikle EPS'lerin farklı karbon omurgalarının, dal yapısının ve monosakkarit bileşimlerinin, polisakkaritlerin antioksidan aktivitelerini etkilediği görülmüştür (Lo, Kang, Wang ve Chang, 2007; Wang ve diğerleri, 2015). Yapısında ramnoz ve galaktoz monosakkaritlerini bulunduran polisakkaritlerin antioksidan aktivitesinin fazla olduğu da rapor edilmiştir (Lo ve diğerleri, 2011, Tang ve diğerleri, 2017). β -glukan'ların antioksidan etki mekanizması ise net bir şekilde aydınlatılmamıştır. Ancak genel olarak polisakkaritlerin antioksidan etkilerinin yapılarında bulunan monosakkaritlerden kaynaklanabileceği ifade edildiğinden, β -gluM13'ün glukoz monomerlerinin bağlanma yapılarından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Etki mekanizmasının aydınlatılabilmesi için, maya beta glukanlarının antioksidanları ile ilgili daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Prebiyotikler, insan bağırsak fonksiyonunu iyileştirmek ve insanın kolonik mikrobiyotasının manipülasyonu yoluyla sistemik hastalıkları önlemek için fonksiyonel gıda bileşenleri olarak kullanılmaktadırlar (Gibson, Probert, Van loo, Rastall ve Roberfroid, 2004). Bir prebiyotiğin etkili olabilmesi için insan vücudunun gastrointestinal sistemdeki pH'ya ve enzimlere karşı dirençli olması gerekmektedir. Bunun yanı sıra faydalı bakterilerin uyarılmasında, faydalı olmayan bakterilerin ise inhibisyonunda görev alabilmelidir (Moon

ve diğerleri, 2015). Prebiyotiklerin ana etki alanı, probiyotik bakteriler tarafından fermente edildiği kolondur. Bu nedenle, bir prebiyotik, kolona sağlam ulaşmak için mide asiditesinin ve sindirim enzimlerinin etkilerine dirençli olmalıdır. β -glukan'ların gastrointestinal sisteme dayanıklılıkları, yapay mide ve bağırsak sıvısında hidroliz yüzdelere göre değerlendirilmektedir.

Farklı konsantrasyonlarda (0,5-10 mg/mL) β -gluM13'ün yapay mide sıvısında değişen pH (2, 3) ve sürelerde (90 ve 180 dk) hidroliz yüzdeleri %0,91-1,14 arasında belirlenmiştir. Kullanılan konsantrasyon ile hidroliz yüzdesi arasında istatistiksel olarak herhangi bir ilişki bulunamamıştır. 1 mg/mL'lik β -gluM13, pH 3 de 90 dakikada en yüksek dirence sahipken; 5 mg/mL'lik β -gluM13, pH 2 de 180 dakikada en düşük dirence sahiptir. β -gluM13'ün süre arttıkça yapay mide sıvısına direnci azalmıştır. *Lactobacillus plantarum* DM5 suşundan izole edilen Glukan-DM5'in hidroliz yüzdesinin, yapay mide suyunun pH'ındaki artışla azaldığı ve pH 1, 2, 3 ve 4 'de hidroliz yüzdelерinin, 1 saat sonra sırasıyla %0,39, %0,33, %0,25 ve %0,19 olduğu bildirilmiştir (Das, Baruah ve Goyal, 2014). Shi ve diğerleri (2018), *Lactobacillus* sp.' den elde edilen curd'ları (1 → 3)- β -D-glukan oligosakkaritin (GOS) yapay mide sıvısındaki hidroliz yüzdesinin %0,09 olduğu rapor edilmiştir. Rapor edilen bu çalışmalardan β -gluM13 yapay mide sıvısına daha duyarlı bulunmuştur. Ancak, β -gluM13, pitaya (ejderha meyvesi) dan elde edilen oligosakkaritten (%4,04) (Wichienchot, Jatupornpipa, Rastall, 2010), *Mangifera pajang* lifli hamurdan elde edilen EPS'den (pH 4, 5, 6, 7 ve 8'de sırasıyla %2,75, %3,35, %4,15, %4,36 ve %4,53) (Al-Sheraji ve diğerleri, 2012), *L. plantarum* A3'den izole edilen EPS'den (pH 1'de %2,51) (Hongpattarakere, Cherntong, Wichienchot, Kolida, Rastal, 2012) daha dirençli bulunmuştur. Maya β -glukan'larının yapay mide sıvısındaki hidroliz yüzdesinin belirlendiği herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Farklı konsantrasyonlarda (0,5-10 mg/mL) β -gluM13'ün yapay bağırsak sıvısında 240 dk'da değişen safra konsantrasyonlarında (%0,3; 0,5) hidroliz yüzdeleri %1,04-1,16 arasında belirlenmiştir. Kullanılan konsantrasyon ile hidroliz yüzdesi arasında istatistiksel olarak herhangi bir ilişki bulunamamıştır. 10 mg/mL'lik β -gluM13, %0,5 safra sıvısında en düşük dirence sahipken; 0,5 mg/mL'lik β -gluM13 %0,3 safra sıvısında en yüksek dirence sahiptir. β -gluM13'ün safra konsantrasyonu arttıkça yapay bağırsak sıvısına direnci azalmıştır. Das, Baruah ve Goyal, (2014), *Lactobacillus plantarum* DM5 suşundan izole ettikleri Glukan-DM5'in yapay bağırsak sıvısındaki hidroliz yüzdesini %0,21 olarak belirlemişlerdir. Shi ve

diğerleri (2018)'nin yaptıkları bir çalışmada, *Lactobacillus* sp. den elde edilen curdlan (1 → 3)-β-D-glukan oligosakkaritin (GOS) yapay bağırsak sıvısındaki hidroliz yüzdesinin %0,40 olduğu ifade edilmiştir. Rapor edilen bu çalışmalardan β-gluM13 yapay bağırsak sıvısına daha duyarlı bulunmuştur. Maya β-glukan'larının yapay bağırsak sıvısındaki hidroliz yüzdesinin belirlendiği herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.





6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan araştırmalar, β -glukan'ın bağırsak ortamını iyileştirebileceğini, doğuştan gelen ve edinilmiş bağışıklığını uyardığını, mikotoksinleri adsorbe edebileceğini, yara iyileşmesini destekleyebileceğini, kanseri önleyebileceğini ve antioksidan aktiviteye sahip olduğunu doğrulamıştır. Ayrıca hayvanlarda hastalıkları önlemek ve üretim performansını artırmak için de β -glukanlar önemli bir rol oynamaktadır. Son yıllarda β -glukanlar, insanlarda yara iyileştirme, anti-enfektif ilaçlar veya aşı adjuvanları olarak kullanılmaktadırlar. β -glukanların, insan sağlığı için yararlı özellikleri doğrultusunda, bu polisakkaridin izolasyonu ve saflaştırılması için birçok işlem geliştirilmiştir. Bunların çoğu, glukoz zincirlerinde az çok güçlü bir bozulmaya, düşük verime ve sınırlı saflığa neden olan sıcak alkali, asitler veya her ikisinin kombinasyonunun uygulandığı yöntemlerdir. Bu yöntemler, β -glukanlarda düşük verim ve sınırlı saflığa neden olmasından dolayı sıcak su ve enzim kullanımını içeren başka metotlar önerilmiştir. β -glukanların, ekstraksiyonu için geliştirilen yöntemler maliyetli ve çevreye zararlı olabilmektedir. Bu sebeple dezavantajların farklı maya suşlarında giderildiği, optimize bir metodun daha uygun olabileceği düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında, daha önce β -glukan ekstraksiyonu çalışılmamış olan *Pichia kudriavzevii* M13 maya suşundan β -glukan ekstraksiyonu optimize edilmiştir. Optimize edilen ekstraksiyon metodu, maya glukanının nispeten düşük maliyetlerle, endüstriyel olarak yüksek verimde, çevreye zararsız işlemlerle elde edilmesine imkân sağlamıştır. Maya β -glukanlarının antioksidan ve prebiyotik etkileriyle ilgili çok fazla sayıda çalışma bulunmaması nedeniyle bu konu ile ilgili yapılacak çalışmalara öncülük etme niteliğindedir. Bu tez çalışması maya β -glukan'ın prebiyotik olarak kullanılabilirliğinin araştırıldığı ilk çalışma niteliği taşımaktadır.

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

1. Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan, peynirden izole edilen ve 18SrRNA analizi ile tanımlanmış probiyotik *Pichia kudriavzevii* maya suşlarının hücre duvarından β -glukanın verimli bir şekilde ekstrakte edilmesi amacıyla en yüksek gelişme gösteren M10 suşunda farklı koşullarda beta glukan ekstraksiyonu optimize edilmiştir. *P. kudriavzevii* maya suşunun laboratuvar ortamında geliştirilmesinden başlayarak β -glukan izolasyonu için optimize bir

süreç tanımlanmıştır. İstenmeyen kirleticilerin giderilmesi için ağırlıklı olarak asit-alkali koşulların kullanıldığı önceki yayınlanmış veya patentli işlemlerin aksine, işlem adımlarımız, zincir bozulmasını önleyen ve doğal glukan yapısının kalmasına neden olan su, enzimler ve organik çözücüler gibi zararsız işlemlerden oluşmaktadır.

2. Belirlenen optimum ekstraksiyon koşulunda beş farklı *P. kudriavzevii* maya suşunun hücre duvarından β -glukan ekstrakte edilerek liyofilize edilen β -glukanların miktar tayinleri yapılmıştır. Aynı türe ait farklı suşların β -glukan miktarları farklılık göstermekle birlikte 5 maya suşunun da yüksek verimde β -glukana sahip olması onların biyoteknolojik β -glukan üreticisi olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Ancak elde edilen β -glukan ve/veya β -glukanların endüstriyel olarak kullanılabilmesi için karakterize edilmesi ve hayvan deneylerinin yapılması gerekmektedir.

3. Optimizasyonlarla ekstrakte edilen β -gluM13'ün yapısının bozulmamış olduğunu kanıtlamak oldukça önemlidir. Bilhassa kimyasal kullanımı olmadan elde edilen glukanlarda moleküler ağırlığın belirlenmesi, hücre duvarının orijinal glukan yapısının korunduğunun ispatlanabilmesi açısından uygulamalarımızın etkinliğinin kanıtlanması ve β -glukanın karakterizasyonunun yapılması gerekmektedir.

4. β -gluM13'ün probiyotik mikroorganizmalar için alternatif bir karbon kaynağı olabileceği, yararlı bağırsak mikroorganizmalarının gelişimini artırarak prebiyotik olarak kullanıma uygun olduğu tespit edilmiştir.

5. β -gluM13'ün gastrointestinal sistemine dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Bu *P. kudriavzevii* M13 maya suşundan ekstrakte edilen glukanın, prebiyotik olarak değerlendirildiği ilk çalışmadır. Bununla birlikte, β -gluM13'ün prebiyotik olarak kullanılabilirliğini doğrulamak için *in vivo* çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. β -gluM13 iyi bir antioksidan aktiviteye sahip olduğundan anti-aging, immün regülasyon ve anti-tümör etki gösterme potansiyeli olabilir.

7. β -gluM13'ün yapay mide ve bağırsak sıvılarına dirençli olması prebiyotik özelliklerini desteklemektedir. Elde edilen sonuçlar, β -gluM13'ün prebiyotik olarak kullanılabilirliğine öncülük edecek niteliktedir.

KAYNAKLAR

- Aida, F. M. N. A., Shuhaimi, M., Yazid, M., and Maaruf, A. G. (2009). Mushroom as a potential source of prebiotics: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 20(11-12), 567-575.
- Aidoo, K. E., Rob Nout, M. J., and Sarkar, P. K. (2006). Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermented foods. *FEMS Yeast Research*, 6(1), 30-39.
- Al-Sheraji, S. H., Ismail, A., Manap, M. Y., Mustafa, S., Yusof, R. M., and Hassan, F. A. (2012). Fermentation and non-digestibility of *Mangifera pajang* fibrous pulp and its polysaccharides. *Journal of Functional Foods*, 4(4), 933-940.
- Alloui, M. N., Szczurek, W., and Świątkiewicz, S. (2013). The usefulness of prebiotics and probiotics in modern poultry nutrition: A review. *Annals of Animal Science*, 13(1), 17-32.
- Alzorqi, I., Ketabchi, M. R., Sudheer, S., and Manickam, S. (2016). Optimization of ultrasound induced emulsification on the formulation of palm-olein based nanoemulsions for the incorporation of antioxidant β -d-glucan polysaccharides. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 71-84.
- Ananthi, S., Raghavendran, H. R. B., Sunil, A. G., Gayathri, V., Ramakrishnan, G., and Vasanthi, H. R. (2010). *In vitro* antioxidant and *in vivo* anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornata* (Marine Brown Alga). *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), 187-192.
- Arvindekar, A. U., and Patil, N. B. (2002). Glycogen a covalently linked component of the cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 19(2), 131-139.
- Avramia, I., and Amariei, S. (2021). Spent brewer's yeast as a source of insoluble β -glucans. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 825.
- Bacic, A., Fincher, G. B., and Stone, B. A. (2009). *Chemistry, biochemistry, and biology of 1-3 beta glucans and related polysaccharides*. Academic Press.
- Barnett, J. A. (2000). A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850–1880. *Yeast*, 16(8), 755-771.
- Baschong, W., Monglat, S., and Ochs, D. (2009). Glucan compositions. US patent 0156563 A1.
- Beauvais, A., Bruneau, J. M., Mol, P. C., Buitrago, M. J., Legrand, R., and Latge, J. P. (2001). Glucan synthase complex of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Bacteriology*, 183(7), 2273-2279.
- Berikten, D., and KIVANÇ, M. (2018). Fitazlar: Çevreye etkisi, beslenme ve biyoteknolojideki önemi. *Akademik Gıda*, 16(1), 109-119.

- Bikric, S., Aslim, B., Dincer, İ., Yuksekdağ, Z., Ulusoy, S., and Yavuz, S. (2021). Characterization of exopolysaccharides (epss) obtained from *Ligilactobacillus salivarius* strains and investigation at the prebiotic potential as an alternative to plant prebiotics at poultry. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-11.
- Bohn, J. A., and BeMiller, J. N. (1995). (1→3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: A review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers*, 28(1), 3-14.
- Bowman S. M., Free S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall, *BioEssays*, 28, 799-808.
- Bzducha-Wróbel, A., Błażej, S., Kawarska, A., Stasiak-Róžańska, L., Gientka, I., and 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.
- Bezerra, A. R., Oliveira, C., Correia, I., Guimarães, A. R., Sousa, G., Carvalho, M. J., and Santos, M. A. (2021). The role of non-standard translation in *Candida albicans* pathogenesis. *FEMS Yeast Research*, 21(4), foab032.
- Cabib, E., Roh, D. H., Schmidt, M., Crotti, L. B., and Varma, A. (2001). The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 276(23), 19679-19682.
- Chen, J., and Seviour, R. (2007). Medicinal importance of fungal β -(1→3), (1→6)-glucans. *Mycological Research*, 111(6), 635-652.
- Chen, S. N. (2014). *U.S. Patent No. 8,865,888*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Chen, Z., Lin, S., Jiang, Y., Liu, L., Jiang, J., Chen, S., and Wang, P. (2019). Effects of bread yeast cell wall beta-glucans on mice with loperamide-induced constipation. *Journal of Medicinal Food*, 22(10), 1009-1021.
- Cleary, L. J., Andersson, R., and Brennan, C. S. (2007). The behaviour and susceptibility to degradation of high and low molecular weight barley β -glucan in wheat bread during baking and *in vitro* digestion. *Food chemistry*, 102(3), 889-897.
- Cody, W. L., Wilson, J. W., Hendrixson, D. R., McIver, K. S., Hagman, K. E., Ott, C. M., Nickerson C. A., and Schurr, M. J. (2008). Skim milk enhances the preservation of thawed -80 °C bacterial stocks. *Journal of Microbiological Methods*, 75(1), 135-138.
- Daba, A. S., and Ezeronye, O. U. (2003). Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. *African Journal of Biotechnology*, 2(12), 672-678.
- Dankowiakowska, A., Kozłowska, I., and Bednarczyk, M. (2013). Probiotics, prebiotics and synbiotics in poultry mode of action, limitation, and achievements. *Journal of Central European Agriculture*, 14(1), 467-78.

- Das, D., Baruah, R., and Goyal, A. (2014). A food additive with prebiotic properties of an α -d-glucan from *Lactobacillus plantarum* DM5. *International Journal of Biological Macromolecules*, 69, 20-26.
- De Nobel, H., van den Ende, H., and Klis, F. M. (2000). Cell wall maintenance in fungi. *Trends in Microbiology*, 8(8), 344-345.
- de Valdez, G. F., De Giori, G. S., de Ruiz Holgado, A. P., and Oliver, G. (1985). Effect of drying medium on residual moisture content and viability of freeze-dried lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(2), 413-415.
- Delatte, S. J., Evans, J., Hebra, A., Adamson, W., Othersen, H. B., and Tagge, E. P. (2001). Effectiveness of beta-glucan collagen for treatment of partial-thickness burns in children. *Journal of Pediatric Surgery*, 36(1), 113-118.
- Deng, C., Hu, Z., Fu, H., Hu, M., Xu, X., and Chen, J. (2012). Chemical analysis and antioxidant activity in vitro of a β -D-glucan isolated from *Dictyophora indusiata*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(1-2), 70-75.
- Di Gioia, D., and Biavati, B. (2018). Probiotics and prebiotics in animal health and food safety: conclusive remarks and future perspectives. In *Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety*, 4(11), 269-273.
- Diekjürgen, D., and Grainger, D. W. (2017). Polysaccharide matrices used in 3D *in vitro* cell culture systems. *Biomaterials*, 141, 96-115.
- Dimopoulos, G., Tsantes, M., and 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.
- Douglas, L. C., and Sanders, M. E. (2008). Probiotics and prebiotics in dietetics practice. *Journal of the American Dietetic Association*, 108(3), 510-521.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Roberts, P. A., and Smith, F. (1956). Colorimetric determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- Dündar, Y., Aslan, R. (1999). Hücre moleküler statüsünün anlaşılması ve fizyolojik önem açısından radikaller, antioksidanlar. *İnsizyon Cerrahi Tıp Bilim Dergisi*, 2(2), 134-142.
- Fan, L., Li, J., Deng, K., and Ai, L. (2012). Effects of drying methods on the antioxidant activities of polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 1849-1854.
- Freimund, S., Sauter, M., Käppeli, O., and Dutler, 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(2), 159-171.

- Galichet, A., Sockalingum, G. D., Belarbi, A., and Manfait, M. (2001). FTIR spectroscopic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: Study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype. *FEMS Microbiology Letters*, 197(2), 179-186.
- Galinari, É., Almeida-Lima, J., Macedo, G. R., Mantovani, H. C., and Rocha, H. A. O. (2018). Antioxidant, antiproliferative, and immunostimulatory effects of cell wall α -d-mannan fractions from *Kluyveromyces marxianus*. *International journal of Biological Macromolecules*, 109, 837-846.
- Geraldelli, D., Ribeiro, M. C., Medeiros, T. C., Comiran, P. K., Martins, K. O., Oliveira, M. F., and Queiroz, E. A. (2020). Botryosphaeran, a (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucan, reduces tumor development and cachexia syndrome in obese male rats by increasing insulin sensitivity and FOXO3a activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 985-994.
- Gardiner, T. (2000). β -glucan biological activities: A review. *Glycoscience and Nutrition*, 1, 1-6.
- Gawronski, M., Park, J. T., Magee, A. S., and Conrad, H. (1999). Microfibrillar structure of PGG-Glucan in aqueous solution as triple-helix aggregates by small angle x-ray scattering. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 50(6), 569-578.
- Ghoneum, M., Hamilton, J., Brown, J., and Gollapudi, S. (2005). Human squamous cell carcinoma of the tongue and colon undergoes apoptosis upon phagocytosis of *Saccharomyces cerevisiae*, the baker's yeast, in vitro. *Anticancer Research*, 25(2A), 981-989.
- Gibson, G. R. (1996). Concept of balanced colonic microbiota, prebiotics and synbiotics. *Probiotics, other nutritional factors and intestinal microflora*, 139-156.
- Gibson, G. R., and Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125(6), 1401-1412.
- Gibson, G. R., Beatty, E. R., Wang, X. I. N., and Cummings, J. H. (1995). Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*, 108(4), 975-982.
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., and Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14(8), 491.
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Van Loo, J., Rastall, R. A., and Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17(2), 259-275.

- Gopal, P. K., Prasad, J., Smart, J., and Gill, H. S. (2001). *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 67(3), 207-216.
- Greppi, A., Saubade, F., Botta, C., Humblot, C., Guyot, J. P., and Cocolin, L. (2017). Potential probiotic *Pichia kudriavzevii* strains and their ability to enhance folate content of traditional cereal-based African fermented food. *Food Microbiology*, 62, 169-177.
- Guarner, F., Khan, A. G., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., Krabshuis J., Lemair T., Kaufmann P., Fedorak M., Shanahan F., Sanders M. E., Szajewska H., Ramakrishna B., Balakrishnan S., Karakan T., and Kim, N. (2012). World gastroenterology organisation global guidelines: probiotics and prebiotics october 2011. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 46(6), 468-481.
- Guarro, J., Gené, J., and Stchigel, A. M. (1999). Developments in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(3), 454-500.
- Gürgün, H. ve Halkman, A. K. (1990). *Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri* (İkinci Baskı).
- Harrigan W. F., and McCance M., E. (1976). *Laboratory Methods in Food and Dairy*
- Haspolat, I. (2012). Genetiği değiştirilmiş organizmalar ve biyogüvenlik. *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 59, 75-80.
- Heim, A., Kamionowska, U., and Solecki, M. (2007). The effect of microorganism concentration on yeast cell disruption in a bead mill. *Journal of Food Engineering*, 83(1), 121-128.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli L., Canani, R.B., Flint H.C., Salminen S., and Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology and hepatology*, 11(8), 506.
- Hongpattarakere, T., Cherntong, N., Wichienchot, S., Kolida, S., and Rastall, R. A. (2012). *In vitro* prebiotic evaluation of exopolysaccharides produced by marine isolated lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 846-852.
- Huebner, J., Wehling, R. L., and Hutkins, R. W. (2007). Functional activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*, (17), 770-775
- Hui, Y. H., Meunier-Goddik, L., Josephsen, J., Nip, W. K., and Stanfield, P. S. (2004). *Handbook Of Food And Beverage Fermentation Technology* (Vol. 134). CRC Press.
- Hunter Jr, K. W., Gault, R. A., and Berner, M. D. (2002). Preparation of microparticulate β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation. *Letters In Applied Microbiology*, 35(4), 267-271.

- Hurst, C. J. (2016). *The Rasputin effect: when commensals and symbionts become parasitic* (Vol. 3). Springer.
- Ibeas, J. I., Lee, H., Damsz, B., Prasad, D. T., Pardo, J. M., Hasegawa, P. M., Bressan R. A., and Narasimhan, M. L. (2000). Fungal cell wall phosphomannans facilitate the toxic activity of a plant PR-5 protein. *The Plant Journal*, 23(3), 375-383.
- Ishimoto, Y., Ishibashi, K. I., Yamanaka, D., Adachi, Y., Kanzaki, K., Iwakura, Y., and Ohno, N. (2018). Production of low-molecular weight soluble yeast β -glucan by an acid degradation method. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 2269-2278.
- Ishimoto, Y., Ishibashi, K. I., Yamanaka, D., Adachi, Y., Kanzaki, K., Okita, K., Iwakura Y., and Ohno, N. (2017). Modulation of an innate immune response by soluble yeast β -glucan prepared by a heat degradation method. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 367-376.
- Jacob, F. F., Hutzler, M., and Methner, F. J. (2019). Comparison of various industrially applicable disruption methods to produce yeast extract using spent yeast from top-fermenting beer production: influence on amino acid and protein content. *European Food Research and Technology*, 245(1), 95-109.
- Jaehrig, S. C., Rohn, S., Kroh, L. W., Wildenauer, F. X., Lisdat, F., Fleischer, L. G., and Kurz, T. (2008). Antioxidative activity of $(1 \rightarrow 3)$, $(1 \rightarrow 6)$ - β -D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* grown on different media. *LWT-Food Science and Technology*, 41(5), 868-877.
- Javmen, A., Grigiškis, S., and Gliubutė, R. (2012). β -glucan extraction from *Saccharomyces cerevisiae* yeast using *Actinomyces rutgersensis* 88 yeast lyzing enzymatic complex. *Biologija*, 58(2).
- Jayachandran, M., Chen, J., Chung, S. S. M., and Xu, B. (2018). A critical review on the impacts of β -glucans on gut microbiota and human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 61, 101-110.
- Jigami, Y., and Odani, T. (1999). Mannosylphosphate transfer to yeast mannan. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1426(2), 335-345.
- Johnson, E. A., and Echavarri-Erasun, C. (2011). Yeast biotechnology. *The Yeasts*. 21-44.
- 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(6), 713-719.
- Jung, K., Ha, Y., Ha, S. K., Han, D. U., Kim, D. W., Moon, W. K., and Chae, C. (2004). Antiviral effect of *Saccharomyces cerevisiae* β -glucan to swine influenza virus by increased production of interferon- γ and nitric oxide. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 51(2), 72-76.

- Kanmani, P., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukumar, V., and Arul, V. (2011). Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity in vitro. *Bioresource Technology*, 102(7), 4827-4833.
- Kapur, N. K., Ashen, D., and Blumenthal, R. S. (2008). High density lipoprotein cholesterol: an evolving target of therapy in the management of cardiovascular disease. *Vascular Health And Risk Management*, 4(1), 39.
- Kath, F., and Kulicke, W. M. (1999). Mild enzymatic isolation of mannan and glucan from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, 268(1), 59-68.
- Kerry, R. G., Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H. S., and Das, G. (2018). Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(3), 927-939.
- Khan, A. A., Gani, A., Masoodi, F. A., Âmin, F., Wani, I. A., Khanday, F. A., and Gani, A. (2016). Structural, thermal, functional, antioxidant and antimicrobial properties of β -d-glucan extracted from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Effect of γ -irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 140, 442-450.
- Khoomrung, S., Chumnannuen, P., Jansa-Ard, S., Nookaew, I., and Nielsen, J. (2012). Fast and accurate preparation fatty acid methyl esters by microwave-assisted derivatization in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(6), 1637-1646.
- Kim, G. B., Seo, Y. M., Kim, C. H., and Paik, I. K. (2011). Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. *Poultry Science*, 90, 75-82.
- Kim, H. L., Lee, J. H., Lee, M. H., Kwon, B. J., and Park, J. C. (2012). Evaluation of electrospun (1, 3)-(1, 6)- β -D-glucans/biodegradable polymer as artificial skin for full-thickness wound healing. *Tissue Engineering Part A*, 18(21-22), 2315-2322.
- Kim, Y. T., Kim, E. H., Cheong, C., Williams, D. L., Kim, C. W., and Lim, S. T. (2000). Structural characterization of β -D-(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 6)-linked glucans using NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 328(3), 331-341.
- Klis F. M., Boorsma A., De Groot P. W. J. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, 23, 185-202.
- Klis, FM., Mol P., Hellingwerf K., Brul S. (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 239-256.
- Kobayashi, H., Yoshida, R., Kanada, Y., Fukuda, Y., Yagyu, T., Inagaki, K., Kondo, T., Kurita, N., Suzuki, M., Kanayama, N., and Terao, T. (2005). Suppressing effects of daily oral supplementation of beta-glucan extracted from *Agaricus blazei* Murill on spontaneous and peritoneal disseminated metastasis in mouse model. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 131(8), 527-538.

- Kofuji, K., Huang, Y., Tsubaki, K., Kokido, F., Nishikawa, K., Isobe, T., and Murata, Y. (2010). Preparation and evaluation of a novel wound dressing sheet comprised of β -glucan–chitosan complex. *Reactive and Functional Polymers*, 70(10), 784-789.
- Korolenko, T. A., Bgatova, N. P., and Vetvicka, V. (2019). Glucan and mannan two peas in a pod. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3189.
- Kot, A. M., Gientka, I., Bzducha-Wróbel, A., Błażej, S., and Kurcz, A. (2020). Comparison of simple and rapid cell wall disruption methods for improving lipid extraction from yeast cells. *Journal of Microbiological Methods*, 176, 105999.
- Kremmyda, A., MacNaughtan, W., Arapoglou, D., Eliopoulos, C., Metafa, M., Harding, S. E., and Israilides, C. (2021). The detection, purity and structural properties of partially soluble mushroom and cereal β -D-glucans: A solid-state NMR study. *Carbohydrate Polymers*, 266, 118103.
- Kumar, M. N. R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46(1), 1-27.
- Langlands, S. J., Hopkins, M. J., Coleman, N., and Cummings, J. H. (2004). Prebiotic carbohydrates modify the mucosa associated microflora of the human large bowel. *Gut*, 53(11), 1610-1616.
- Laroche, C., and Michaud, P. (2007). New developments and prospective applications for β (1, 3) glucans. *Recent Patents on Biotechnology*, 1(1), 59-73.
- Leathers, T. D., Nunnally, M. S., and Price, N. P. (2006). Co-production of schizophyllan and arabinoxylan from corn fiber. *Biotechnology Letters*, 28(9), 623-626.
- Legras, J. L., Merdinoglu, D., Cornuet, J. M., and Karst, F. (2007). Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular Ecology*, 16(10), 2091-2102.
- Lesage G., Bussey H. (2006). Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiol Molecular Biology Review*, 70, 317-343,
- Levitz, S. (2014). β -Glucan particles as a vaccine platform with intrinsic adjuvanticity (469.3). *The FASEB Journal*, 28, 469-473.
- Lipke P. N., Ovalle R. (1998). Minireview: Cell wall architecture in yeast: New structure and new challenge, *Journal of Bacteriology*, 180, 15, 3735-3740.
- Liu, D. Q., Ren, F. Z., and Li, J. M. (2019). Study on the hypoglycemic activity of several tea glucans. *Teaching Science*, 39(6), 652-660.
- Liu, D., Ding, L., Sun, J., Boussetta, N., and Vorobiev, E. (2016). Yeast cell disruption strategies for recovery of intracellular bio-active compounds. A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 36, 181-192.

- Liu, G., Yu, L., Martínez, Y., Ren, W., Ni, H., Abdullah Al-Dhabi, N., Duraipandiyar, V., and Yin, Y. (2017). Dietary *Saccharomyces cerevisiae* cell wall extract supplementation alleviates oxidative stress and modulates serum amino acids profiles in weaned piglets. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017.
- Liu, N., Wang, J., Liu, Z., Wang, Y., and Wang, J. (2018). Effect of supplemental yeast cell walls on growth performance, gut mucosal glutathione pathway, proteolytic enzymes and transporters in growing broiler chickens. *Journal of Animal Science*, 96(4), 1330-1337.
- Liu, R., Wang, N., Li, Q., and Zhang, M. (2015). Comparative studies on physicochemical properties of raw and hydrolyzed oat β -glucan and their application in low-fat meatballs. *Food Hydrocolloids*, 51, 424-431.
- Liu, X. Y., Wang, Q., Cui, S. W., and Liu, H. Z. (2008). A new isolation method of β -D-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Hydrocolloids*, 22(2), 239-247.
- Liu, Y., and Huang, G. (2018). The derivatization and antioxidant activities of yeast mannan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 755-761.
- Liu, Y., Wu, Q., Wu, X., Algharib, S. A., Gong, F., Hu, J., Luo, W., Zhou, M., Pan, Y., Yan, Y., and Wang, Y. (2021). Structure, preparation, modification, and bioactivities of β -glucan and mannan from yeast cell wall: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 173, 45-456.
- Lo, T. C. T., Chang, C. A., Chiu, K. H., Tsay, P. K., and Jen, J. F. (2011). Correlation evaluation of antioxidant properties on the monosaccharide components and glycosyl linkages of polysaccharide with different measuring methods. *Carbohydrate Polymers*, 86(1), 320-327.
- Macfarlane, G. T., Steed, H., and Macfarlane, S. (2008). Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 104(2), 305-344.
- Maehara, Y., Tsujitani, S., Saeki, H., Oki, E., Yoshinaga, K., Emi, Y., Morita, M., Kohnoe, S., Kakeji, Y., Yano, T., and Baba, H. (2012). Biological mechanism and clinical effect of protein-bound polysaccharide K (KRESTIN®): review of development and future perspectives. *Surgery Today*, 42(1), 8-28.
- Magnani, M., Calliari, C. M., de Macedo Jr, F. C., Mori, M. P., de Syllos Cólus, I. M., and Castro-Gomez, R. J. (2009). Optimized methodology for extraction of (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* and *in vitro* evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of the corresponding carboxymethyl derivative. *Carbohydrate Polymers*, 78(4), 658-665.
- Magnelli, P., Cipollo, J. F., and Abeijon, C. (2002). A refined method for the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and β -1, 6-glucan fine structure. *Analytical Biochemistry*, 301(1), 136-150.

- Mantovani, M. S., Bellini, M. F., Angeli, J. P. F., Oliveira, R. J., Silva, A. F., and Ribeiro, L. R. (2008). β -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 658(3), 154-161.
- Marinescu, G., and Stoicescu, A. (2009). Researches concerning the preparation of spent brewer's yeast β -glucans. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 15(4), 547-553.
- Mayell, M. (2001). Maitake extracts and their therapeutic potential-a review. *Alternative Medicine Review*, 6(1), 48-60.
- Melendres, A. V., Honda, H., Shiragami, N., and Unno, H. (1993). Enzyme release kinetics in a cell disruption chamber of a bead mill. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 26(2), 148-152.
- Mendes-Costa, M. C., and Moraes, W. B. C. (1999). Comparação entre os teores de carboidratos totais solúveis presentes em distintas frações da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Meyen. *Revista Brasileira de Biologia*, 59(1), 1-9.
- Methacanon, P., Weerawatsophon, U., Tanjak, P., Rachtawee, P., and Prathumpai, W. (2011). Interleukin-8 stimulating activity of low molecular weight β -glucan depolymerized by γ -irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 86(2), 574-580.
- Moon, J. S., Shin, S. Y., Choi, H. S., Joo, W., Cho, S. K., Li, L., Kang, J. H., Kim, R. J., and Han, N. S. (2015). In vitro digestion and fermentation properties of linear sugar-beet arabinan and its oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 131, 50-56.
- Moukadiri, I., Jaafar, L., and Zueco, J. (1999). Identification of two manoproteins released from cell walls of a *Saccharomyces cerevisiae* Mnn1 Mnn9 double mutant with reducing agents. *Journal of Bacteriology*, 181 (16), 4741-4745.
- Mueller, A., Mayberry, W., Acuff, R., Thedford, S., Browder, W., and Williams, D. (1994). Lipid content of microparticulate (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbios*, 79(321), 253-261.
- Murphy, E. J., Rezoagli, E., Major, I., Rowan, N. J., and Laffey, J. G. (2020). β -glucan metabolic and immunomodulatory properties and potential for clinical application. *Journal of Fungi*, 6(4), 356.
- Muta, T. (2006). Molecular basis for invertebrate innate immune recognition of (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan as a pathogen-associated molecular pattern. *Current Pharmaceutical Design*, 12(32), 4155-4161.
- Müller, A., Ensley, H., Pretus, H., McNamee, R., Jones, E., McLaughlin, E., Chandley, W., Browder, W., Lowman, D., and Williams, D. (1997). The application of various protic acids in the extraction of (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydrate Research*, 299(3), 203-208.

- Oberoi, H. S., Babbar, N., Sandhu, S. K., Dhaliwal, S. S., Kaur, U., Chadha, B. S., and Bhargava, V. K. (2012). Ethanol production from alkali-treated rice straw via simultaneous saccharification and fermentation using newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(4), 557-566.
- Osumi M. (1998) The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron* 29, 207–233.
- Palframan, R., Gibson, G. R., and Rastall, R. A. (2003). Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. *Letters in Applied Microbiology*, 37(4), 281-284.
- Pandya, U., Dhuldhaj, U., and Sahay, N. S. (2019). Bioactive mushroom polysaccharides as antitumor: an overview. *Natural Product Research*, 33(18), 2668-2680.
- Papaspyridi, L. M., Zerva, A., and Topakas, E. (2018). Biocatalytic synthesis of fungal β -glucans. *Catalysts*, 8(7), 274.
- Patel, S. (2012). Therapeutic importance of sulfated polysaccharides from seaweeds: updating the recent findings. *Biotech*, 2(3), 171-185.
- Petravic-Tominac, V., Zechner-Krpan, V., Berkovic, K., Galovic, P., Herceg, Z., Srećec, S., and Spoljaric, I. (2011). Rheological properties, water-holding and oil-binding capacities of particulate [beta]-glucans isolated from spent brewer's yeast by three different procedures. *Food Technology and Biotechnology*, 49(1), 56.
- Petravić-Tominac, V., Zechner-Krpan, V., Grba, S., Srećec, S., Panjkota-Krbavčić, I., and Vidović, L. (2010). Biological effects of yeast β -glucans. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 75(4), 149-158.
- Pham-Huy, L. A., He, H., and Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science: IJBS*, 4(2), 89.
- 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(5), 292-292.
- Plavcová, Z., Šalamúnová, P., Saloň, I., Štěpánek, F., Hanuš, J., and Hošek, J. (2019). Curcumin encapsulation in yeast glucan particles promotes its anti-inflammatory potential in vitro. *International journal of pharmaceuticals*, 568, 118532.
- Powell, C. D., Van Zandycke, S. M., Quain, D. E., and Smart, K. A. (2000). Replicative ageing and senescence in *Saccharomyces cerevisiae* and the impact on brewing fermentations. *Microbiology*, 146(5), 1023-1034.
- Probert, H. M., and Gibson, G. R. (2002). Investigating the prebiotic and gas-generating effects of selected carbohydrates on the human colonic microflora. *Letters in Applied Microbiology*, 35(6), 473-480.

- Qvirist, L., Vorontsov, E., Veide Vilg, J., and Andlid, T. (2017). Strain improvement of *Pichia kudriavzevii* TY13 for raised phytase production and reduced phosphate repression. *Microbial Biotechnology*, 10(2), 341-353.
- Rahar, S., Swami, G., Nagpal, N., Nagpal, M. A., and Singh, G. S. (2011). Preparation, characterization, and biological properties of β -glucans. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, 2(2), 94.
- Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., and Kumar, M. R. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 113(3), 189-207.
- Reynolds, T. B., and Fink, G. R. (2001). Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science*, 291(5505), 878-881.
- Robak, J., and Gryglewski, R. J. (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical Pharmacology*, 37(5), 837-841.
- Roberfroid, M. B. (2000). Chicory fructooligosaccharides and the gastrointestinal tract. *Nutrition*, 16(7-8), 677-679.
- Saber, A., Alipour, B., and Faghfoori, Z. (2017). A. Mousavi jam, and A. Yari Khosroushahi, Secretion metabolites of probiotic yeast, *Pichia kudriavzevii* AS-12, induces apoptosis pathways in human colorectal cancer cell lines. *Nutrition Research*, 41, 36-46.
- Saber, A., Alipour, B., Faghfoori, Z., and Yari Khosroushahi, A. (2016). Cellular and molecular effects of yeast probiotics on cancer. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(1), 96-115.
- Sarikaya, H., Aslim, B., and Yuksekdog, Z. (2017). Assessment of anti-biofilm activity and bifidogenic growth stimulator (BGS) effect of lyophilized exopolysaccharides (l-EPSs) from Lactobacilli strains. *International Journal of Food Properties*, 20(2), 362-371.
- Sauter, M., Freimund, S., Dutler, H., Kappeli, O., Al-Ghazawi, A., Schwarz, E., and Schoberl, H. (2004). *U.S. Patent Application No. 10/343,604*.
- Selvaraj, V., Sampath, K., and Sekar, V. (2005). Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 19(4), 293-306.
- Shah, A., Gani, A., Masoodi, F. A., Wani, S. M., and Ashwar, B. A. (2017). Structural, rheological and nutraceutical potential of β -glucan from barley and oat. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 10, 10-16.
- Shahinian, S., and Bussey, H. (2000). β -1, 6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 35(3), 477-489.

- Shi, Y., Liu, J., Yan, Q., You, X., Yang, S., and Jiang, Z. (2018). *In vitro* digestibility and prebiotic potential of curdlan (1 $\rightarrow$ 3)- β -d-glucan oligosaccharides in *Lactobacillus* species. *Carbohydrate Polymers*, 188, 17-26.
- Shen, L., Wang, X., Wang, Z., Wu, Y., and Chen, J. (2008). Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods. *Food Chemistry*, 107(2), 929-938.
- Shirvan, A. R., Shakeri, M., and Bashari, A. (2019). Recent advances in application of chitosan and its derivatives in functional finishing of textiles. *The Impact and Prospects of Green Chemistry for Textile Technology*, 107-133.
- Sima, P., Vannucci, L., and Vetvicka, V. (2018). β -glucans and cholesterol. *International Journal of Molecular Medicine*, 41(4), 1799-1808.
- Singla, V. and Chakkaravarthi, S. (2017). Applications of prebiotics in food industry: A review. *Food Science and Technology International*, 23(8), 649-667.
- Siwicki, A. K., Kazuń, K., Głąbski, 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(Suppl. 2), 59-61.
- Soto, E., Kim, Y. S., Lee, J., Kornfeld, H., and Ostroff, G. (2010). Glucan particle encapsulated rifampicin for targeted delivery to macrophages. *Polymers*, 2(4), 681-689.
- Speers, A., and Forbes, J. (2015). Yeast: an overview. In *Brewing Microbiology*, 3-9.
- Steinkraus, K. (2004). Industrialization of indigenous fermented foods, revised and expanded. CRC Press.
- Stone, B. A. (2009). Chemistry of β -glucans. In *Chemistry, Biochemistry and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides* (pp. 5-46). Academic Press.
- Straathof, A. J., and Adlercreutz, P. (Eds.). (2000). *Applied biocatalysis*. CRC Press.
- Strasser, S., Neureiter, M., Geppl, M., Braun, R., and Danner, H. (2009). Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 107(1), 167-177.
- Sugiharto, S. (2016). Role of nutraceuticals in gut health and growth performance of poultry. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 15(2), 99-111.
- Tang, Q., Huang, G., Zhao, F., Zhou, L., Huang, S., and Li, H. (2017). The antioxidant activities of six (1 $\rightarrow$ 3)- β -d-glucan derivatives prepared from yeast cell wall. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 216-221.

- Thammakiti, S., Supphantharika, M., Phaesuwan, T., and Verduyn, C. (2004). Preparation of spent brewer's yeast β -glucans for potential applications in the food industry. *International Journal of Food Science and Technology*, 39(1), 21-29.
- Thanardkit, P., Khunrae, P., Supphantharika, M., and Verduyn, C. (2002). Glucan from spent brewer's yeast: preparation, analysis and use as a potential immunostimulant in shrimp feed. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(6), 527-539.
- Tofalo, R., Perpetuini, G., Schirone, M., and Suzzi, G. (2016). *Encyclopedia of Food and Health*.
- Tungland, B. C., and Meyer, D. (2002). Nondigestible oligo-and polysaccharides (Dietary Fiber): their physiology and role in human health and food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1(3), 90-109.
- Ulber, R., and Soye, K. (2004). From wine to penicillin-5000 years of biotechnology. *Chemie in Unserer Zeit*, 38(3), 172-180.
- Van Loo, J. (2006). Inulin-type fructans as prebiotics. *Prebiotics: Development and Application*, 57-100.
- Vegas, R., Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J. C., Álvarez, J. R., and Luque, S. (2006). Purification of oligosaccharides from rice husk autohydrolysis liquors by ultra- and nano-filtration. *Desalination*, 199(1-3), 541-543.
- Venkatachalam, G., Gummadi, S., and Doble, M. (2012). Cyclic β -glucans from microorganisms: production, properties and applications.
- Vetvicka, V. (2002). Pilot study: orally-administered yeast β 1, 3-glucan prophylactically protects against anthrax infection and cancer in mice. *Journal. American Nutraceuticals Association*, 5, 16-20.
- Vetvicka, V., and Vetvickova, J. (2020). Anti-infectious and Anti-tumor Activities of β -glucans. *Anticancer Research*, 40(6), 3139-3145.
- Wang, J., Li, M., Zheng, F., Niu, C., Liu, C., Li, Q., and Sun, J. (2018). Cell wall polysaccharides: before and after autolysis of brewer's yeast. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(9), 1-8.
- Wang, J., Zhao, X., Yang, Y., Zhao, A., and Yang, Z. (2015). Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 119-126.
- Wang, Y. (2009). Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Research International*, 42(1), 8-12.
- Wang, Y., Yao, S., and Wu, T. (2003). Combination of induced autolysis and sodium hypochlorite oxidation for the production of *Saccharomyces cerevisiae* (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(9), 947-952.

- Wasser, S. P. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(3), 258-274.
- Wen, L., Lin, L., You, L., Yang, B., Jiang, G., and Zhao, M. (2011). Ultrasound-assisted extraction and structural identification of polysaccharides from *Isodon lophanthoides* var. *gerardianus* (Benth). *Carbohydrate polymers*, 85(3), 541-547.
- Wheatcroft, R., Kulandai, J., Gilbert, R. W., Sime, K. J., Smith, C. G., and Langeris, W. H. (2002). *U.S. Patent No. 6,444,448*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Wichienchot, S., Jatupornpipat, M., and Rastall, R. A. (2010). Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. *Food Chemistry*, 120(3), 850-857.
- Williams, S. (1984). *Official methods of analysis* (No. 630.24 A8 1984). Association of Official Analytical Chemists.
- Wong, S. T., Tan, M. C., and Geow, C. H. (2019). Optimization of ultrasound-assisted ethanol extraction of hazelnut oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(10).
- Xiao, M., Jiang, M., Wu, K., Yang, H., Ni, X., Yan, W., Philips, G. O., and Jiang, F. (2017). Investigation on curdlan dissociation by heating in water. *Food Hydrocolloids*, 70, 57-64.
- Xie, J. H., Shen, M. Y., Xie, M. Y., Nie, S. P., Chen, Y., Li, C., Huang, D. F., and Wang, Y. X. (2012). Ultrasonic-assisted extraction, antimicrobial and antioxidant activities of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 89(1), 177-184.
- Xie, W., Xu, P., and Liu, Q. (2001). Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 11(13), 1699-1701.
- Xu, Z., Chen, X., Zhong, Z., Chen, L., and Wang, Y. (2011). *Ganoderma lucidum* polysaccharides: immunomodulation and potential anti-tumor activities. *The American journal of Chinese medicine*, 39(01), 15-27.
- Yadav, A. S., Kolluri, G., Gopi, M., Kumaragurubaran, K., Malik, S. Y., and Dhama K. (2016). Exploring alternatives to antibiotics as health promoting agents in poultry- a review. *Journal of Experimental Biology and Agriculture Sciences*, 4(3S), 368-83.
- Yan, J., Allendorf, D. J., and Brandley, B. (2005). Yeast whole glucan particle (WGP) β -glucan in conjunction with antitumor monoclonal antibodies to treat cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 5(5), 691-702.
- Yang, W., and Huang, G. (2021). Extraction methods and activities of natural glucans. *Trends in Food Science and Technology*, 50-57.

- Yuan, H., Lan, P., He, Y., Li, C., and Ma, X. (2020). Effect of the modifications on the physicochemical and biological properties of β -glucan a critical review. *Molecules*, 25(1), 57.
- Zechner-Krpan, V., Petravić-Tominac, V., Galović, P., Galović, V., Filipović-Grčić, J., and Srećec, S. (2010). Application of different drying methods on β -glucan isolated from spent brewer's yeast using alkaline procedure. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 75(1), 45-50.
- Zhang, L., Liu, C., Li, D., Zhao, Y., Zhang, X., Zeng, X., and Li, S. (2013). Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. *International Journal of Biological Macromolecules*, 54, 270-275.
- Zhang, M., Cheung, P. C., and Zhang, L. (2001). Evaluation of mushroom dietary fiber (nonstarch polysaccharides) from sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* (Fries) Singer as a potential antitumor agent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 5059-5062.
- Zheng, Y., Li, Y., and Wang, W. D. (2014). Optimization of ultrasonic-assisted extraction and *in vitro* antioxidant activities of polysaccharides from *Trametes Orientalis*. *Carbohydrate Polymers*, 111, 315-323.
- Zhou, L. B., and Chen, B. (2011). Bioactivities of water-soluble polysaccharides from Jisongrong mushroom: anti-breast carcinoma cell and antioxidant potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48(1), 1-4.
- Zhu, F., Du, B., and Xu, B. (2016). A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. *Food Hydrocolloids*, 52, 275-288.



GAZİ GELECEKTİR..