

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ \* FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***SACCHAROMYCES CEREVISIAE'DAN GLUKAN ELDESİ***

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Candan YILMAZ**

**Anabilim Dalı: Biyoloji**

**Danışman: Yard.Doç.Dr. Rezan ALKAN**

**KOCAELİ, 2010**

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ \* FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***SACCHAROMYCES CEREVISIAE'DAN GLUKAN ELDESİ***

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Candan YILMAZ**

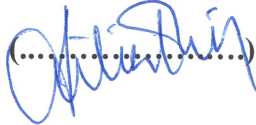
**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 09 HAZİRAN 2010**

**Tezin Savunulduğu Tarih: 12 TEMMUZ 2010**


**Tez Danışmanı  
Yrd.Doç.Dr. Rezan ALKAN**

(..........)

**Üye  
Prof.Dr. Sülün ÜSTÜN**

(..........)

**Üye  
Prof.Dr. Fazıl ÖZEN**

(..........)

**KOCAELİ, 2010**

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜRLER

Lisansüstü eğitim ve öğretimimde bilgi, beceri ve deneyimleriyle her an yanımda olan, manevi desteğini benden hiçbir koşulda esirgemeyen ve beni yönlendiren, samimiyetiyle ailemden biri gibi hissettiğim değerli Danışman Hocam Sayın Yard. Doç. Dr. Rezan ALKAN'a tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Tez çalışmamda fikirleri ve desteklerini benden esirgemeyen, ikinci danışman hocalarım olan Sayın Yard. Doç. Dr. İbrahim ÜNAL'a ve BRİSA Mikro-inceleme Laboratuvarı'nda taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülerini ve XRF kül tayinlerini yapan Sayın Fizik Yüksek Mühendisi Attila ALKAN'a teşekkürü borç bilirim. İstatistik çalışmalarında bana yol gösteren Abant İzzet Baysal Üniversitesi'ndeki değerli hocam Yard. Doç. Dr. M. Özlem ÇEVİK'e çok teşekkür ederim. Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ndeki lisans arkadaşlarım ve Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü'ndeki yüksek lisans arkadaşlarımın hepsine teşekkür ederim. Manevi destek ve yardımlarını benden esirgemeyen ve bana inanan en iyi dostlarım Serhat Celep, Ayşe San, Uğur Duzcu, Seyithan Erman, Ahmet Erden, Zuhâl Öztürk, Yaşar Noyan, Ali Erdem Gülaçar ve Salih Yılmaz'a teşekkürü bir borç bilirim.

Protein ve yağ analizlerinin yapılmasında AR-GE Laboratuvarları'nı kullanmama izin veren Körfez Yem Fabrikası'nın değerli yöneticilerine minnet duygularımı sunarım.

Beni bugünlere getiren, her türlü maddi ve manevi desteklerini üzerimde hissettiğim babam Mustafa Yılmaz'a, annem Nazmiye Yılmaz'a, ablam Canan Topaloğlu'na, eniştem Bora Topaloğlu'na, ikiz kardeşim Can Yılmaz'a ve yengem Dilek Yılmaz'a şükranlarımı sunarım.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜRLER.....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLOLAR DİZİNİ.....	vi
SİMGELER .....	vii
ÖZET .....	ix
İNGİLİZCE ÖZET .....	x
1.GİRİŞ .....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Maya Hücresi ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ).....	3
2.2.Maya Hücre Duvar Yapısının Dinamikleri.....	6
2.2.1.Kitin .....	9
2.2.2.Hücre duvar proteinleri.....	12
2.2.3.β-glukan .....	18
2.2.3.1.β-glukanın yapısal özellikleri .....	18
2.2.3.1.1.β-1,3-glukan ağı.....	19
2.2.3.1.2.β-1,6-glukan .....	21
2.2.3.2.β-glukan çeşitleri.....	22
2.2.3.2.1.Scleroglucan .....	22
2.2.3.2.2.Lentinan .....	25
2.2.3.2.3.Schizophyllan .....	28
2.2.3.3.β-glukanın kullanım alanları.....	31
2.2.3.3.1.Bağışıklığı artırıcı özelliği.....	31
2.2.3.3.2.Yem katkı maddesi olarak kullanımı.....	36
2.2.3.3.3.Mayonez yapımında kullanımı.....	42
2.2.3.3.4.Krem yapımında kullanımı.....	43
2.3.Literatür Çalışması.....	43
3.MALZEME VE YÖNTEM.....	48
3.1.Laboratuvar .....	48
3.2.Kullanılan Hammadde.....	48
3.3.Yöntem .....	48
3.3.1.Deney düzeneği.....	48
3.3.1.1.NaOH konsantrasyonunun β-glukan ekstraksiyonuna etkisi.....	48
3.3.1.2.Ekstraksiyon süresi, sıcaklığı ve yıkama sayısının etkisi.....	49
3.3.1.3.Farklı uygulamaların β-glukan ekstraksiyonuna etkisi.....	49
3.3.1.3.1.Patent uygulaması.....	49
3.3.1.3.2.Sıcak su uygulaması.....	50
3.3.1.4.Mantar ve maya β-glukanı test prosedürü (Megazyme).....	50

3.3.1.4.1. Toplam glukan miktarı ölçümü ( $\alpha$ -glukan + $\beta$ -glukan).....	50
3.3.1.4.1. $\alpha$ -glukan miktarı ölçümü.....	51
3.3.1.5. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) incelemesi.....	52
3.3.1.5.1. Numune hazırlanması.....	52
3.3.2. Analiz yöntemleri.....	52
3.3.2.1. Kuru madde tayini.....	52
3.3.2.2. XRF kül tayini.....	52
3.3.2.3. Toplam protein ölçümü (Kjeldahl protein).....	53
3.3.2.4. Toplam yağ tayini.....	53
3.3.2.5. Mantar ve maya $\beta$ -glukanı tayini (Megazyme).....	53
3.3.2.5.1. Toplam glukan miktarı tayini ( $\alpha$ -glukan + $\beta$ -glukan).....	54
3.3.2.5.2. $\alpha$ -glukan miktarı tayini.....	54
3.4. İstatistik .....	54
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	56
4.1. NaOH Konsantrasyonun $\beta$ -Glukan Ekstraksiyonuna Etkisi.....	56
4.2. Ekstraksiyon Süresi, Sıcaklığı ve Yıkama Sayısının Etkisi.....	63
4.3. Farklı Uygulamaların $\beta$ -Glukan Ekstraksiyonuna Etkisi.....	76
4.3.1. Patent uygulaması.....	76
4.4. Mantar Ve Maya $\beta$ -Glukanı Testi (Megazyme).....	85
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	90
KAYNAKLAR .....	95
ÖZGEÇMİŞ .....	105

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'nin taramalı elektron mikroskobundaki (SEM) görüntüsü.....	4
Şekil 2.2: Maya hücresinin şematik görünümü.....	5
Şekil 2.3: Maya hücre duvarının yapısı ve bileşenleri.....	6
Şekil 2.4: Kitinin molekül yapısı.....	9
Şekil 2.5: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'da kitinden oluşan tomurcuk izinin taramalı elektron mikroskobundaki (SEM) görüntüleri.....	10
Şekil 2.6: Maya hücreindeki mannanın yapısı.....	12
Şekil 2.7: Hücre duvar bileşenlerinin hücre duvarındaki konumları.....	14
Şekil 2.8: Hücre duvarındaki GPI bağlantılarının konumu.....	16
Şekil 2.9: Hücre duvarında mannoproteinlerin dağılımı.....	17
Şekil 2.10: $\beta$ -1,3-glukanın kimyasal yapısı.....	19
Şekil 2.11: $\beta$ -1,3-glukan ve $\beta$ -1,6-glukan bağlantılarının şematik gösterimi.....	21
Şekil 2.12: $\beta$ -1,6-glukanın kimyasal yapısı.....	21
Şekil 2.13: Scleroglucanın kimyasal yapısı.....	22
Şekil 2.14: Lentinanın kimyasal yapısı.....	26
Şekil 2.15: Schizophyllanın kimyasal yapısı.....	28
Şekil 2.16: Schizophyllanın heliks yapısı.....	29
Şekil 2.17: Schizophyllanın polianilin ile nanofiber yapı oluşturmasının şematik görünümü.....	30
Şekil 2.18: Glukan tarafından uyarılmış bir makrofajın kanda mikroorganizmalara saldırması.....	38
Şekil 2.19: Glukan varlığında ve yokluğunda bakterilerin, bağırsak epitel hücrelerindeki davranışı.....	39
Şekil 4.1: Farklı NaOH konsantrasyonlarındaki pH değişimleri.....	60
Şekil 4.2: Farklı NaOH konsantrasyonlarındaki protein miktarları.....	62
Şekil 4.3: Farklı NaOH konsantrasyonlarında protein giderim yüzdeleri.....	62
Şekil 4.4: Farklı sıcaklıklardaki pH değişimleri.....	66
Şekil 4.5: İki kez yıkanan örneklerin farklı uygulama sıcaklıklarındaki protein değerleri.....	67
Şekil 4.6: İki kez yıkanan gruplarda bekletme süresinin protein değerine etkisi.....	68
Şekil 4.7: Bir kez yıkanan numunelerde farklı sıcaklıkların protein giderimine etkisi.....	69
Şekil 4.8: Bir kez yıkanan numunelerde farklı bekletme sürelerinin protein miktarına etkileri.....	70
Şekil 4.9: Farklı sıcaklık uygulamalarında 1 ve 2 kez yıkanan numuneler arasındaki protein giderimi.....	71
Şekil 4.10: Farklı bekletme sürelerinde 1 ve 2 kez yıkanan numuneler arasındaki protein giderimi.....	72
Şekil 4.11: Parçalanmış maya hücrelerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü.....	74
Şekil 4.12: Parçalanmış maya hücrelerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü.....	74

Şekil 4.13: Parçalanmış maya hücrelerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü .....	75
Şekil 4.14: Parçalanmış maya hücrelerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü .....	75
Şekil 4.15: Farklı uygulamalar sonucundaki protein değerleri.....	78
Şekil 4.16: Farklı uygulamalar sonucundaki protein giderim yüzdeleri.....	78
Şekil 4.17: Farklı uygulamalar sonucundaki kül değerleri.....	81
Şekil 4.18: Farklı uygulamalar sonucundaki yağ değerleri.....	82
Şekil 4.19: Farklı uygulamalar sonucunda elde edilen $\beta$ -glukan verimi.....	84
Şekil 4.20: Numunenin farklı uygulamalar sonucundaki $\beta$ -glukan içerikleri.....	88

## TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1: Ekmek mayasının taksonomik hiyerarşisi.....	3
Tablo 2.2: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'da hücre duvar makromolekülleri, kuru ağırlık yüzdeleri ve bu makromoleküllerin sentez bölgeleri.....	8
Tablo 3.1: Araştırmada kullanılan atık ekmek mayasının ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) bileşimi.....	48
Tablo 4.1: 0.25 N NaOH konsantrasyonundaki pH değişimleri.....	57
Tablo 4.2: 0.50 N NaOH konsantrasyonundaki pH değişimleri.....	58
Tablo 4.3: 0.75 N NaOH konsantrasyonundaki pH değişimleri.....	58
Tablo 4.4: 1.00 N NaOH konsantrasyonundaki pH değişimleri.....	59
Tablo 4.5: 1.50 N NaOH konsantrasyonundaki pH değişimleri.....	59
Tablo 4.6: Farklı NaOH konsantrasyonlarında protein miktarları.....	60
Tablo 4.7: Farklı NaOH konsantrasyonlarında protein giderim yüzdeleri.....	61
Tablo 4.8: 65°C sıcaklıktaki pH değişimleri.....	64
Tablo 4.9: 70°C sıcaklıktaki pH değişimleri.....	64
Tablo 4.10: 80°C sıcaklıktaki pH değişimleri.....	65
Tablo 4.11: 85°C sıcaklıktaki pH değişimleri.....	65
Tablo 4.12: 90°C sıcaklıktaki pH değişimleri.....	66
Tablo 4.13: İki kez yıkanan örneklerin farklı uygulama sıcaklıklarındaki protein değerleri .....	67
Tablo 4.14: İki kez yıkanan gruplarda farklı bekletme sürelerindeki protein değerleri.....	68
Tablo 4.15: Bir kez yıkanan örneklerde farklı sıcaklıklardaki protein miktarları.....	69
Tablo 4.16: Bir kez yıkanan numunelerin farklı bekletme sürelerindeki protein değerleri .....	71
Tablo 4.17: Farklı sıcaklıklardaki 1 ve 2 kez yıkanan numuneler arasındaki protein giderimleri .....	72
Tablo 4.18: Farklı bekletme sürelerindeki 1 ve 2 kez yıkanan numuneler arasındaki protein giderim yüzdeleri.....	72
Tablo 4.19: Farklı uygulamalar sonucundaki protein değerleri.....	77
Tablo 4.20: Farklı uygulamalar sonucundaki protein giderim yüzdeleri.....	77
Tablo 4.21: Farklı uygulamalar sonucundaki kül içerikleri.....	80
Tablo 4.22: Farklı uygulamalar sonucundaki yağ içerikleri.....	82
Tablo 4.23: Farklı uygulamalar sonucunda elde edilen $\beta$ -glukan verimi.....	83
Tablo 4.24: Farklı uygulamalar sonucundaki toplam glukan içerikleri.....	86
Tablo 4.25: Farklı uygulamalar sonucundaki $\alpha$ -glukan içerikleri.....	86
Tablo 4.26: Farklı uygulamalar sonucundaki $\beta$ -glukan içerikleri.....	87



## SİMGELER

$\bar{x}$	: Aritmetik ortalama
Da	: Dalton
rpm	: Dakika başına devir sayısı (Revolutions per minute)
g	: Gram
kHz	: Kiloherzt
l	: Litre
ml	: mililitre
mg	: Miligram
mM	: Milimolar
$\mu\text{g}$	: Mikrogram
$\mu\text{m}$	: Mikrometre
ppm	: Milyonda bir birim
M	: Molarite
nm	: Nanometre
N	: Normalite
Pa	: Pascal
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrad derece
SH	: Standart hata

## KISALTMALAR

$\text{Al}_2\text{O}_3$	: Alüminyum oksit
$\text{CH}_3\text{COOH}$	: Asetik asit
$\text{Cu}_2\text{O}$	: Bakır (2) oksit
BaO	: Baryum oksit
$\text{CuSO}_4$	: Bakır sülfat
ZnO	: Çinko oksit
$\text{Fe}_2\text{O}_3$	: Demir (2) oksit
$\text{Cl}_2\text{O}$	: Diklor monoksit
LDL	: Düşük yoğunlukta lipoprotein (Low density lipoprotein)
$\text{P}_2\text{O}_5$	: Fosfor pentaoksit
HCOOH	: Formik asit
$\text{H}_2\text{O}_2$	: Hidrojen peroksit
HCl	: Hidroklorik asit
$\text{H}_3\text{PO}_4$	: Fosforik asit
C	: Karbon
$\text{CaCl}_2$	: Kalsiyum klorür
CaO	: Kalsiyum oksit
$\text{Cr}_2\text{O}_3$	: Krom oksit
$\text{SO}_3$	: Kükürt trioksit
MgO	: Magnezyum oksit
$\text{MnO}_2$	: Manganez dioksit

Mak	: Maksimum
Min	: Minimum
KOH	: Potasyum hidroksit
K <sub>2</sub> O	: Potasyum oksit
SiO <sub>2</sub>	: Silikon dioksit
SrO	: Sitroniyum oksit
NaCl	: Sodyum klorür
NaClO	: Sodyum hipoklorit
NaOH	: Sodyum hidroksit
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	: Sodyum sülfat
NH <sub>2</sub>	: Amin
n	: Tekrarlanan çalışma sayısı
TiO <sub>2</sub>	: Titanyum dioksit
ZrO <sub>2</sub>	: Zirkonyum oksit
65°C 30dk	: 65°C sıcaklıkta 30 dakika bekletilen numune
65°C 60dk	: 65°C sıcaklıkta 60 dakika bekletilen numune
65°C 90dk	: 65°C sıcaklıkta 90 dakika bekletilen numune
70°C 30dk	: 70°C sıcaklıkta 30 dakika bekletilen numune
70°C 60dk	: 70°C sıcaklıkta 60 dakika bekletilen numune
70°C 90dk	: 70°C sıcaklıkta 90 dakika bekletilen numune
80°C 30dk	: 80°C sıcaklıkta 30 dakika bekletilen numune
80°C 60dk	: 80°C sıcaklıkta 60 dakika bekletilen numune
80°C 90dk	: 80°C sıcaklıkta 90 dakika bekletilen numune
85°C 30dk	: 85°C sıcaklıkta 30 dakika bekletilen numune
85°C 60dk	: 85°C sıcaklıkta 60 dakika bekletilen numune
85°C 90dk	: 85°C sıcaklıkta 90 dakika bekletilen numune
90°C 30dk	: 90°C sıcaklıkta 30 dakika bekletilen numune
90°C 60dk	: 90°C sıcaklıkta 60 dakika bekletilen numune
90°C 90dk	: 90°C sıcaklıkta 90 dakika bekletilen numune
O.M.H.	: Otoklavlanmış maya hücresi
0.5N.90.60dk.2kz.	: 0.50 N NaOH konsantrasyonunda 90°C sıcaklıkta 60 dakika bekletilip 2 kez yıkanmış numune
0.5N.90.60dk.P.A.S.	: 0.50 N NaOH konsantrasyonunda 90°C sıcaklıkta 60 dakika bekletilip patent prosesinin alkol basamağından sonra alınmış numune
0.5N.90.60dk.P.	: 0.50 N NaOH konsantrasyonunda 90°C sıcaklıkta 60 dakika bekletilip patent prosesi uygulanmış numune
0.5N.O.2kz.	: 0.50 N NaOH konsantrasyonunda otolizlenip 2 kez yıkanmış numune
1.5N.P.	: Patent prosesi uygulanmış numune
1.5N.2kz.	: 1.50 N NaOH konsantrasyonunda otoklavlanmış numune

## **SACCHAROMYCES CEREVISIAE'DAN GLUKAN ELDESİ**

**Candan YILMAZ**

**Anahtar kelimeler:** *Saccharomyces cerevisiae*, NaOH, protein, yağ, kül,  $\beta$ -glukan, saflaştırma

**ÖZET:** Bu çalışmada atık ekmek mayası *Saccharomyces cerevisiae*'dan  $\beta$ -glukan izolasyonu ve saflaştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, atık ekmek mayasına farklı NaOH konsantrasyonları (0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.50 N), ekstraksiyon sıcaklığı (65, 70, 80, 85, 90°C), süresi (30, 60, 90 dakika) ve yıkama sayıları değiştirilerek protein giderimi en iyi olan yöntem belirlenmiş ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri çekilmiştir. Seçilen yöntemle farklı uygulamaların protein giderimleri karşılaştırılmış, en düşük protein değerini veren uygulamalar arasında kül, yağ ve verim değerleri kıyaslanmıştır. Tüm farklı uygulamalar için  $\beta$ -glukan değerleri tespit edilmiş ve saflık oranları değerlendirilmiştir.

Sabit sıcaklık ve süredeki hücre parçalanması sonucunda kontrol ve 0.25 N NaOH konsantrasyonlu gruplar ve diğerlerinin protein değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmıştır. Endüstriyel boyutta  $\beta$ -glukan eldesinin yapılacağı düşünüldüğünde, maliyet faktörleri de göz önüne alındığında 0.50 N NaOH konsantrasyonu en uygun konsantrasyon olarak seçilmiştir. Daha fazla protein giderimi için 0.50 N NaOH konsantrasyonu sabit tutularak farklı sıcaklık, süre ve yıkama işlemleri uygulanmıştır. Sıcaklık, bekletme süresi ve yıkama sayısı arttıkça protein değerinin düştüğü görülmüştür. 90°C sıcaklıkta 2 kez yıkayıp 60 dakika bekletilen grubun optimum protein giderimini sağladığı tespit edilmiştir. Farklı uygulamalar sonucunda ise kontrol grubuna göre tüm protein değerlerindeki değişim anlamlı bulunmuştur. 0.50 N NaOH konsantrasyonunda 90°C sıcaklıkta 60 dakika bekletilmiş grup en yüksek yağ (% 13.01) ve verim (%10.29) oranlarına sahipken patent prosesi uygulanmış grubun bu değerlerinin (yağ; %4.62 ve verim; %6.29) düşük olduğu tespit edilmiştir. Aksine kül miktarındaki en yüksek orana (%5.6) patent prosesi uygulanmış grupta rastlanmıştır. Kontrolde %20.35 olarak belirlenen  $\beta$ -glukan değeri otolizlenmiş grup hariç uygulama çeşidine göre farklılık göstermiştir. 0.50 N NaOH konsantrasyonunda otolizlenmiş grubun  $\beta$ -glukan miktarı en yüksek iken (%57.69) sadece otolizlenmiş grupta en düşük (%22.91) olarak görülmüştür.

Ekmek mayasından  $\beta$ -glukanın izolasyonunda NaOH konsantrasyonu, ekstraksiyon sıcaklığı, süresi, yıkama sayısı ve uygulama basamaklarına göre protein içeriğinin ve dolayısıyla da  $\beta$ -glukan saflığının değiştiği tespit edilmiştir.

## EXTRACTION OF GLUCAN FROM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Candan YILMAZ

**Key words:** *Saccharomyces cerevisiae*, NaOH, protein, lipid, ash,  $\beta$ -glucan, purification

**SUMMARY:** In this study, isolation and purification of  $\beta$ -glucan from waste baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* is aimed. For this purpose, the best method for protein elimination is determined by altering NaOH concentration (0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.50 N), extraction temperature (65, 70, 80, 85, 90°C), period (30, 60, 90 minutes) and the number of elution were determined and the images of scanning electron microscope (SEM) were taken. With the chosen method, protein eliminations of different applications were compared. Then the ash, lipid and yield values were compared among the applications in which the least protein values were provided. For all different applications,  $\beta$ -glucan values were determined and purity ratios were evaluated.

With the result of cell deterioration in stable heat and period, a statistical meaningful change is found between control group and the groups with 0.25 N NaOH concentrations and others' protein values. Considering making  $\beta$ -glucan output in industrial size, and cost factors, 0.50 N NaOH concentration was chosen as the most suitable concentration. For more protein elimination, different temperature, period and elution processes were applied with stable 0.50 N NaOH concentrations. It is seen that when temperature, extraction time and elution numbers were increased, protein values were decreased. The group which was kept 60 minutes after 2 times elution at 90°C were chosen as the most suitable sample. As the result of different application results, according to control group, the change of all protein values were found meaningful. The group that were kept 60 minutes at 90°C within 0.50 N NaOH concentrations the highest lipid ratio (13.01 %) and highest yield ratio (10.29 %), The value of the groups in which patent process is applied were found low (lipid; 4.62 % and yield; 6.29 %). On the contrary, the highest ratio (5.6 %) in ash quantity is found in the group that patent process was applied.  $\beta$ -glucan value that was defined as 20.35 % in the control showed differences according to application types except for autolyzated group. While the  $\beta$ -glucan quantity was the highest (57.69 %) in autolyzated group with 0.50 N NaOH concentrations, it was seen as the least (22.91 %) in only autolyzated group.

In the isolation of  $\beta$ -glucan from baker's yeast, it is seen that protein ingredients and therefore  $\beta$ -glucan purity are changed according to NaOH concentration, extraction temperature, period, and number of elution and application steps.

## 1. GİRİŞ

Gıda maddelerinin başlıca işlevi organizmanın metabolik gereksinimleri için gerekli maddeleri sağlamaktır. Ancak, besinler metabolik aktivitelerimiz için gerekli makro- ve mikrobeyicilerden başka sağlığımız üzerinde olumlu etkilere sahip bileşenler de içermektedir. Son yıllardaki bilimsel çalışmalar beslenme ve hastalıklar arasındaki ilişkiyi açık bir şekilde ortaya koymuş olup, epidemiyolojik çalışmalar beslenmenin kronik hastalıkların önlenmesindeki rolüne işaret etmektedir. Beslenme alışkanlıklarının genellikle sebze, meyve ve tahıl tüketecek şekilde değiştirilmesi kronik hastalıkların önlenmesinde etkin ve pratik bir çözümdür. Tedaviden ziyade önleyici yaklaşımların üstün tutulmasının daha etkili olduğu düşünülmektedir.

Son yıllarda bazı besinlerin doğal yollardan hastalıkların önlenmesi ve tedavisindeki etkinliğinin bilimsel olarak ispatlanması, sağlığımızın korunmasında beslenme desteğinin önemini arttırmıştır. Bu sebeple, fonksiyonel besinler, nötrasötikler ve doğal sağlık ürünleri daha fazla tüketilir hale gelmiştir [1]. Bu ürünlerden birisi de  $\beta$ -glukandır.  $\beta$ -glukan; bakteri, maya, fungus, mantar, alg ve yüksek bitkilerin hücre duvarında bulunan bir çeşit glikoz homopolimeridir.  $\beta$ -glukanın en önemli kaynağı ise maya, özellikle de ekmek ve bira mayası *Saccharomyces cerevisiae* hücre duvarıdır. Mayalar tekhücreli funguslardır ve yüzlerce yıldır ekmek yapımı ve etanol üretiminde kullanılmaktadırlar. Son zamanlarda dünya çapındaki üretimi 2.5 milyon tonu geçmiştir. Birçok maya fabrikası mayayı sadece ekmek yapımı için değil, mekanik ya da enzimatik otoliz ile elde edilen maya özütü eldesi için de üretmektedirler. Maya özütü yüksek protein ve nükleotit içeriğinden dolayı besin katkısı ya da lezzet artırıcı olarak kullanılmaktadır [2].

Maya hücreleri kuvvetli ve sert bir hücre duvarıyla çevrili olup bileşenlerinin mayanın türüne göre değişiklik gösterdiği bilinmektedir. *Saccharomyces cerevisiae* hücre duvarının kuru ağırlığı, hücre kuru ağırlığının % 20-30'unu oluşturmaktadır. Temel olarak  $\beta$ -glukan ve mannoproteinlerden, iz miktarlarda ise kitin ve yağ

tabakasından meydana gelmektedir. *Saccharomyces cerevisiae* hücre duvarının yapısı iç ve dış tabaka olarak ikiye ayrılmaktadır. Maya hücre duvarının dış tabakasını oluşturan glikozillenmiş mannoproteinler hücre içine yabancı maddelerin girişini sınırlamaktadır. Hücre duvarının iç tabakasını ise kitin ve glukan oluşturmaktadır. Hücrenin mekanik kuvvetinden sorumlu olan, *Saccharomyces cerevisiae*'nin hücre duvarını oluşturan glukanın % 85'i  $\beta$ -1,3-glukan ve % 3'ü  $\beta$ -1,6-glukandır [3].

1940 yıllarından beri glukanın fonksiyonel uygulamaları üzerine çalışılmaktadır.  $\beta$ -glukanlar; spesifik makrofaj reseptörlerine bağlanıp onları aktive ederek makrofajları uyarma, enflamasyon, enfeksiyon, bakteri ve virüs kaynaklı hastalıkları ve tümör oluşumunu önleme, kolesterolü düşürme, radyasyonun yan etkilerini engelleme ve yaraları iyileştirme gibi biyolojik olarak aktif ve tıbbi özelliklerinden dolayı çok fazla dikkat çekmektedir. Antioksidan özelliklere ve serbest radikalleri yakalama kapasitelerine de sahiptir [3-6]. İnsanlarda kullanılmasının yanı sıra  $\beta$ -glukandan hayvan yemlerinde antibiyotiklere alternatif olarak da yararlanılmaktadır. Antibiyotiklerin düşük dozlarda yemlere katılması ile kanatlılarda performansın iyileştiğinin tespit edilmesinden beri bu bileşikler etlik piliç yetiştiriciliğinde büyütme faktörü olarak yıllardır başarı ile kullanılmaktadır. Ancak büyütme faktörü antibiyotiklerin artarak kullanımı çeşitli endişelere yol açmıştır. 1963 yılında antibiyotiğe direncin bir bakteriden diğer bir bakteriye konjugasyon yolu ile transfer edilebileceği bulunmuştur. Sonraki yıllarda sahada artan sıklıkta dirençli bakteri suşlarına rastlanması; bu suşlardan insanlarda hastalık yapabilenlerin tedavi amaçla kullanılan antibiyotiklere de çapraz direnç gösterebilecekleriyle ilgili şüphelerin artması Avrupa Birliği'nde bu maddelerden çoğunun kanatlılarda kullanımının yasaklanmasına sebep olmuştur. Getirilen yasaklar  $\beta$ -glukan gibi alternatif bileşiklere önemi arttırmıştır [7]. Ayrıca  $\beta$ -glukandan cildi koruması ve yenilemesiyle krem yapımında da yararlanılmaktadır [8-10]. Pek çok yararından dolayı bu polisakkaritin hücreden elde edilip saflaştırılması büyük önem taşımaya başlamıştır. Çalışmamız en önemli  $\beta$ -glukan kaynaklarından biri olan *Saccharomyces cerevisiae*'dan farklı NaOH konsantrasyonları ve uygulamalar kullanılarak  $\beta$ -glukanın izolasyonu ve saflaştırılması üzerine yapılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. MAYA HÜCRESİ (*Saccharomyces cerevisiae*)

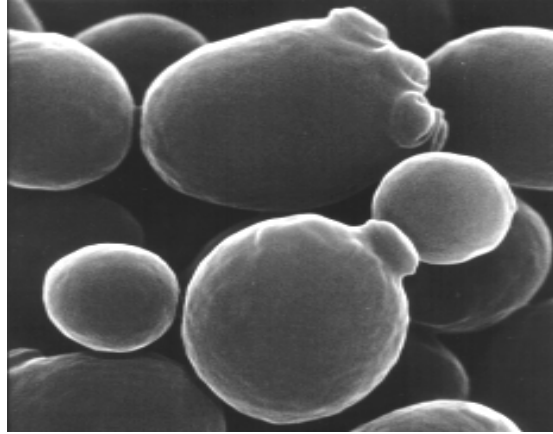
"*Saccharomyces*" sözcüğü Yunanca ve Latince'den türetilmiştir, "şeker mantarı" demektir; "*cerevisiae*" Latince "biradan" anlamına gelir. *Saccharomyces cerevisiae*, fungus ailemine ait, tomurcuklanan bir maya türüdür [11] (Tablo 2.1). Tomurcuklanmada kardeş hücrelerin ana hücredeki küçük bir delikten patlayarak oluştuğu görülmüştür (Şekil 2.1). Bazen tomurcukların ana hücreden tamamen ayrılmayıp hücre zincirleri oluşturduğu da gözlemlenmiştir [12]. Hücreleri yuvarlak veya yumurta biçimli, çapları 5–13 µm olarak kaydedilmiştir [11, 13] (Şekil 2.2).

Tablo 2.1: Ekmek mayasının taksonomik hiyerarşisi [11]

Alem	Fungus	
	Şube	Ascomycota
	Altşube	Saccharomycotina
	Sınıf	Saccharomycetes
	Takım	Saccharomycetales Kudrjanzev, 1960
	Familya	Saccharomycetacea G. Winter, 1881
	Cins	<i>Saccharomyces</i> Meyen
	Tür	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hansen, 1883

*Saccharomyces* kromozomlarının lineer çift iplikçikli DNA'dan oluştuğu bulunmuştur. Genomu ilk olarak 1996'da tamamlanmıştır [14]. Ökaryotlar arasında genom dizini ilk okunan canlıdır. Yapılan incelemeler sonunda genomunun yaklaşık 13 000 000 baz çiftinden ve 6275 genden oluştuğu, ancak bu genlerin yaklaşık 5800 tanesinin işlevsel olduğu sanılmaktadır. Maya ve insan genom dizinlerinin % 23 oranında ortak olduğu tespit edilmiştir [11]. Genetik yapısından dolayı *Saccharomyces cerevisiae* yararlı bir araştırma mikroorganizmasıdır. Örneğin;

Carnegie Mellon Üniversitesi'nde Woolford Laboratuvarı'ndaki bilim adamları bu mikroorganizmayı ribozomla ilgili genetik çalışmalar için kullanmışlardır. Bu bilimsel kaynak, hücre genetiği ve fizyolojisinin yapısı ve organizasyonu hakkında temel bilgilerin geliştirilmesinde çok önemli bir konuma sahiptir. Diğer ökaryotlar gibi 40S ribonükleoproteini 1 tane 18S rRNA ve 32 tane ribozomal proteinden oluştuğu ve bu ve diğer rRNA yapılarının tek bir 35S kopyasından geldiği ifade edilmektedir. Öncü RNA, polimeraz III tarafından kopyalanırken bu kopya polimeraz I tarafından sentezlenmiş öncü-RNA daha sonra 90S ribonükleoproteinde (RNP) paketlenmiştir. Bu işlemlerin endoribonükleaz ve ekzoribonükleaz aracılığıyla yapıldığı ispatlanmıştır. Düzenlemeden sonra, 66S partiküllerinin nükleoplazmaya salındığı, burada olgunlaştığı ve sitoplazmaya taşındığı gözlemlenmiştir. Ayrıca Woolford Laboratuvarı araştırmacıları, ribozomal altbirimlerin protein sentezindeki işlevlerinden önce de bazı basamakların olduğunu keşfettiler. RNA bölünmesi ve sürecinde olduğu gibi rRNA yapısının tekrar düzenlenmesi gibi işlemler için gerekli ribozomal olmayan bazı bileşikleri de bulmuşlardır.

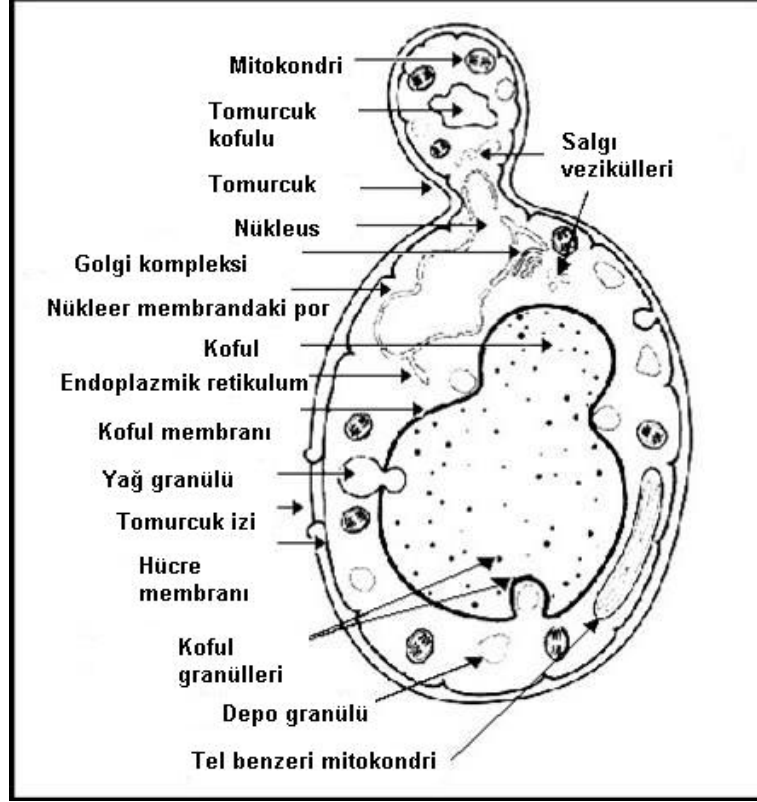


Şekil 2.1: *Saccharomyces cerevisiae*'nin taramalı elektron mikroskobundaki (SEM) görüntüsü [15]

*Saccharomyces cerevisiae* heterotrof olup, enerjisini glikozdan elde etmekte, solunum ve fermentatif metabolizmaların ikisini de kullanmaktadır. Glikozun % 2'sinin hücre materyali yapımında kullanıldığı, % 98'inin ise fermentasyon sırasında metabolize edildiği bulunmuştur. Bununla beraber anaerobik metabolizma daha fazla



enerji vermekte, böylece glikozun % 10'u hücre materyaline dönüştürülebilmektedir. Bu olay pasteur etkisi olarak bilinmektedir [14].

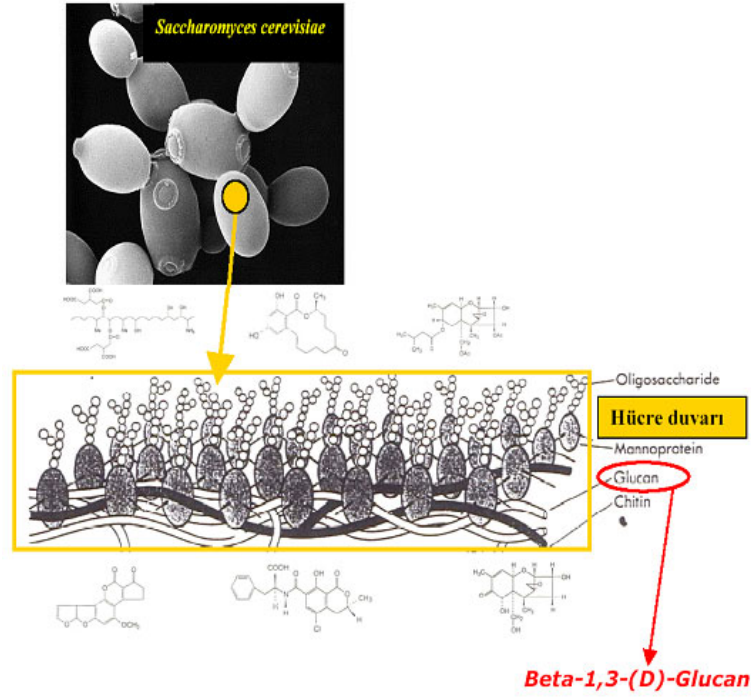


Şekil 2.2: Maya hücresinin şematik görünümü [16]

Maya yıllardır ekmek yapımı ve etanol üretiminde kullanılmaktadır. Son zamanlarda dünya çapındaki üretimi 2.5 milyon tonu geçmiştir. Bazı maya fabrikaları mayayı sadece ekmek yapımı için değil, mekanik ya da enzimatik otolizle elde edilen maya özütü eldesi için de üretmektedirler. Maya özütü yüksek protein ve nükleotit içeriğinden dolayı besin katkısı ya da lezzet arttırıcı olarak kullanılmaktadır. Maya hücrelerinin dış kısmı yani hücre duvarı 1,3-β-D-glukan yapımı için ideal bir hammaddedir. Çünkü hücre duvarının kuru ağırlığının % 30-60'ını glukan oluşturmaktadır [2].

## 2.2. MAYA HÜCRE DUVARI YAPISININ DİNAMİKLERİ

Hücre duvarı maya hücrelerinin plazma membranını dıştan saran yaklaşık 100-200 nm kalınlığında bir örtüdür. Bu örtü hücre kuru ağırlığının % 15-30'unu oluşturmaktadır [17] (Şekil 2.3). Ekmek mayası hücre duvarının brüt kimyasal içeriği; % 83 karbonhidrat, % 10 protein, % 3 lipit, % 0.45 sterol, % 0.30 ribonükleik asit ve % 0.04 deoksiribonükleik asittir. Şu ana kadar tanımlanmış bileşenleri ise; glukan, mannan, protein, kitin, glukozamin, yağ asitleri, gliseritler, fosfolipitler ve fosfatlardır [18].



Şekil 2.3: Maya hücre duvarının yapısı ve bileşenleri [19]

Maya hücre duvarının hücre morfolojisini korumak, hücreyi desteklemek, savunmak için gerekli olduğu ispatlanmıştır. Duvar sayesinde hücre dış ortamda meydana gelen ozmotik değişikliklerden korunmaktadır. Geçirgen bir bariyer olan hücre duvarı, hücre içi madde geçirgenliğini de ayarlamakta ve hücrelerin bir araya gelerek yığın oluşturması (flokkulasyon), seksüel aglutinasyon (çiftleşme sırasında hücrelerin birbirine yapışması) gibi yapısal olaylarda hücre-hücre etkileşimlerinde başrolü oynamaktadır.

Maya hücre duvarı, elastik bir yapıya sahiptir. Fizyolojik ve ozmotik yolla gelen zararlardan korunmayı, aynı zamanda hücre şeklinin belirlenmesini sağlamaktadır. Negatif boyama teknikleri ile hücre duvarının elektron mikroskopik analizi sonucunda hücrenin gelişme durumu ve genetik özelliklerine bağlı olarak yaklaşık 70-100 nm kalınlığında elektron-şeffaf içsel bir tabaka ve elektron-yoğun dışsal tabaka olmak üzere iki tabakalı bir yapıda olduğu gözlenmiştir. Mayalanma süresince elektron-şeffaf iç tabakanın kalınlığı 200 nm'ye kadar çıkmıştır. Hücre duvarının iç tabakasının büyük ölçüde duvarın mekanik kuvvetliliğinden sorumlu olduğu ve aynı zamanda duvarın en dış tabakasını oluşturan proteinler için bir tutunma bölgesi olarak görev yaptığı belirlenmiştir. Bu proteinler arasında seksüel aglutininler ve flokkulinler de yer almaktadır. En dış protein tabakası aynı zamanda hücre duvarının geçirgenliğini de sınırlamaktadır. Böylece hücre duvarı, membran bozucu bileşikler ve yabancı enzimlere karşı hücre membranını koruyucu bir kılıf görevini üstlenmektedir. Maya hücre duvarının organizasyon ve moleküler bileşimi çevre şartlarına bağlı olarak değişebilmektedir. Dış etkilerle protein-polisakkarit kompleksinin oluşumu ve düzeni farklılaşmaktadır [17]. Örneğin; inositolün olmadığı bir ortamda gelişen hücre duvarı daha zayıftır, daha az mannan, protein ve fosfor fakat normal hücrelere oranla daha fazla glukan ve glukozamin içerir [18].

Sert, eğilip bükülmez bu yapının, moleküler seviyede kolayca anlaşılır statik ve çok dinamik bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Maya hücre duvarları, gelişme sırasında yeni materyallere ihtiyaç duymakta ve hücre büyüklükleri artmaktadır. Hücre birleşimi (kavuşma), spor oluşumu, pseudohifsel gelişme ve tomurcuklanma gibi morfogenezle ilgili değişimlere ayak uydurmak zorundadır. Bu değişimlerde yalnızca nicel değil nitel modifikasyonlara da gerek duyulmaktadır. Bunlardan başka hücre duvar bileşimi farklı çevre koşullarında farklılık göstermektedir.

Duvar yapısındaki başlıca bileşenler  $\beta$ -glukanlardır ( $\beta$ -glukanlar  $\beta$ -1,3-glukan veya  $\beta$ -1,6-glukan olarak veya her ikisi birden bulunmaktadır.). Hücre duvarının dayanıklılığını glukanlar sağlar ve mikrofibril yapıda şekillenmişlerdir. Yapılan çalışmalarda, çözünür olmayan  $\beta$ -1,3-glukan fibrillerin (ipliksi) bütün hücre yüzeyini sardığı, bunlara kovalent bağlarla kitinin bağlanması sonucu duvarın iç kısmının inşa edildiği görülmektedir. Duvarın dış kısmı ise mannoproteinler ile çevrelenmiştir

(Mannoproteinler hücre duvar proteinleri olarak isimlendirilmekte ve CWP's kısıltması ile ifade edilmektedir). Kovalent bağlarla bağlanan makromoleküller iki esas bloğa ayrılmıştır. Bunlardan birinci blokta sırasıyla kitin- $\beta$ 1,3glukan- $\beta$ 1,6glukan ve ona bağlı bir glikozil fosfatidil inositol türevi içeren GPI-CWP bulunmaktadır. İkinci blokta ise hücre duvar proteinleri doğrudan  $\beta$ -1,3-glukana bağlanmakta sırasıyla kitin- $\beta$ 1,3glukan-Pir-CWP kompleksini oluşturmaktadır. Bu GPI-CWP ve Pir-CWP blokları hücre duvarının yapısal birimlerini oluşturur ve esnek çimento blokları gibi iş yaparlar. Hücre duvar yapısına istenen esnekliği kazandıran bu kompleks yapısı ile mayaların hayatları boyunca hücre duvarlarında gerçekleşecek değişimler güzel bir biçimde açıklanmaktadır (Şekil 2.3).

Hücre yüzey proteinlerinin karbonhidrat yan zincirleri çok sayıda fosfodiester köprüleri içermektedir, bu da fizyolojik pH değerinde etkili olup hücre yüzeyinde negatif yüklerin artmasına neden olmaktadır. Bu yan zincirler aynı zamanda duvarın hidrofilik özellik kazanmasından sorumludur. Su tutucu özelliği dolayısıyla hücrenin kuraklıktan korunmasını sağlamaktadır.

Tablo 2.2: *Saccharomyces cerevisiae*'da hücre duvar makromolekülleri, kuru ağırlık yüzdeleri ve bu makromoleküllerin sentez bölgeleri [17]

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hücre Duvar Bileşenleri		
Makromoleküller	Kuru Ağırlık (%)	Sentez Bölgesi
Mannoproteinler	35-40	Salgı yolu
$\beta$ 1,6 Glukan	5-10	Plazma membranı
$\beta$ 1,3 Glukan	50-55	Plazma membranı
Kitin	1-2	Plazma membranı

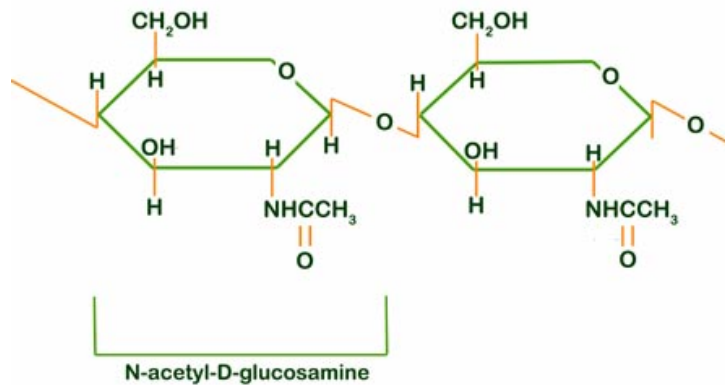
Periplazmik olarak tarif edilen mannoproteinler yalnızca hücre duvarına tutunur ve çözünür durumda kalır. Genel olarak gelişme ortamına salınan bu proteinler kompleks muamelelere gerek kalmadan basit olarak parçalanmakta ve çözünebilmektedir.

Kitin ve  $\beta$ -1,3-glukan, ilgili enzimler kullanılarak plazma membranında sentezlenirler. Bu enzimler integral membran proteinleridir, kitin ve  $\beta$ -1,3-glukan gibi polimerlerin vektörel sentezini katalize etmektedirler.  $\beta$ -1,6-glukan biyosentezinin endoplazmik retikulumda başladığı, golgi aygıtında devam ettiği ve

hücre yüzeyinde tamamlandığı düşünülmektedir. Mannoproteinler hücre içinde sentezlenir, salgı yolu boyunca proteoliz ve/veya glikolizasyon gibi posttranlasyonel modifikasyonlara (translasyon sonunda yeni sentezlenen polipeptit zincirin biyolojik olarak aktif forma dönüşmesi için uğradığı değişimler) tabi tutulur. Son olarak hücre yüzeyinde farklı bölgelere hedeflendirilirler [17].

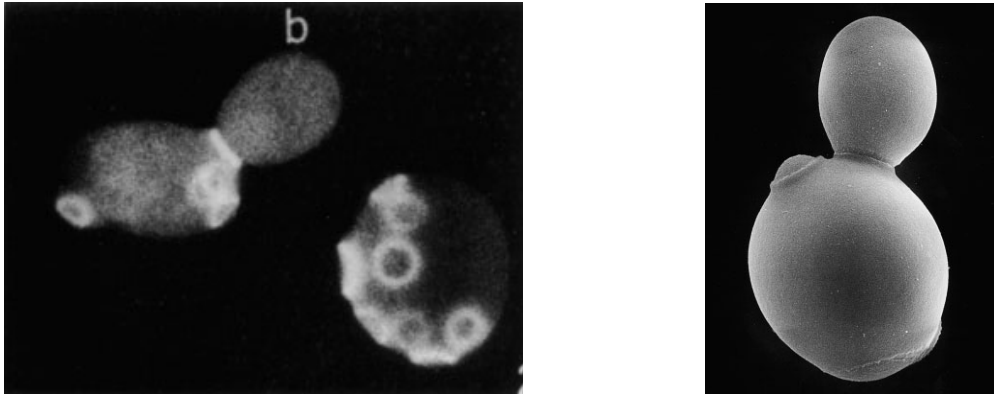
Maya hücre duvarı içeriklerinin miktarı, geliştirildikleri ortamın bileşenleri ve kültür koşullarına göre de değişmektedir. Kwang Suk Kim ve Hyun Shik Yun farklı kültür ortamlarında (sürekli ve fed-batch (kesikli besleme) ile üretim) geliştirdikleri *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinin hücre duvar bileşenlerini incelemek için hücrelerden çeşitli uygulamalarla çözünür halde glukan izole etmişlerdir. *Saccharomyces cerevisiae*'nın fed-batch (kesikli besleme) üretiminde çözünen  $\beta$ -glukan içeriğinin ve  $\beta$ -glukanaza direncin durağan fazın erken evrelerinde en yüksek olduğunu bulmuşlardır. Sürekli üretimde ise daha düşük seyrelme oranlarında daha yüksek  $\beta$ -glukan içeriğine ve  $\beta$ -glukanaz direncine rastlamışlardır. Durağan fazın erken evrelerinde çözünür haldeki  $\beta$ -glukan miktarının en yüksek değerde olması ve fed-batch (kesikli besleme) üretiminde yüksek hücre konsantrasyonlarıyla çalışılabilmesinden dolayı, çözünür  $\beta$ -glukanın kütleli üretiminde fed-batch (kesikli besleme) üretim tekniğinin kullanılmasının daha etkili olduğunu ileri sürmüşlerdir [20].

### 2.2.1. Kitin



Şekil 2.4:Kitinin molekül yapısı [21]

Uzun lineer bir  $\beta$ -1,4-bağlı N-asetilglukozamin homopolimeri olan kitin, yapısal olarak önemli olmasına rağmen maya hücre duvarının iz elemanlarından birisidir. Kitin zincirlerinin uzunluğu genellikle 100-190 N-asetilglukozamin birimidir (Şekil 2.4). Hücre duvarında kitin zincirlerinin % 40-50'i kitin polimerinin indirgen ucundaki  $\beta$ -1,4-bağı aracılığıyla  $\beta$ -1,3-glukanın indirgen olmayan ucuna bağlanır. Normal şartlar altında tomurcuk izi çevresinde % 1-2, bunun dışındaki bölgelerde % 0.10-0.20 seviyelerindedir [17, 22, 23] (Tablo 2.5). Genetik olarak zayıf hücre yapısına sahip hücrelerde anormal şartlar altında kitin sentezi, kurtarma mekanizmasının bir parçası olarak aktive edilmekte ve hücrenin yanal duvarında kuru ağırlığın % 20'sine kadar çıkabilmektedir. Maya ve filamentli funguslarda, kitin mikrofibrilleri hidrojen bağlı zincirlerden meydana gelmektedir. Bu kristalli polimerler büyük bir gerilme kuvvetine sahiptir ve büyük ölçüde hücre duvarının bütünlüğüne katkıda bulunmaktadır. Kitinin maya hücresinin tomurcuklanarak bölünmesinde önemli bir rolü vardır. Ana maya hücresi ile yavru hücre kitinden oluşan bölme ile birbirinden ayrılmaktadır. Ayrıca kitin, hücre duvar materyallerinin bazik ortamda çözünmesini de zorlaştırmaktadır. Bu yüzden de kitin sentezi yıkıldığında duvar düzensiz, fungus hücresi eksik ve ozmotik olarak kararsız olur [17, 23-25].



Şekil 2.5: *Saccharomyces cerevisiae*'da kitinden oluşan tomurcuk izinin taramalı elektron mikroskopundaki (SEM) görüntüleri [11]

Kitin sentezi uridin difosfat (UDP)-N-asetilglukozaminden büyüyen kitin zincirine N-asetilglukozamin transferini katalizleyen integral membran proteini kitini sentezleyen enzim tarafından gerçekleştirilir. Yeni oluşan zincirler plazma membranında sıralandığından kitin polimerlerinin uzaması vektörel sentez yoluyla

olur. Oluşan kitin polimerleri arasındaki hidrojen bağlar, plazma membranı yanında bulunan hücrelerarası alandaki mikrofibrillerin oluşumuna ve sonra da kitin kristalizasyonuna neden olur. Kitin sentezinin bu süreci aktif büyüme ve hücre duvarı yapılandırılma kısımlarında meydana gelir. Mayalar için bu, polarize büyüme boyunca tomurcuk tepesi ve sitokinez boyunca ise tomurcuk sapı gibi alanları içerir [23].

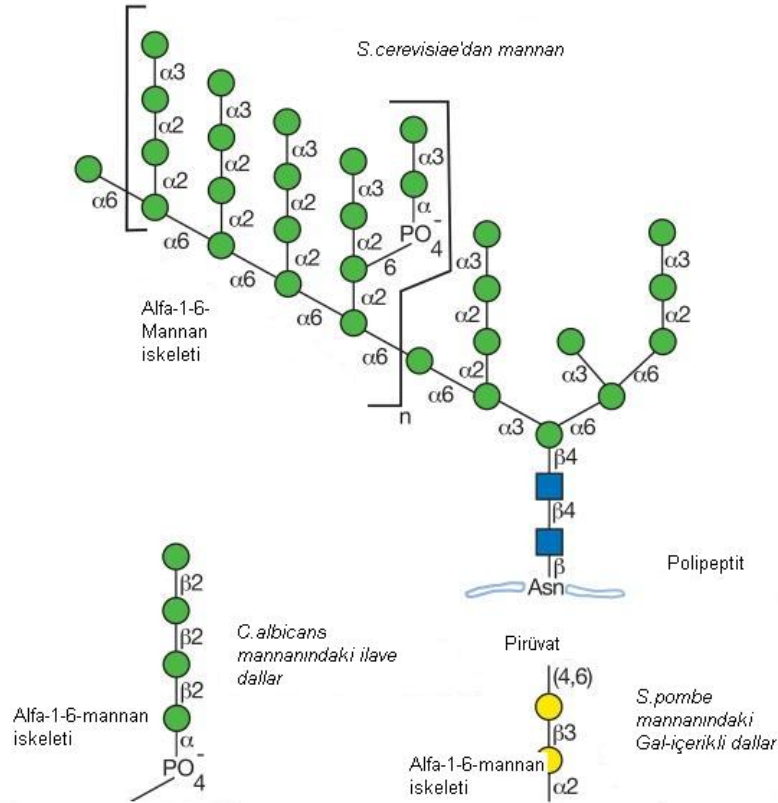
Plazma membranında Chs1p, Chs2p ve Chs3p alt birimlerini içeren CS1, CS2 ve CS3 olmak üzere 3 adet kitin sentezleyen enzim bulunmaktadır. Chs1p, sitokinez boyunca hücre duvarı tamirinde ve kayıp kitin polimerlerini doldurmada görev almaktadır. Chs2p; bölünen maya hücresinde birincil septum oluşumu için gereklidir. Chs3p kitin sentezleyen enzim ise toplam hücresel kitinin % 80-90'nını oluşturmaktan sorumludur. Bu, hücre duvarının  $\beta$ -1,3-glukan kısmına kovalent olarak bağlanan kitinin yapımı gibi tomurcuk oluşumu boyunca kitin çemberi oluşumunu da içermektedir. Chs3p kitin sentezleyen enzimleriyle oynanmış mutantlarda hücre duvarı bütünlüğündeki eksiklikten dolayı büyüme hızında ve kitin seviyesinde büyük ölçüde azalmalara rastlanmıştır. Bu üç genin bir arada bozulması ölümcül bir fenotipe sebep olmakta, bu da kitinin *Saccharomyces cerevisiae* hücre duvarının vazgeçilmez bir bileşeni olduğunu göstermektedir [11, 22, 23, 26].

Kitinin maya hücresine sağladığı yapısal bütünlükten dolayı kitin sentezi funguslara karşı etkenler için önemli bir hedef olarak düşünülmüştür. En iyi bilinen kitin sentez inhibitörleri doğal olarak bulunan nikomisin, polioksin ve bunların türevleridir. Nikomisin ve polioksin kitini sentezleyen enzim substratı UDP-N-asetilglukozaminin analogudur ve kitin sentezleyen enzim için rekabetçi inhibitörler olarak işlev görmektedir [23].

Kitin analizinde floresan boya olan calcofluor beyazı kullanılmakta ve kitini görünür hale getirmektedir. Bu metot ile *Saccharomyces cerevisiae*'nin kitin analizleri yapılabilmektedir [17].

## 2.2.2. Hücre Duvar Proteinleri

En dış hücre duvar tabakasını mannoproteinler oluşturmaktadır. Mannoproteinler mannan ve proteinlerden meydana gelen bir kompleks olup, maya sakızı olarak da bilinmektedir. Bu kompleks % 5-50 oranında proteinden oluşmaktadır. Mannan suda çözünebilen, (1→2) ve (1→3)-bağlı D-mannoz yan zincirli,  $\alpha(1\rightarrow6)$ -bağlı D-mannoz birimlerinden oluşan bir polisakkarittir (Şekil 2.6). 1937 yılında mannanın molar kütlesi ozmometriyle  $100\ 000\ \text{g mol}^{-1}$ , ultrasantrifüjle ise  $76\ 000\ \text{g mol}^{-1}$  olarak tayin edilmiştir. Enzimatik yıkımdan sonra  $180\ 000\ \text{g mol}^{-1}$  kütleli mannan elde edilmiş olup bu mannanın % 10'unun proteinden oluştuğu sonucuna varılmıştır. Temel olarak mannozdan oluşmasına rağmen az miktarlarda fosfat, glikoz, glikozamin ve iz miktarlarda aminoasit ve azot da içermektedir. Bu polisakkarit maya hücre yüzeyindeki başlıca antijenik belirleyicidir [13, 17, 18, 27, 28].



Şekil 2.6: Maya hücresindeki mannanın yapısı [29]



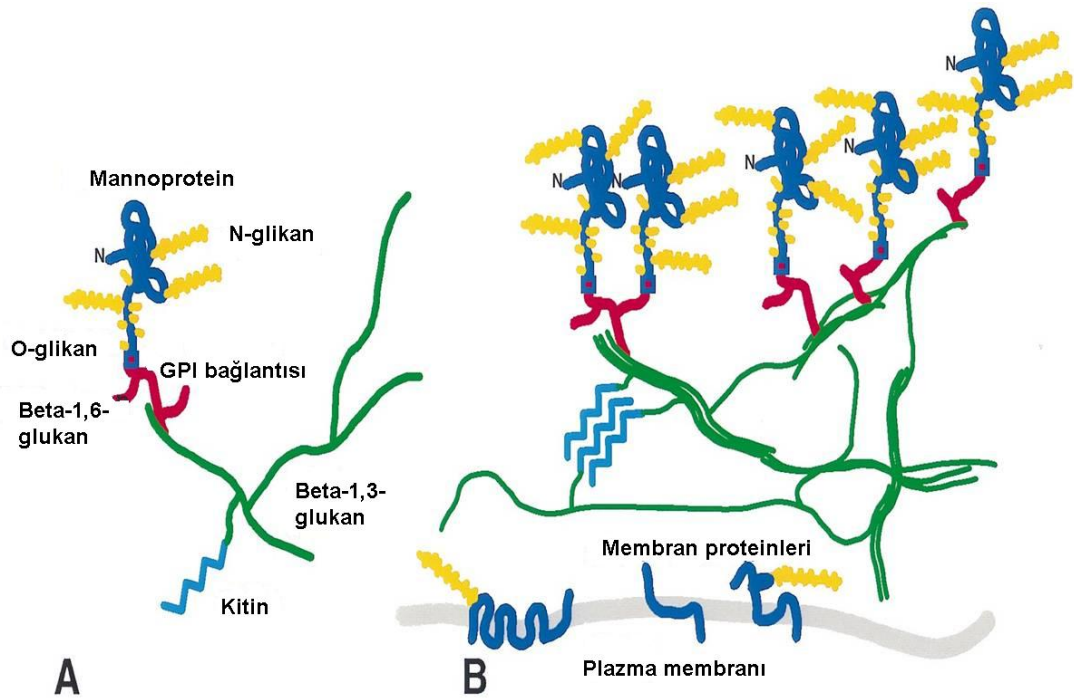
Mannoproteinler hücre duvarı kuru ağırlığının % 35-40'ını oluştururken ağırlıklarının % 50-95 kadarı karbonhidratlardan oluşan yüksek oranda glikozillenmiş polipeptidlerdir. Maya proteoglikanları olarak da anılmaktadırlar [17, 24] (Tablo 2.2).

Geleneksel hücre duvar proteinleri büyük ölçüde N- ve O-bağlı oligosakkaritlerle değiştirilmiş glikoproteinlerdir. Bu glikoproteinlere bağlı oligosakkarit zincirlerinin yapısı fungus çeşidine göre farklılık göstermektedir. *Saccharomyces cerevisiae* ve *Candida albicans*'ın hücre duvarları, mannan olarak bilinen mannozca zengin zincirlerle glikozillenmiş mannoproteinleri içermektedir. Bu değişikliklerin yanı sıra bazı hücre duvar proteinleri glikozil fosfatidil inositol (GPI) bağlantısı da taşıyabilmektedir. Lipit ve oligosakkarit içerikli bir yapı olan GPI bağlantısı, C-terminal sinyal dizisini içeren proteinleri seçmek için eklenip bu proteinlerin plazma membranı ve hücre duvarına yönelmesi ve yerleşmesinde görev almaktadır.

Birçok duvar proteini, N- ve O-bağlı kısımlardaki şekerler arasındaki ve/veya kitin ya da glukan polimerlerinin GPI bağlantısındaki kovalent bağlar aracılığıyla duvara eklenmektedir (Şekil 2.7). Hücre duvar proteinleri; hücre şeklinin devamlılığının sağlanmasında, hücre göçü ve füzyonu (hücre kaynaşması) için tutunmaya aracılık etmekte, yabancı maddelere karşı hücreyi korumada, moleküllerin emilmesinde, dış uyarıcılardan hücre içi sinyallerinin iletilmesinde ve hücre duvar bileşenlerinin sentezlenmesi ve düzenlenmesinde görev almaktadırlar. Ayrıca maya hücre yüzeyi çok sayıda negatif yük içermektedir, bunun sebebi ise N- ve O-bağlı mannozil yan zincirlerinde bulunan fosfodiester köprüleridir. N- ve O-bağlı protein glikozilasyon süreci ökaryotlar arasında korunmaktadır.

Pek çok glikoprotein, salgı basamağına girmelerini sağlayan tipik bir N-terminal sinyal peptidine sahiptir. Proteinler sentezlendiklerinde N- ve O- bağli glikozilasyon sürecinin başladığı endoplazmik retikulum (ER) lümenine çıkarılır. Proteinin ER lümenine taşınması boyunca uzun, dallı oligosakkarit yapısı N-X-S ve N-X-T dizi elementlerindeki asparajin kısmına eklenir. Burada N, alıcı asparajini; X, herhangi bir aminoasiti, S ve T ise serin ve treonini göstermektedir. N-bağli oligosakkarit; N-asetilglukozamin (GlcNAc), mannoz (Man) ve glikoz (Glc) kısımlarından meydana

gelir ve bir dolikol lipit vericisinden proteine transfer edilir. N-bağlı terminal oligosakkarit yapının sentezi ER zarında olur ve daha sonra da dolikol lipit kısmına şeker ilave edilir. Her bir şeker ilavesi, substrat olarak dolikol-şeker ya da nükleotid-şeker arasını kullanılan çok özel bir glikotransferaz aracılığıyla gerçekleşir. Bu şeker transferazlarını kodlayan genler tespit edilmiş ve toplu olarak bu genlere asparajin-bağlı glikozilasyon (ALG) genleri denilmiştir. Dolikol lipit grubuna bağlanma büyüyen oligosakkarit zinciri zara bağlamada görev alır ve glikozilasyon reaksiyonu için gerekli olan aktivasyon enerjisini sağlamaktadır. Tamamlanmış ana yapı dallı bir oligosakkaritten meydana gelmektedir. Oligosakkarit, zincirdeki ilk GlcNAc ve hedef asparajinin NH<sub>2</sub> grubu arasındaki glikozidik bağ oluşumunu katalizleyen N-oligosakkariltransferaz kompleksi tarafından yeni oluşan proteine transfer edilmektedir.



Şekil 2.7: Hücre duvar bileşenlerinin hücre duvarındaki konumları [24]

Proteine bağlandığında, N-bağlı ana yapı, şekerlerin eklenmesi ya da atılmasını içeren ER ve golgi aygıtındaki değişimlere maruz kalmaktadır. Bu, glikoproteinlerdeki N-bağlı şeker bileşeni çeşitliliğini sağlayan fazladan bir işlemdir. *Saccharomyces cerevisiae* ve *Candida albicans*'da mannoproteinler, kısa dallı  $\alpha$ -1,2 ve  $\alpha$ -1,3-yan dallı uzun  $\alpha$ -1,6-bağlı mannozların eklenmesiyle oluşturulmaktadır. N-

bağlı oligosakkaritlerin işlenmesi ve uzamasını sağlayan golgi enzimleri KTR/KRE/MNT ve MNN gen ailesinin üyeleri tarafından kodlanmaktadır. *Saccharomyces cerevisiae*'da KTR/KRE/MNT ve MNN ailelerinin her biri 9 genden oluştuğu, bunların pek çoğunun da N-bağlı oligosakkarit sentezine katıldığı tespit edilmiştir [23].

N-zincir uzaması duvar biyogenezi için çok gerekli değilmiş gibi gözükse de *mnn9* mutantlarında bu zincirin olmaması duvar geçirgenliğinin artmasına ve duvar bütünlüğünün azalmasına yol açmıştır [24].

*Saccharomyces cerevisiae*'da O-bağlı glikan sentezi, proteindeki serin ve/veya treonin kısımlarını ayırmak için tek bir mannozun eklenmesiyle endoplazmik retikulumda başlamaktadır. Bu başlangıç reaksiyonu, substrat olarak dolikol-fosfat-mannozu kullanan bir protein O-mannoziltransferaz (PMTs) ailesi tarafından katalizlenmektedir. *Saccharomyces cerevisiae* genomunun 7 tane PMT proteinini kodladığı tahmin edilmektedir, bunların beşinin O-bağlı glikozilasyonda görev aldığı kanıtlanmıştır. Oligosakkarit sentez ve büyümesinin geriye kalan kısmı golgi aygıtında, KTR/KRE/MNT ve MNN mannoziltransferaz ailelerinin aracılığıyla gerçekleşmektedir [23].

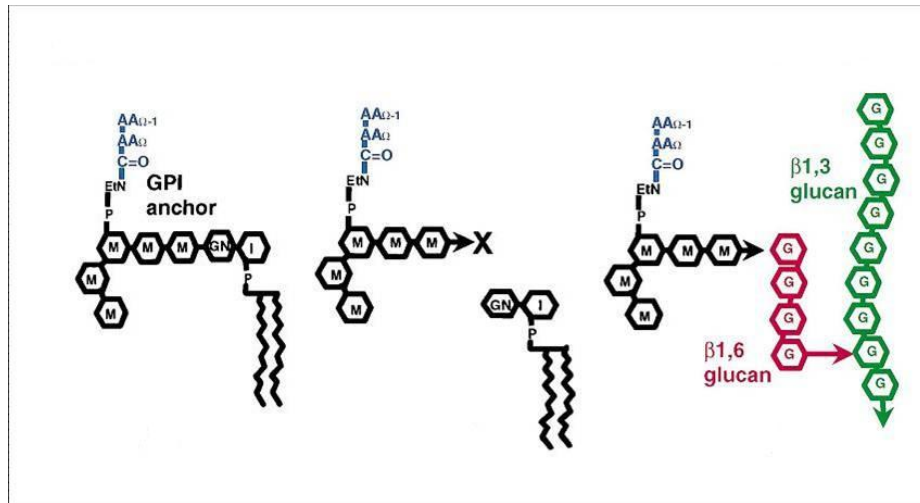
O-mannozilasyonu düzenli bir duvar biyogenezi için gereklidir. O-glikozilasyonun yıkımı yalnızca anormal duvar proteini oluşumuna değil, dallanmış  $\beta$ -1,6-glukan içeriğinde önemli derecede azalmaya da yol açmaktadır. Bunun 2 sebebi vardır;

1)  $\beta$ -1,6-glukan kısmen hücre içerisinde düzenlenir ve salınımı O-glikozillenmiş mannoproteinlerle ilişkisine bağlıdır.

2) Glukan sentezi ya da düzenlenmesi, doğru lokalizasyonu ve fonksiyonu O-glikozilasyonuna bağlı olan mannoproteinlere bağımlıdır. Kre 9p ve Gas1p/Ggp1p, düzgün bir duvar biyogenezi için gerekli olan O-glikozillenmiş proteinlerdendir [24]. N- ve O-bağlı glikozilasyon işlemlerinde herhangi bir basamaktaki tek bir genin yıkımı glikozilasyon etkinliğinde bir miktar azalmaya yok açmakta, ancak hücre ölümüne ya da sürecin bozulmasına neden olmamaktadır. Buna rağmen bu

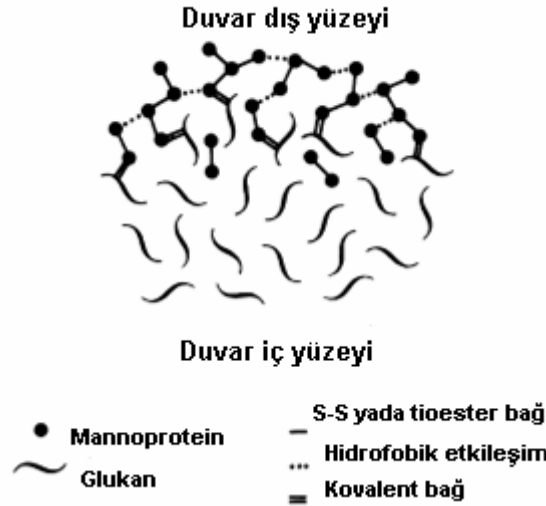
basamaklardaki birden fazla anormallik, hücre duvar bileşenlerinde eksiklik, ozmotik hassasiyet hatta hücre ölümüyle sonuçlanan birçok fenotip oluşmasına sebep olabilmektedir. Bu sonuçlar, hücre duvar proteinlerinin uygun yapısı, yerleşimi ve işlevinde glikozilasyonun önemini bir kez daha anlatmaktadır.

O- ve N-bağlı oligosakkarit değişimlerinin yanı sıra, hücre duvar glikoproteinlerinin birçoğu glikozil fosfatidil inositol (GPI) bağlantısı taşımaktadır (Şekil 2.8). Diğer hücre duvar proteinleri gibi GPI-bağımlı proteinler de, onları salgı basamağı ve çok sayıda O- ve N-bağlı glikozilasyon kısmına yönlendiren bir N-terminal sinyal peptidine sahiptir. Bu GPI-bağlantısı taşımaya yönlendirilmiş proteinler, karboksil uçlarında farklı bir GPI bağlantı ekleme sinyaline de sahiptir. GPI-bağlantı sinyal dizisi; yaklaşık 11 aminoasitli yapısal olmayan hidrofilik kısım ile başlayıp son kısım olarak ifade edilen 3-4 aminoasitli bölge ve 6 polar aminoasitli ara kısım ile devam eden ve son olarak da öncü-proteinin karboksil ucundaki 10 aminoasitli hidrofilik bölgeyle sona eren 4 bölmeli bir yapıdadır. Bu sinyal dizisi, endoplazmik retikulum (ER) zarında bulunan, GPI transamidaz olarak bilinen bir protein kompleksi tarafından fark edilmektedir. GPI transamidaz son kısımdaki hedef proteini ayırmakta ve proteinin yeni oluşmuş C ucundaki GPI bağlantı yapısının taşınmasına yardımcı olmaktadır. GPI bağlantısı, proteinleri plazma membranı ve/veya hücre duvarına yerleştirmekten sorumlu ve aynı zamanda protein stabilitesi ve fonksiyonu için de gereklidir [23].



Şekil 2.8: Hücre duvarındaki GPI bağlantılarının konumları [24]

Zlotnik ve arkadaşları, maya hücre duvar proteinlerinin lokalizasyonu ve fonksiyonlarını anlamak için yaptıkları çalışmada mekanik ve enzimatik işlemlerle duvar proteinlerini çözmüşlerdir. Bu çalışmada maya hücre duvarına yüksek tuz konsantrasyonu, digitonin ve 2-merkaptoetanol gibi faktörler uygulanmıştır. 2-merkaptoetanol, mannoprotein molekülleri arasındaki disülfid bağların yıkımına ve dolayısıyla da por büyüklüğünün artmasına yol açmıştır. Digitonin mannoprotein moleküllerinin hidrofobik kısımlarında hidrofilik kanallar açarken, yüksek tuz konsantrasyonu da duvar yapısında açıklıklar yaratarak mannoprotein yapısını değiştirmiştir. Bu etkenlerin hepsi mannoproteinlerin daha esnek olmasına neden olmuştur. Bu işlem sonunda hücre duvarındaki por büyüklüğünün artması ve hücre duvar kalınlığının % 30 oranında azalması hariç belirgin mikroskobik bir değişime rastlanmamıştır. Ancak por büyüklüğündeki bu artış peroksidaz gibi enzim ve etkenlerin hücre duvarını yok etmeden plazma membranına ulaşmalarına ve hücrenin yıkılmasına sebep olmuştur. Bu durum da maya hücrelerinin yaşamasında mannoproteinlerin ne kadar önemli olduğunu göstermiştir [30] (Şekil 2.9).



Şekil 2.9: Hücre duvarında mannoproteinlerin dağılımı [30]

Hücre duvar polisakaritlerine kovalent olarak bağlanan proteinlerin iki ana sınıfı vardır:

GPI-bağımlı hücre duvar proteinleri (GPI-CWPs): Bu proteinler dolaylı olarak 1,3-glukana bağlanan proteinlerdir. Bu proteinler önce 1,6-glukana bağlanır ondan sonra 1,3-glukana bağlanırlar. Bu bağlanma işi için de, GPI'ye ihtiyaç duyarlar. Örneğin; *Saccharomyces cerevisiae*'da çalışılmış GPI-CWP proteini Sag 1'dir ve seksüel aglutinasyondan sorumludur [17].

Pir proteinleri (Pir-CWPs): Bu proteinler doğrudan 1,3-glukana bağlanabilirler. *Saccharomyces cerevisiae*'da bu tarz çalışan dört protein ayırt edilmiştir. Bunlar Pir 1, Pir 2 / Hsp 150, Pir 3 ve Pir 4 / Cis 3'dür, bu proteinler immünolojik görevler üstlenmişlerdir [17, 31]. Pir-proteinleri serin ve treonince zengin, yüksek oranda O-mannozillenmiş proteinlerdir. Pir 1, Pir 2 / Hsp 150 ve Pir 3 genellikle yanal duvarlarda bulunurken, Pir 4 / Cis 3 çoğunlukla vejetatif hücrelerin büyüyen tomurcuklarında yer almaktadır. Diğer üç Pir-hücre duvar proteininin aksine Cis 1p tek tekrarlı bir diziyeye sahiptir. Bu özel dizi,  $\beta$ -1,3-glukana bağlanmak için gereklidir. DGQJQ işaret dizili tekrarlar doğrudan  $\beta$ -1,3-glukana bağlanırsa Pir-hücre duvar proteinleri iki ya da daha fazla  $\beta$ -1,3-glukan molekülüne tutunur. Bu şekilde, duvarın bütünlüğü sağlanır. Hücre izotropik olarak büyürken ve yeni hücre duvar proteinleri makromoleküler ağa eklenirken, Pir-hücre duvar proteinleri Pir 1p, Hsp 150p / Pir 2 ve Pir 3p, hücre döngüsünün erken G<sub>1</sub> fazı boyunca ifade edilirler. Bu durum hücreye izotropik büyüme periyodu süresince Pir-hücre duvar proteinlerini kullanmak için avantaj sağlar. Duvar geçirgenliği erken G<sub>1</sub> fazında diğer fazlara oranla daha düşüktür.

GPI-bağımlı hücre duvar proteinleri duvarın dış tabakasında yer alırken Pir-hücre duvar proteinleri  $\beta$ -1,3-glukan ağıyla bağlantılı iç iskelete dağılmış halde bulunmaktadır [22, 26].

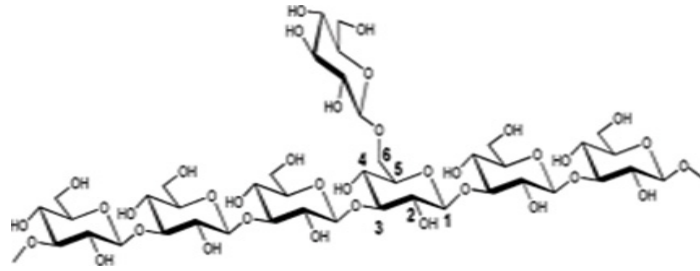
### **2.2.3. $\beta$ -Glukan**

#### **2.2.3.1. $\beta$ -glukanın yapısal özellikleri**

Glukan (maya selülozu); fungal hücre duvarı kuru ağırlığının yaklaşık olarak % 50-60'ını oluşturan maya hücre duvarının başlıca yapısal polisakkaritidir. Glukan

polimerleri, çeşitli kimyasal bağlarla bağlı zincirlerden oluşan tekrarlı glikoz birimlerinden meydana gelmektedir. NMR (nükleer manyetik rezonans) spektroskopisi, periyodat oksidasyonu, metilasyon analizi, kütle spektroskopisi ve enzimatik hidrolizle yapılan çalışmalar sonucunda ekmek mayası *Saccharomyces cerevisiae*'nin hücre duvarındaki glukanın,  $\beta$ -konfigürasyonlu (1 $\rightarrow$ 3) ve (1 $\rightarrow$ 6) glikosidik yan zincirlere sahip olduğu tespit edilmiştir. Genelde hücre duvar glukanın % 65-90'ı  $\beta$ -1,3-glukan olarak bulunur, fakat çeşitli fungal hücre duvarlarında  $\beta$ -1,6-;  $\beta$ -1,3 ve  $\beta$ -1,6-;  $\beta$ -1,4-;  $\alpha$ -1,3- ve  $\alpha$ -1,4-bağlı glukanlar gibi glukanlar da vardır [18, 23, 32, 33].

### 2.2.3.1.1. $\beta$ -1,3-glukan ağı



Şekil 2.10:  $\beta$ -1,3-glukanın kimyasal yapısı [34]

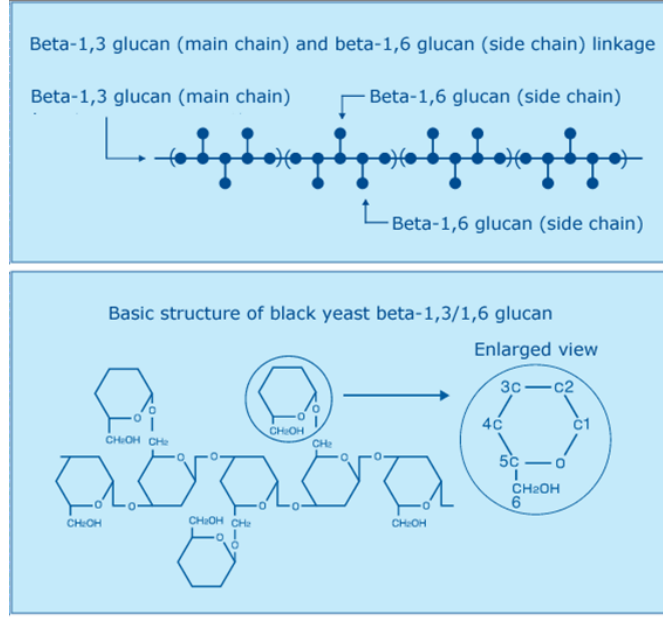
Hücre duvarının mekanik gücü ve dayanıklılığı yapılarında var olan  $\beta$ -1,3-glukana bağlıdır. Anilin mavisi ile boyanabilen  $\beta$ -1,3-glukan, çukur heliks ailesi olarak adlandırılan gruba dahildir (Şekil 2.10). Bu heliks şeklindeki yapı ya tek bir polisakkarit zincirinden ya da 3 hidrojen bağlı zincirden (üçlü heliks) meydana gelmektedir. Diğer bir deyişle;  $\beta$ -1,3-glukan zincirleri genişleyebilen esnek yaylı bir tele benzemektedir. Bu özellik hücre duvarının elastikiyetini açıklamaktadır. Örneğin; hücreler hipertonic bir ortama alındığında % 40-50 yüzey kayıplarıyla paralel olarak orijinal hacimlerinin % 60'ını kaybederek hızlıca büzüşürler. Aynı şekilde bu hücreler normal ortamlarına transfer edildiklerinde eski hacimlerine kavuşurlar.  $\beta$ -1,3-glukan, heliks şeklinde bir yapıya sahiptir ve yalnızca yanal duvarlarda çok az kristalize olabilir. Hücrenin durağan fazlarında  $\beta$ -1,3-glukan molekülü yaklaşık 1500 glikoz monomerinden oluşmaktadır, bu da 240 000 Da'luk moleküler ağırlığa karşılık gelmektedir. Maksimum fibril uzunluğu 600 nm, fibril

çapı ise 10-30 nm'dir. Bu uzunluk hücre çevresinin 1/10'una ya da ortalama duvar kalınlığının 3-6 katına denk gelmektedir [17, 22, 24, 26].

$\beta$ -1,3-glukan sentezi, düzgün hücre duvar oluşumu ve mayanın normal gelişimi için gereklidir. Kitinde olduğu gibi  $\beta$ -1,3-glukan polimerleri de plazma membranıyla ilgili enzim kompleksleri tarafından oluşturulur ve vektörel sentez yoluyla hücrelerarası alana taşınır. Bu sentez türü hücre duvarında oluşan glukan zincirlerinin birleşimini düzenler ve hücre duvarına girişlerini kolaylaştırır. Bu birleşme hücre duvarı sentezinin aktif kısımlarında gerçekleşir ve kitini oluşturanlara benzer şekilde hücre büyümesinin ve tomurcuklanmanın ya da dallanmanın olduğu bölgelerde yer alır. Glukanı sentezleyen enzim,  $\beta$ -1,3-bağıyla bağlı her biri yaklaşık 1500 glikoz birimi içeren uzun lineer glukan zincirlerinin oluşumunu katalizler. Her uzun glukan zincirinde, dallı bir yapı oluşturmak için  $\beta$ -1,3-glukan ilavesinin yapıldığı kısım, 40-50 glikoz biriminden meydana gelen 6.karbon bölgeleridir. Bu şekilde dallanan glukanlar, hücre duvarına mekanik sağlamlığı ve bütünlüğünü sağlamak için kitin ve mannopteinleri birbirine çapraz olarak bağlayabilmektedirler.

$\beta$ -1,3-glukan sentezleyen enzim mekanizmasının bileşenlerini kodlayan genler ilk olarak *Saccharomyces cerevisiae*'de tanımlanmıştır. Bu genler FKS1 ve FKS2 genleri olup, bu genlerden birinin bozulması sonucunda yavaş büyüme hızına sahip ve eksik hücre duvarlı mutantlar oluştuğu tespit edilmiştir. FKS1 ve FKS2 genlerinin aynı zamanlı yıkımları ise ölümcüldür [23].

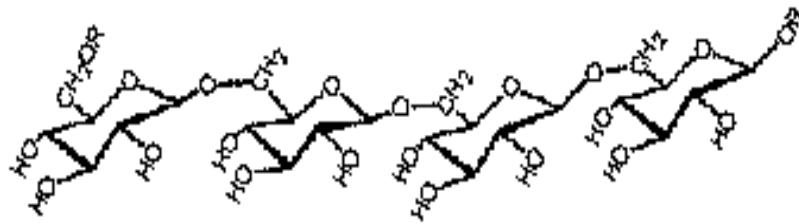




Şekil 2.11:  $\beta$ -1,3-glukan ve  $\beta$ -1,6-glukan bağlantılarının şematik gösterimi [35]

Maya olgunlaştığında, hücre durağan faza girdiğinde  $\beta$ -1,3-glukan zincirleri kısmi olarak dallanmakta ve yaklaşık % 3-4 oranında  $\beta$ -1,6-bağı ile bağlanmış glikoz kökü içermektedir (Şekil 2.11).  $\beta$ -1,3-glukanın dallanma derecesi aynı zamanda mayanın gelişme durumuna bağlı olarak değişmektedir [17].

#### 2.2.3.1.2. $\beta$ -1,6-glukan



Şekil 2.12:  $\beta$ -1,6-glukanın kimyasal yapısı [36]

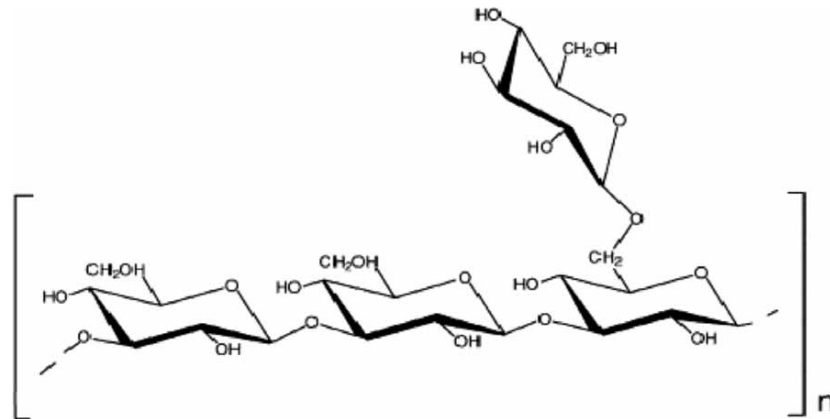
*Saccharomyces cerevisiae*'nin da içinde bulunduğu birçok maya,  $\beta$ -1,3-glukanın yanı sıra  $\beta$ -1,6-glukan olarak ifade edilen başka bir çeşit glukan da taşır.  $\beta$ -1,6-glukan; oldukça fazla dallanmış yaklaşık 130 glikoz monomerinden oluşan amorf bir yapıdır (Şekil 2.12). Suda çözünebilir bir polimerdir.  $\beta$ -1,6-glukan, glukan ağ sistemine, 1,3-glukana bağlanarak dahil olmaktadır. Bu bağlanma da ancak glikozil fosfatidil

inositol (GPI)'ün varlığında gerçekleşmektedir. Bu şekilde hücre duvarı ağ sisteminde GPI→1,6-glukan→1,3-glukan kompleksi oluşturmaktadır. Aynı zamanda β-1,6-glukan, olumsuz çevre faktörleri olduğunda anında kitin bağlayıcı olarak görev yapmaktadır [17, 22].

β-1,6-glukan biyosentezi endoplazmik retikulumda başlayan ve plazma membranında gerçekleşen bir işlemdir. Bu polimerin lineer bir molekül olarak sentezlendiği, daha sonra dallanma gösterdiği ya da zinciri büyötmek için önceden yapılmış dallı oligosakkarite tekrar tekrar bağlanıp bağlanmadığı bilinmemektedir. Ancak son zamanlardaki β-1,6-glukanın senteziyle ilgili yapılan in vitro çalışmalar bu sentezde rol oynayan genler hakkında daha fazla bilgi vermeye başlamıştır. Kre9 ailesi; Kre9p ve Knh1p olmak üzere iki salgı proteininden meydana gelmektedir. Bu iki genin birlikte yıkımının ölümcül olması hücre yapımında ne kadar önemli olduklarını gösterir. İlginç bir şekilde, tek bir kre9Δ mutanıyla oluşturulmuş β-1,6-glukanın normalinden daha küçük ve farklı bir yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir. Kısacası Kre9p ve Knh1p, β-1,6-glukan sentezinde doğrudan rol oynamaktadırlar [26].

#### 2.2.3.2.2. β-glukan çeşitleri

##### 2.2.3.2.2.1. Scleroglucan



Şekil 2.13: Scleroglucanın kimyasal yapısı [37]

Scleroglucan; *Sclerotium glaucanicum*, *Sclerotium rolfii* ve *Sclerotium delphinii* gibi *Sclerotium* türleri, *Corticium* ve *Sclerotinia* gibi çeşitli funguslar tarafından hücre dışına sentezlenen bir polisakkarit olarak tanımlanmaktadır [38, 39]. *Schizophyllum commune*'nin de scleroglucana yapısal olarak çok benzeyen polisakkaritler ürettiği gözlemlenmiştir. Ancak scleroglucan üreten başlıca iki tür *Sclerotium glaucanicum* ve *Sclerotium rolfii* olarak kaydedilmiştir. Bu mikroorganizmalar bitki patojeni ve parazitleri olarak bilinen heterotrofik filamentli funguslardandır. *Sclerotium* türlerinin salgıladıkları hidrolitik enzimlerle scleroglucanı glikoz moleküllerine parçalayıp diğer karbon kaynakları tükendiğinde onları karbon kaynağı olarak kullandıkları görülmüştür [38].

Scleroglucan; başlıca 1,3-β-D-glukopiranoz birimlerinden meydana gelen, her 3 birimde bir bağlanan 1,6-β-D-glukopiranoz bağlantılarının olduğu, iyonik olmayan, suda çözünebilir bir homopolisakkarittir [38, 40]. Scleroglucanın tekrarlı tetrasakkarit birimlerinin kimyasal yapısı yapılan NMR analizleriyle Şekil 2.13'teki gibi bulunmuştur. Polimer zincir uzunluğunun dolayısıyla da moleküler kütesinin kullanılan mikroorganizma kültürüne göre değiştiği tespit edilmiştir [38]. Genellikle bu polimerlerin ortalama moleküler kütesinin  $1.56 \times 10^6$  Da'na karşılık geldiği belirtilmiştir [41]. Scleroglucanın, *Schizophyllum commune* tarafından üretilen schizophyllanla benzer bir yapıya sahip olduğu, tek farkının ise schizophyllanın daha fazla moleküler kütesi olması olduğu belirtilmiştir [38].

Hücreler tarafından scleroglucan sentezinin kültür ortamının bileşenlerine göre değişiklik gösterdiği görülmüştür. Scleroglucan üretiminin, nitrojen ve fosfat kaynağı konsantrasyonu arttıkça önemli derecede arttığı, amonyak, L-treonin ve askorbik asitin ortamda fazla bulunmasının ise bu oranı düşürdüğü kanıtlanmıştır [42, 43]. Bu faktörlerin yanı sıra ortamın ozmotik basıncının, mikroorganizmanın üretme zamanı ve sıcaklığının da scleroglucan üretimini etkilediği tespit edilmiştir. Scleroglucan oluşumunun 28°C sıcaklıkta optimum olduğu, sıcaklık değiştikçe düştüğü gözlemlenmiştir [42, 44]. Düşük oksijen seviyesinin de scleroglucan sentezini uyardığı bulunmuştur [39].

Bu polisakkarit ilk olarak 1967 yılında dikkat çekmeye başlamıştır [45]. Özgün rheolojik özellikleri ve hidroliz, sıcaklık ve elektrolitlere karşı direncinden dolayı scleroglucan, kozmetik, gıda ve tıbbi uygulamaların yanı sıra yağ endüstrisinde de kullanılmaktadır. Scleroglucanın özgün rheolojik özelliğinin kaynağının polimer zincirlerinin sıvı solüsyondaki sert çubuk yapısı olduğu belirlenmiştir [46]. Yağ verimini arttırmak için emülgatör, kayganlaştırıcı, kıvam arttırıcı ajan olarak faydalanılmaktadır [39, 40]. Yapıştırıcı, su-bazlı boyalar, matba mürekkebi ve sıvı hayvan besin maddelerinin yapımı da diğer endüstriyel kullanımlarıdır [45].

Kozmetik endüstrisinde kremler, koruyucu losyonlar, yumuşatıcı gibi çeşitli cilt bakım ürünleri ile saç spreyi formülasyonlarında scleroglucandan yararlanılırken gıda endüstrisinde ise donmuş gıdaların kalitesini yükseltmede, Japon kekleri, buharda pişirilmiş gıdalar, pirinç gevreği ve çeşitli ekmek ürünlerinin yapımında faydalanılmaktadır [38, 45].

Tıbbi ürünlerde genellikle süspansiyonları stabilize etmek için, tablet kaplamada ve müshil olarak kullanılmaktadır. Bu tür bir araştırmada scleroglucan türevlerinin sıvı çözeltisine  $\text{CaCl}_2$  eklenerek acyclovirin başarılı bir şekilde kaplanması sağlanmıştır [46]. Yapılan başka iki çalışma ise borat iyonları ve boraks ilavesiyle de bu polisakkaritin ilaç tableti yapımında kullanılabileceğini göstermiştir [45, 47].

In vivo ve in vitro çalışmalarda scleroglucanın makrofajları aktive ederek tümör, bakteri ve virüs kaynaklı hastalıkları önleyici işleve sahip olduğu tespit edilmiştir [38]. Mastromarino ve arkadaşları rubello virüs enfeksiyonunun erken evrelerinde hücrelere scleroglucan uygulamışlar ve bu polisakkaritin virüs replikasyonunun bir basamağını engelleyerek virüsü inaktif edici bir etki gösterdiğini tespit etmişlerdir [48]. Scleroglucanın tavuk embriyo hücrelerini kuduz virüsü enfeksiyonundan doza bağlı olarak koruduğu ise başka bir çalışmada gösterilmiştir [49]. Scleroglucanın herpes virüsüne karşı etkileri üzerine çalışılmış ve konakçının plazma membranındaki polisakkaritlere bağlanmasının virüslerin hücreye girişini ve tutunmasını önlediği ya da azalttığı gözlemlendiyse de inhibitör etkisi enfeksiyonun ilk evrelerinde olmuştur. Burada kilit reaksiyon, konakçının plazma membranı ve virüs arasındaki etkileşimini engelleyen plazma membranındaki glikoproteinlerle

scleroglucanın birbirine bağlanmasıdır. Scleroglucanın virüs kaynaklı hastalıkları önlemesiyle ilgilenen araştırmacıların bir diğer açıklaması da, virüslerin hücreye girdikten sonra scleroglucanın da hücreye giriş yaptığı ve virüsü çevreleyerek aktivitesini engellediğine yönelik olmuştur. Ancak scleroglucan gibi yüksek moleküler ağırlığı olan polisakkaritler için bunun pek mümkün olmadığı sonucuna varılmıştır [38, 50]. Streptococcus enfeksiyonlarına karşı sarıkuyruk balıklarına uygulanan scleroglucanın hayvanların hayatta kalma oranını önemli derecede arttırdığı tespit edilmiştir. Scleroglucan ile muamele edilmiş balıklarda fagositoz ve lizozom aktivitesinde artışa rastlanmıştır [51]. Sıçan ve köpeklerle yapılan kısa ve uzun vadeli besleme çalışmalarında, herhangi bir toksik etki, kandaki bozukluklara ya da önemli doku patolojisine rastlanmamıştır. Girne domuzları, tavşan ve insanların göz ve deri testleri ise olumsuz reaksiyonlara veya duyarlılığa işaret etmemiştir. Cıvıv ve köpek besinlerinde kullanımı da kolesterol seviyesini düşürürken yağ salınımını arttırmıştır [38]. Farelerle yapılan bir incelemede scleroglucanın peritoneal fagositin kemiluminesans (kimyasal ışıltama) ve C3 serum seviyesini ve in vivo'da scleroglucan enjeksiyonun dalak hücrelerinin DNA sentezini arttırdığı görülmüştür. Bunun yanı sıra dalak hücreleri mitojenlerle inkübe edildiğinde bu polisakkaritin proliferatif (hücre bölünmesi yoluyla çoğalma) etki gösterdiği kanıtlanmıştır [52].

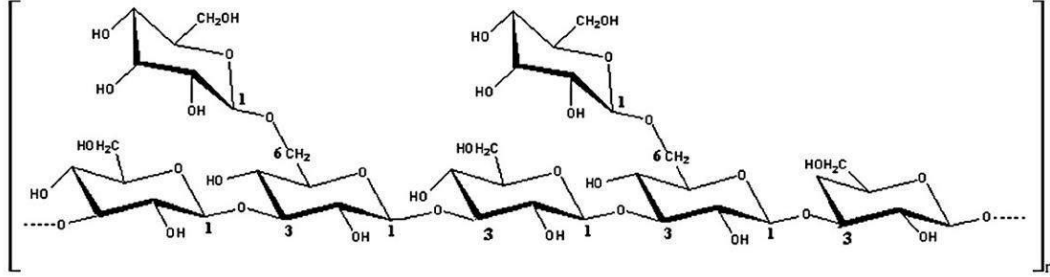
Tarımda karışımların sprey şeklinde hazırlanmasını kolaylaştırdığı ve özellikle yapraklara püskürtülen damlaların yaprakla temasını arttırdığı görülmüştür. Pestisit, yaprak dökücü sprey ve tohum kaplamada da kullanılabileceği düşünülmektedir [38].

Scleroglucanın bu faydalarına rağmen, üretim maliyetinin yüksek olmasından dolayı bazı uygulamalarda bitki kaynaklı polisakkarit ve sentetik polimerlerin yerine kullanılamamaktadır. Üretim maliyetini düşürmek ve scleroglucan verimini geliştirmek için yeni yöntemler aranmaya başlanmıştır [39].

#### **2.2.3.2.2.2. Lentinan**

Lentinan; *Lentinus edodes*'ten izole edilen, her 5 molekül  $\beta$ -1,3-glukopiranoz birimi başına 2 mol  $\beta$ -1,6-glukopiranoz birimine sahip bir çeşit  $\beta$ -1,3-glukandır (Şekil 2.14).

Jel difüzyon kromatografisiyle yapılan çalışmalarda ortalama moleküler ağırlığının 300 000-800 000 Da olduğu tespit edilirken moleküler formülü  $(C_6H_{12}O_5)_n$  olarak bulunmuştur [53-55].



Şekil 2.14: Lentinanın kimyasal yapısı [53]

Lentinanın da diğer  $\beta$ -glukan çeşitleri gibi bağışıklığı artırıcı bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Drandarska ve arkadaşları domuzlarda BCG (verem aşısı) ile lentinanın etkilerini incelemişlerdir. Öncelikle belirli oranlarda lentinanı burun içine vermişler ve ardından da hayvanlara verem aşısı yapmışlardır. Son uygulamadan sonra 1, 14 ve 45 günlük aralıklarla 4 hayvan grubundan (1-BCG ve lentinan, 2-sadece lentinan, 3-sadece BCG, 4-tuzlu su uygulamalı) akciğer, dalak ve lenf nodunun doku parçaları ve brankoalveolar lavaj (çeşitli akciğer hastalıklarının tanısında kullanılan standart bir yöntem) örnekleri almışlardır. Bu örneklerde alveolar makrofajların *Staphylococcus aureus* ve *Mycobactium tuberculosis*'i öldürme yeteneği,  $H_2O_2$  ve nitrit üretimi ve histomorfolojik gözlemler gibi parametrelere bakmışlardır. Sonuçlar; aşının tek başına ya da lentinanla uygulanmasının alveolar makrofaj aktivasyonunu arttırdığını göstermiştir. Bunun yanı sıra lentinanlı ön-muamelenin akciğerde aşya karşı yerel bağışıklık tepkilerini yükselttiği ve mevcut yan etkileri azalttığı tespit edilmiştir [56].

Markova ve arkadaşları yaptıkları çalışmada lentinanı farklı dozlarda (1, 5 ve 10 mg/kg) karın ve burun içinden sıçanlara vermişlerdir. Lentinan muamelesinin etkisi çeşitli hücre aktivasyon testleriyle (*Salmonella enteritis* ve *Staphylococcus aureus*'u öldürme yeteneği,  $H_2O_2$  üretimi ve miktarı, glikolitik ve asit fosfataz aktivitesinin saptanması) değerlendirilmiştir. Sonuçlar; lentinanın peritoneal ve brankoalveolar hücrelerin *Staphylococcus aureus*'u öldürme yeteneğini arttırdığını göstermiştir.

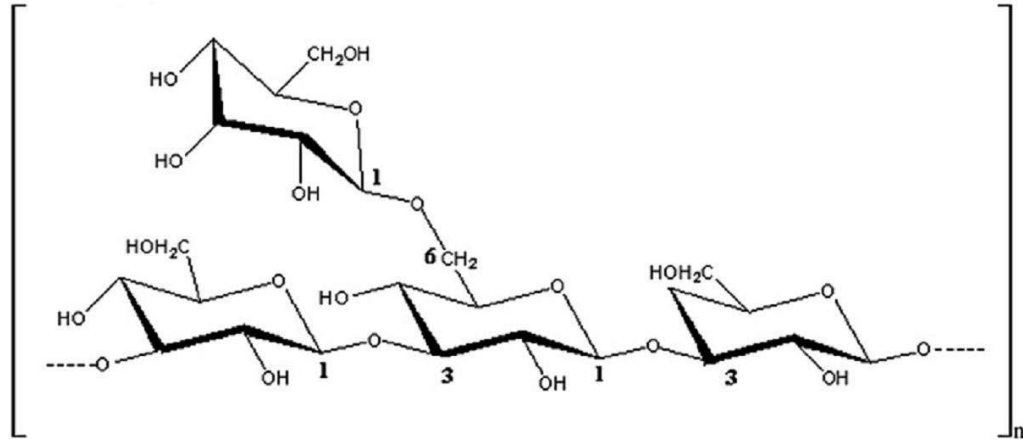
Ayrıca konakçı tepkisini uyardırma karın uygulamasının burun içine oranla daha etkili olduğu ispatlanmıştır [57].

Lentinan ile 98 hasta üzerinde iki aşamalı bir deneme daha yapılmıştır. İlk çalışmada 8 hafta süresince, haftada bir kez olmak koşuluyla 10 hastaya damar yolundan 2, 5 ya da 10 mg lentinan uygulanmışlardır. İkinci çalışmada ise, 20 hastadan oluşan iki grupta 12 hafta boyunca haftada 2 kez, 1 ya da 5 mg lentinan, 10 hastaya ise haftada 2 kez damar içinden plasebo (mannitol ve dekstran) vermişlerdir. Uygulamayı, fırsatçı enfeksiyonsuz, 18-60 yaş aralığındaki, hücrelerindeki CD4 (bir çeşit akyuvardır) seviyesi 200-500 olan, HIV-pozitif bireylerde yapmışlardır. Yan etkilerinin damara 30 dakikalık periyotlarla verildiğinde hafif olduğunu gözlemlemişlerdir. 10 dakikalık bir periyotta uygulanan ilk denemede, sırt ağrıları, bacak ağrıları, depresyon, kasılma, ateş, titreme, granülositopeni (kanda granülositlerin eksilmesi), anafilaktoid reaksiyonu ve karaciğer enzimlerinde artış gibi yan etkiler görmüşler ve bu yan etkilerden dolayı 4 hasta tedaviye devam edememiştir. Damar yoluna 30 dakikalık periyotla verilen ikinci deneyde ise herhangi bir yan etki rapor edilmemiştir. İlaç tedavisi bırakıldıktan sonra pek çok yan etkinin hafiflediğini ve 24 saat içerisinde de ortadan kalktığını görmüşlerdir. Araştırmacılar bu çalışmadaki bazı hastaların CD4 hücrelerinde bazılarının ise nötrofil aktivitesinde artışa rastlamışlardır. Ancak bu değerler istatistiksel olarak önemsiz görülmüştür. Anemi, lökopeni (kanda lökosit sayısının azalması), pankreatitis ya da nöropati (sinir sistemi hastalığı) gibi yan etkileri olmamasından dolayı lentinanın didanosine (ddI) ve zidovudine gibi ilaçlarla birlikte kullanılabilmesi düşünülmüştür. İkinci denemede yüksek p24 antijen seviyeli 10 hastadan lentinan kullananlardan 8 tanesinde, plasebo kullananların ise 2 tanesinde p24 antijen seviyelerinin düştüğünü görmüşlerdir [58]. Bu denemeden hemen sonra Gordon ve arkadaşları bu konuyla ilgili başka bir çalışma daha yapmışlardır. HIV hastalarına didanosine ile birlikte lentinan vermişler ve 38 haftalık kullanımdan sonra CD4 seviyesinde önemli oranda bir yükseliş olduğunu not etmişlerdir [59].

Isoda ve arkadaşları hastalığı tekrarlanmış ya da cerrahi müdahale yapılmamış kanser hastaları üzerinde lentinan içerikli besin etkisini incelemişlerdir. 36 hastanın ortalama hayatta kalma süresinin 13.6 ay olduğunu bulmuşlardır. Ortalama 47

haftalık periyotta (26-145 hafta) lentinan içerikli besinle beslenen hastaların hayatta kalma sürelerinin 7-12 haftalıklara oranla daha uzun olduğu tespit edilmiştir. CD14+ monositlerdeki lentinan-bağlayıcı hücrelerin oranının belirgin varyasyonlar (% 0.10-9.70, Medyan, % 1.60) sergilediği gözlemlenmiştir. Lentinanı bağlama kapasitesi yüksek olan grupların hayatta kalma sürelerinin (ortalama 16.3 ay), düşük olan gruba (ortalama 12.5 ay) kıyasla daha uzun olduğunu tespit etmişlerdir. Bu sayede lentinan-içerikli besinin karaciğer kanseri hastalarının yaşamasında etkili ve uzun süreli uygulamaların da daha yararlı olduğu ispatlanmıştır [60].

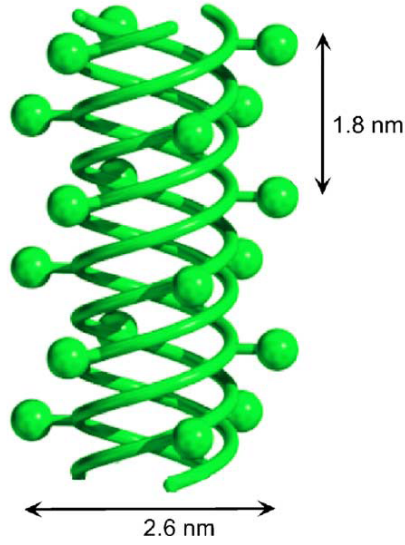
### 2.2.3.2.2.3. Schizophyllan



Şekil 2.15: Schizophyllanın kimyasal yapısı [53]

*Schizophyllum commune*'den izole edilen schizophyllan; her 3 tane  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glikoz iskeleti başına 1 tane (1 $\rightarrow$ 6)-glikoz biriminden meydana gelen bir çeşit  $\beta$ -glukandır (Şekil 2.15)  $6-12 \times 10^6$  g/mol moleküler ağırlığa sahip, suda sabit üçlü heliks yapısında iken (Şekil 2.16) dimetil sülfoksitte ise tek zincirli bir yapıda olduğu tespit edilmiştir [53, 61, 62]. Üçlü heliks yapısındaki bu sabitliğin i) düzenli yapısından ii) merkezindeki yoğun hidrojen ağından ve iii) ana zincir ve yanıl glikoz kısmı arasındaki hidrojen bağlarından ileri geldiği düşünülmektedir [63].





Şekil 2.16: Schizophyllanın heliks yapısı (Toplar yan zincirleri göstermektedir) [63]

Okamura ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada schizophyllanın klinik etkilerini değerlendirmek için radyasyon verilmiş 2. ve 3. seviyedeki 220 servikal kanserli hastayla çalışmışlardır. Her iki seviyedeki hastalarda da schizophyllanın tümör-azaltıcı etkisine rastlamışlardır. Hastalığın tekrarlama süresinin kontrol grubuna kıyasla schizophyllan uygulanmış 2.seviyedeki hastalarda daha uzun olduğunu bulmuşlar ancak kontrol grubu ve 3.seviyedeki hastalar arasında bu konuda belirgin bir farklılığa rastlamamışlardır. 48 aylık hayatta kalma eğrisi incelendiğinde kontrol grubu ve 3.seviyedeki hastalar arasında herhangi bir farka rastlanmazken 2.seviyedeki hastaların hayatta kalma oranının çok daha uzun olduğunu gözlemlemişlerdir [64].

Sakagami ve arkadaşları, mitojen ile uyarılmış insan periferik kan mononükleer hücrelerinden interferon-gamma (IFN-gamma) ve interlekin 2 (IL 2) üretiminde schizophyllanın etkisine bakmışlardır. Phytohemagglutin (PHA) ya da concanavalin A (con A) ile uyarılmış periferik kan mononükleer hücrelerinin kültür ortamındaki IFN-gamma ve IL 2 seviyelerini radyoimmunoassay ve enzim ilintili immün testiyle (ELISA) ölçtüklerinde, schizophyllanın sitokin üretimini önemli ölçüde arttırdığını gözlemlemişlerdir. Bu sonuçlar; IFN-gamma ve IL 2 üretimindeki bu artışın glukanın tümör-önleyici işlevinden kaynaklandığını göstermiştir [65].

Schizophyllanın sarcoma 180'e karşı da tümör-önleyici bir etkiye sahip olduğu keşfedilmiştir. Ancak bu aktivitenin solüsyondaki schizophyllanın üçlü heliks miktarıyla ilgili olduğu ve % 50'den daha az üçlü heliks yapısı içeren sıvı solüsyonların potansiyel tümör-önleyici işlevlerinin olmadığı görülmüştür [66].

Schizophyllandan farklı konularda da yararlanılmıştır. Munenori ve arkadaşları yeni bir polianilin (PANI) nanofiber yapı oluşturmak için schizophyllanı kullanmışlardır (Şekil 2.17). Mannoza-değiştirilmiş schizophyllan polianilin ile sarılmış ve lektine bağlanabilen nanofiberler meydana getirilmiştir. Sonuçlar; schizophyllanın polianilinin tek-boyutlu üst yapıya dönüşümü için yeni bir konakçı olarak rol oynayabileceğini ispatlamıştır [67].



Şekil 2.17: Schizophyllanın polianilin ile nanofiber yapı oluşturmasının şematik görünümü [67]

Kazuya ve arkadaşları geliştirdikleri yeni bir teknikle schizophyllanın tek zinciriyle kolesterolden bir kompleks oluşturmuşlar ve oluşan bu kompleksin de antisense-oligonükleotit taşıyıcısı (Genetik bozukluk ya da enfeksiyonlarda hastalık yapıcı genin tespit edilmesi durumunda bu gen tarafından üretilen mRNA'ya bağlanacak nükleik asit dizisi sentezlenir ve onu etkisizleştirir. Bu sentezlenen nükleik asite verilen isimdir.) olarak kullanılabileceğini görmüşlerdir [68].

Kazuo ve arkadaşları ise schizophyllanın polinükleoitli bir kompleks oluşturabildiğini ve böylece antisense etkiyi arttırdığını bulmuşlardır [69].

### 2.2.3.3. $\beta$ -glukanın kullanım alanları

#### 2.2.3.3.1. Bağışıklığı arttırıcı özelliği

Son zamanlarda, enfeksiyon hastalıklarına karşı konakçının tepkisini anlamaya yönelik pek çok çalışma yapılmaktadır. Bağışıklık sistemi hücreleri tarafından üretilen yeni hücre yüzeyi ve çözünebilir sinyal moleküllerinin mikroorganizmalara karşı konakça tepkilerini düzenlediği tespit edilmiştir. Bu moleküllerin bulaşıcı organizmalara karşı uygun tepkiyi yönlendiren dengenin devamlılığını sağladığı düşünülmektedir. Araştırmacılar bağışıklık hücrelerinin biyolojik tepkilerini negatif ya da pozitif yönde düzenleyen ve mikroorganizmaların sebep olduğu enfeksiyonlara karşı konakçı direncini arttıran pek çok bileşikle karşılaşmışlardır. Protein, peptit, lipopolisakkarit, glikoprotein ve lipit türevleri gibi peptitler bu moleküllere en bilinen örneklerdendir. Polisakkaritlerin daha yararlı biyolojik özellikleri olduğu düşünülse de belirli polimerler de bağışıklığı arttırıcı etkenler olarak görev yapmaktadır. Bu görüş, klinik uygulamalarda işe yarayan ve biyolojik işlev gösteren polisakkaritleri odak noktası yapmıştır. Bu polisakkaritler içinde en çok kullanılan ise *Saccharomyces cerevisiae* hücre duvarından izole edilen  $\beta$ -glukanlardır.

Hücrelerin sinyal etkileyici fonksiyonları aracılığıyla nasıl iletişim kurduklarını anlama üzerine yapılan çalışmalarla, konakçı tepkilerini etkilemek için bu sinyal basamaklarının düzenlenmesinin mümkün olduğu bulunmuştur. Konakçı tepkisini arttırmak ya da azaltmak suretiyle bağışıklık sistemiyle etkileşime girebilen ve bu bağışıklığı düzenleyen bileşikler bağışıklık düzenleyicileri ya da biyolojik tepki değiştiricileri olarak adlandırılmaktadır. Bileşiklerin bağışıklık tepkilerinin arttırılması ya da baskılanması; bileşiğin verilmesi, yöntemi ve dozu gibi faktörlere bağlı olduğu ve bu bileşiklerin gösterdiği aktivite türünün işlev mekanizmasına ya da aktivite kısmına göre değiştiği tespit edilmiştir.

$\beta$ -1,3-glukan örneklerinin biyolojik özellikleri 1960 yıllarından beri çalışılmaktadır. Bu moleküllerin tümör önleyici aktivite gibi geniş bir biyolojik fonksiyon göstermesinin yanı sıra enfeksiyon hastalıklarını önleme yeteneğine de sahip olduğu tespit edilmiştir. Pek çok deney,  $\beta$ -1,3-glukanın, konakçı bağışıklık sisteminin

hücresel ve hümorale (sıvısal) bileşenlerini uyarma kabiliyetini kanıtlamıştır. Temel olarak, bu moleküller mononükleer hücrelerin ve nötrofillerin mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonları önleyici özelliklerini ve makrofajların fonksiyonel aktivitelerini arttırdığı bulunmuştur.  $\beta$ -1,3-glukanların ayrıca monosit ve makrofajların çoğalmasını da uyardığı ve potansiyel kan yapıcı özellik gösterdiği ispatlanmıştır.

$\beta$ -1,3-glukanların enfeksiyon önleyici aktiviteleri, bakterilerin, fungusların, parazitlerin ve virüslerin sebep olduğu hastalıkları hayvan modellerinde test edilmiş, ancak daha çok deneysel bakteriyel hastalıklar üzerine çalışmalar yapılmıştır. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Mycobacterium leprae* enfeksiyonlarıyla çalışılmıştır. Her durumda da,  $\beta$ -1,3-glukan uygulaması enfekte hayvanlarda bakteri sayısını ya da ölüm oranını azaltarak yararlı etkiler sağlamıştır [70, 71].

Reynolds ve arkadaşları glukanın enfeksiyon hastalıklarına karşı konakçı direncinin spesifik ya da spesifik olmayan bağışıklık artışına yol açtığını kanıtlamak için fare, sıçan ve maymunlarla deneyler yapmışlardır. Farelere mikroorganizma yüklemesinden önce glukanın damardan verilmesi, Venezuelalı equine encephalomyelitis (VEE) virüsüne ya da Rift Valley fever virüsüne karşı hayatta kalma oranını önemli derecede arttırmıştır. VEE yüklemesinden sonra uygulanan glukan, kontrol grubuna kıyasla yaşama oranını arttırmamıştır. Glukan burun içinden değil de damar yoluyla verildiğinde, sıçanlara mikroorganizma yüklemesinden önce yapılan glukan uygulaması, düşük dozlarda, intraperitoneal olarak yüklenen *Francisella tularensis*'e karşı direnci yükseltmiştir. Yüklemeden önce damar yoluyla verilen glukan hayatta kalma oranını arttırmazken *Pseudomonas pseudomallei*'li burun yoluyla yüklendiklerinde burundan uygulanan glukan farelerde yaşama oranını fazlalaştırmıştır. VEE aşısıyla birlikte glukan verilen fareler, yalnız aşı verilen farelere göre homolog virüs yüklemesine karşı daha fazla direnç göstermiştir. Benzer şekilde, VEE aşılı glukanlı maymunlardaki birincil ve ikincil VEE antikor titreleri aşı kontrolündekinden önemli ölçüde daha büyük olmuştur [72].

Hofer ve arkadaşları glukanın gama-ışınına maruz bırakılmış fareler üzerindeki etkilerine bakmışlardır. Tanecikli ve çözünebilir formlar olarak iki farklı glukun tipiyle çalışılmıştır. Bu araştırmada radyasyon zamanı (ilk ya da son radyasyon uygulaması), çeşitli glukun rejimlerinde glukun kullanımı (tek ya da tekrarlı radyasyon), tıbbi ilaç kullanımı ile birlikte uygulanması (sistaminle ya da prostaglandin sentezini baskılayan maddelerle glukunın beraber kullanımı) ve glukunlu tedavinin negatif yan etkileri üzerine çeşitli yöntemler incelenmiştir. Radyasyona maruz kalmamış farelerle de denemeler yapılmıştır. Sonuçlar; glukunın akut radyasyon hastalıklarının gidişatını pozitif yönde etkilediğini göstermiştir. Hematopoez (kan yapımı) uyarımının, glukunın radyasyondan koruyucu etki mekanizmalarından en önemlisi olduğu bulunmuştur [73].

Vetvicka ve Vetvickova maya-kaynaklı iki farklı  $\beta$ -glukunın farelerde makrofaj aktivitesini ve kan kolesterol seviyesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Makrofajları uyarıcı etkisini inceledikten sonra glukunın kan kolesterolünü düşürme kapasitesi ölçülmüştür. Maya  $\beta$ -glukunı içeren besin tüketiminin uygulanan doza bağlı olarak farelerde plazma kolesterol seviyesini düşürdüğü tespit edilmiştir. Ayrıca bu glukunların monosit ve makrofajları da uyardığı gözlemlenmiştir [74].

Walinder ve arkadaşları glukunın farelerde  $^{90}\text{Sr}$ -kaynaklı osteosarkom gelişimi ve kanserli lenfom oluşumunu ve retikoloendotelial sistem (RES) üzerine etkisini incelemiştir. Glukun, karaciğer ve dalağın büyümesini ve plazmadaki lizozom seviyesini arttırarak retikoloendotelial sistemi uyarıcı bir etki göstermiştir.  $^{90}\text{Sr}$ 'a maruz bırakıldıktan sonra 150-250 gün boyunca uygulanan glukun enjeksiyonlarının fibroblastik tipte osteosarkom görülmesini baskıladığı ve kanserli lenfom çıkışını uyardığı gözlemlenmiştir. Ayrıca glukunın  $^{90}\text{Sr}$ 'a maruz kalmamış farelerde tümör etkisi yaratmadığı tespit edilmiştir [75].

Pelizon ve arkadaşları *Saccharomyces cerevisiae*'dan izole edilen  $\beta$ -glukunın mantar ve doğal öldürücü fonksiyonu ve sitokin üretimindeki etkisini araştırmışlardır. Dişi farelerin dalak ve peritoneal hücrelerine 20 ya da 100  $\mu\text{g}$  glukun enjekte (24 veya 48 saat) edilmiştir. *Saccharomyces cerevisiae* uyarıcı olarak kullanıldığında in vivo'da (canlı dokular üzerinde)  $\beta$ -glukun uygulamasının daha fazla IL-12 ve TNF- $\alpha$  üretimi

için dalak hücrelerini uyardığı tespit edilmiştir. Ayrıca  $\beta$ -glukan hedef hücrelere karşı doğal öldürücü dalak hücresi aktivitesini de arttırmıştır [76].

Akinobu ve arkadaşları ekmek mayasından izole ettikleri  $\beta$ -1,3-glukanın bağışıklık aktivitesini, tümöre ve radyasyona karşı fonksiyonunu incelemiştir. Farelere 0, 200, 400 ve 800 mg/kg oranlarında glukan uygulanmıştır. Glukanın tümör önleyici etkisi doğal ve lenfokin-etkinleştirici öldürücü hücre aktivitesi ve tümör hacmi ölçülerek değerlendirilmiştir. Bağırsak hücrelerinin mikroskopik görünümü, ağırlığı ve hayatta kalma oranındaki değişimler de glukanın radyasyonu önleyici etkisine bakmak için kullanılmıştır. Hücresel sitotoksikite ölçümlerine göre, doğal ve lenfokin-etkinleştirici öldürücü hücrelerinin aktivite seviyeleri kontrol grubuna kıyasla glukan uygulanmış olanlarda daha yüksek bulunmuştur. Glukanın bağışıklık fonksiyonundaki rolü, glukan-muameleli gruptaki tümör oluşumunun baskılanmasıyla belirlenmiştir. Bu gruptan, radyasyondan sonraki ağırlık kaybının baskılanması ve hayatta kalma oranının incelenmesinde de yararlanmışır. Bağırsak hücrelerinin fotomikrografları da glukanın radyasyondan koruyucu işlevini doğrulamıştır [77].

DiLuzio ve Williams normal ve lösemili farelerde  $\beta$ -1,3-glukanın *Staphylococcus aureus* kaynaklı ölüm oranına etkisini incelemiştir. Normal farelerde *Staphylococcus aureus* verilmeden 4 ve 7 gün önce damar yoluyla aktarılan glukanın hayatta kalma oranını arttırdığı tespit edilmiştir. Böbreklerin histolojik değerlendirmesi, glukanın sistemik *Staphylococcus* türlerinin yol açtığı hastalıkların neden olduğu renal nekrosisi engellediğini göstermiştir. Ayrıca yapılan çalışmalar glukan uygulamasının sadece lösemili farelerin değil aynı zamanda staphylococcal septisemili, lösemili farelerin de hayatta kalma oranını arttırdığını ispatlamıştır [78].

Kokoshis ve arkadaşları da glukanı deneysel olarak Gram-pozitif bakteremi oluşturulmuş farelerde denemiştir. Çözünen glukan, damar içine verildikten sonra serum lizozom konsantrasyonunu kontrol grubuna oranla yaklaşık 7 kat arttırdığı belirtilmiştir. Serum lizozomundaki bu artışın fagositozu ve makrofaj hiperplazisini (makrofaj hücrelerinin anormal çoğalması) de uyardığı gözlemlenmiştir. Ayrıca

sistemik olarak *Staphylococcus aureus* ile yüklendiklerinde glukan uygulaması büyük ölçüde hayatta kalma oranını da yükseltmiştir [79].

Olson ve arkadaşları vitronectinin etkinliğini arttırmak için  $\beta$ -glukanı kullanmışlardır. Vitronectin; funguslara bağlanan ve bu organizmaların makrofajlar tarafından fark edilmesini kolaylaştıran bir çeşit konakçı glikoproteini olarak tanımlanmıştır. İlk olarak  $\beta$ -glukanla uyarılmış alveolar makrofajlardan TNF- $\alpha$  salınım miktarına bakılmıştır. En fazla TNF- $\alpha$  salınımına ortalama değerdeki  $\beta$ -glukan konsantrasyonlarında (100-200  $\mu$ g/ml) rastlanmıştır. İkinci basamak olarak  $\beta$ -glukanla vitronectin etkileşimi değerlendirilmiştir.  $\beta$ -glukanın TNF- $\alpha$  salınımını doğrudan da değiştirebileceği bunun yanı sıra vitronectinin spesifik olarak  $\beta$ -glukan'a bağlanabildiği ve fungusa karşı tepkisinde makrofaj TNF- $\alpha$  salınımını arttırdığı görülmüştür [80].

Battle ve arkadaşları  $\beta$ -1,3-glukanın makrofajlara bağlanmasının nükleer faktör-kappaB (NF $\kappa$ B) aktivasyonunu uyardığını ve sepsisin neden olduğu makrofaj apoptosisini (programlı hücre ölümü) engellediğini gözlemlemişlerdir [81].

Stashenko ve arkadaşları in vivo bir modelde glukanın enfeksiyon-kaynaklı alveolar kemik erimesindeki etkinliğini test etmişlerdir. Sprague-Dawley sıçanlarında periapikal kemik erimesi cerrahi olarak yaratılıp bölge oral yolla enfeksiyon kaptırılmıştır. Cerrahi işlemden 2, 4, 6, 9, 11, 13, 16 ve 18 gün önce ve işlem günü hayvanlara glukan, kontrol grubu için ise tuzlu su uygulaması yapılmıştır. Glukanın, nötrofil ve monosit sayısını arttırdığını ve nötrofilin fagositik aktivitesini yaklaşık olarak 2 katına çıkardığı tespit edilmiştir. Glukan-uygulanmış hayvanlarda kontrol grubuna kıyasla daha az enfeksiyon-kaynaklı periapikal kemik erimesi gözlemlenmiştir. Ayrıca glukan-uygulanmalı hayvanların pulpa nekrozunu (pulpa dokusunun ölümü) azaltarak daha az yumuşak doku yıkımına da sahip olduğu tespit edilmiştir [82].

Kernodle ve arkadaşları yaptıkları çalışmada methicilline dirençli *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* aşılamasından önce, sonra ve aşılama gününde damar içinden belirli dozlarda glukanı Gine domuzlarına vermişlerdir.

Methicilline dirençli *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* ile aşılanmış ve glukun alan Gine domuzları kontrol grubuna kıyasla enfeksiyonlara 2.5-60 kat daha yüksek direnç göstermişlerdir. En yüksek korumaya 1 mg/kg glukun dozunda rastlanırken daha yüksek ve düşük dozlarda etkinliğinin azaldığı gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra bakteriyel aşılama 24 saat sonra verilen glukun da enfeksiyonu önlemede etkili olmuştur. Sonuç olarak, glukun *Staphylococcus* türlerinin sebep olduğu apse oluşum riskini azalttığı böylece cerrahi enfeksiyonlara karşı korunmayı da sağladığı tespit edilmiştir [83].

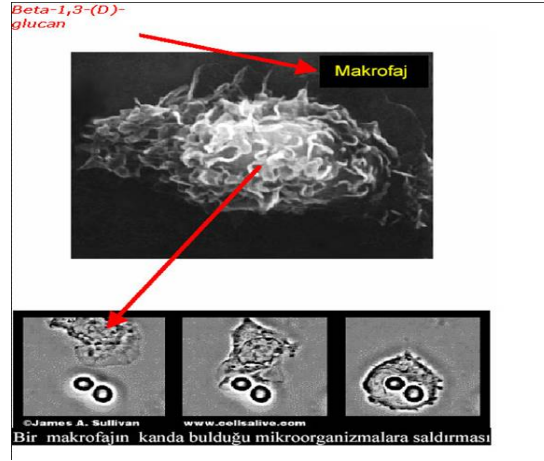
#### **2.2.3.3.2. Yem katkı maddesi olarak kullanımı**

Kanatlı hayvanlarda performansı, sağlığı ve ürün kalitesini etkileyen en önemli faktörlerden birisinin de mikroflora ve sindirim sistemi mikroflorasının birçok bakteri türünden meydana gelen kompleks bir ekosistem olduğu tespit edilmiştir. Doğal bağırsak florasının % 10'unu *E.coli*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Blastomyces*, *Pseudomonas* ve *Proteus* türlerinin, % 90'ını ise laktik asit üreten fakültatif anaerob bakteriler (*Lactobacillus*) ile anaerob *Bacteroides* ve *Fusobacterium* türlerinin oluşturduğu bulunmuştur. Yeni doğan civcivler, pH'sı 5-5.6 arasında değişen steril bir sindirim kanalına sahip olduğundan böyle bir ortamın patojen mikroorganizma türlerinin sindirim kanalına yerleşmesi için oldukça uygun bir ortam olduğu tahmin edilmektedir. İki hafta içinde ise bakteri popülasyonunun ince bağırsağa yerleştiği görülmüştür. Sağlıklı hayvanlarda sindirim kanalının sabit bir mikroflora ile sahip olduğu bilinmektedir. Hem mikroorganizmaların kendi aralarında hem de mikroorganizma ile hayvan arasında bir denge bulunduğu ve bakterilerin, sindirim kanalında sürekli seleksiyona tabi tutulduğu tespit edilmiştir. Bu seleksiyona yağ asitleri ve safra asidinin inhibitör etkisinin sorumlu olduğu bulunmuştur. Fiziksel farklılıklar nedeniyle genç ve ergin kanatlı hayvanlarda mikroflora, mikroorganizma sayısı ve çeşidi bakımından farklılık göstermektedir. İlk zamanlar mikrofloranın çok basit ve mikroorganizma sayısının azlığı düşünülürken bu durumun, laktik asit ve uçucu yağ asitlerinin üretiminin kısıtlanmasından dolayı civcivlerin sindirim kanalı pH'sının daha yüksek olmasından kaynaklandığı yapılan gözlemlerle kanıtlanmıştır. Bu koşullarda, *Escherichia coli* ve *Enterococcus*'lar civcivin bağırsağında kolaylıkla gelişebilmektedir. Mikrofloranın sabit ve dengeli bir



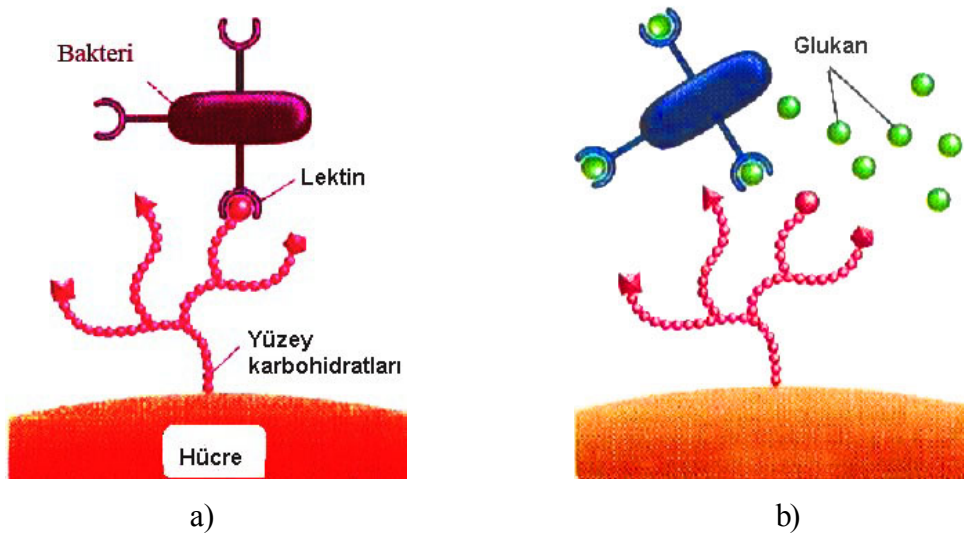
yapıya 3-6 haftada kavuştuğu ve artık ortamdaki baskın mikroorganizmaların *Lactobacillus*'lar olduğu görülmüştür. Ancak bu mikroflora birçok faktörün etkisiyle değişebilmektedir. Bu konuda mikroflorayı düzenleyen ve bağışıklığı arttıran yem katkı maddeleri önemli bir yere sahiptir [84]. Bu amaçla 1997 yılına kadar antibiyotikler kullanılmaktaydı. Ancak performans ve hayvan sağlığına olumlu etkilerde bulunmalarına rağmen, antibiyotikler; kas ve diğer bazı organlarda kalıntı bırakabildiklerinden, süt, yumurta, et gibi hayvansal ürünlere geçebildiğinden, bu tip gıdalarla beslenen insanlarda, söz konusu antibiyotikler zamanla birikebildiği gibi, bu insanların bünyelerinde dirençli yeni suşlar geliştiğinden 1997 yılında Avrupa Birliği'nce, 30 Eylül 1999 tarihinde de ülkemizde yem katkı maddesi olarak kullanımı yasaklanmıştır. Bunun üzerine alternatif yem katkı maddeleri araştırılmaya başlanmıştır. Bunlardan birisi de *Saccharomyces cerevisiae* hücre duvarından elde edilen  $\beta$ -glukanlardır.

$\beta$ -glukanların makrofajlara bağlanıp bu hücrelerin patolojik mikroorganizmaları öldürme yeteneklerini arttırarak onları daha aktif hale getirdiği, bu sırada makrofajların adedinin ve boyutlarının da arttığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda aktif hücrenin, bağışıklık sistemini güçlendirecek daha fazla fagositik hücre oluşumu için zincirleme reaksiyona sahip olan sitokinleri ürettiği bulunmuştur. Bu sinyal molekülleri, diğer makrofaj ve lenfositleri aktive etmektedir. Aktive edilmiş makrofajların da; enfeksiyon durumunda patojenlere saldırdığı, bu sayede spesifik antikor üretimini başlattığı görülmüştür (Şekil 2.18).



Şekil 2.18: Glukan tarafından uyarılmış bir makrofajın kanda mikroorganizmalara saldırması [82]

Patojen bakterilerin; lektin olarak isimlendirilen yüzey proteinleri ile sindirim kanalı epitelinde yüzey karbonhidratını bağladığı, glukanın lektinlere daha önce bağlanarak onları bloke ettiği gözlemlenmiştir. Böylece patojen bakterilerin bağırsak epiteline bağlanmasını önlediği, bu patojenler için tuzak görevi gördüğü ispatlanmıştır. Patojenler; bağırsaktaki epitel hücrelerine bağlanmak yerine glukanlara tutunmuş, kolonize olamadan dışarı atılmışlardır. Böylece bağırsak zararlı patojenlerden arındırılmış olmuştur (Şekil 19a ve 19b).



Şekil 2.19: Glukan varlığında ve yokluğunda bakterilerin, bağırsak epitel hücrelerindeki davranışı

Mikotoksinler yem malzemelerin üzerinde oluşan küflerin ürettikleri zehirli maddelerdir. Yemle alınan bu toksinlerin bağırsaklar tarafından emilerek karaciğere geldiği, metabolize olduğu, sonuç olarak da zafiyet, anemi, kanamalara, bağışıklık sisteminin zayıflamasına ve hastalıkların artmasına yol açtığı tespit edilmiştir. Hayvanların büyümesi, yaşam süresi, yumurta kabuk kalınlığı, yumurta randımanı gibi verim parametreleri azalmaktadır. Maya hücre duvarından izole edilen  $\beta$ -glukanın yüksek porositeye sahip olmasından dolayı sadece aflatoksini değil okratoksin, vomitoksin, T2-toksin, zearalenone, fumonisin gibi mikotoksinleri de tutuklayarak zararlarını önlediği görülmüştür [85-89].

Huff ve arkadaşları yaptıkları araştırmada broyler etlik civcivlerini *Escherichia coli*'den korumak amacıyla iki farklı  $\beta$ -1,3/1,6-glukan katkılı besinle çalışmışlardır. Civcivlere kuluçkadan çıktıktan bir gün sonra standart başlangıç yemi ya da 20 g/ton saf  $\beta$ -1,3/1,6-glukan içeren yemden verilmiştir. Glukanlı yemlerin bir kısmı devamlı verilirken yarısı ise mikroorganizma yüklemesinden 7 gün önce uygulanmıştır. 7. günde kuşların yarısı *Escherichia coli* ile yüklenmiş, yaşayan kuşların hepsine 25.günde otopsi yapılmıştır. Yem dönüşüm verimi 7 günlük beslemelerde *Escherichia coli* yüklemesinin olumsuz etkilerinden korunurken glukanın sürekli uygulanması durumunda böyle bir sonuca rastlanmamıştır. Ölüm oranı kontrol grubuna kıyasla (% 63) 7 günlük muamelede % 47'e, sürekli uygulamada ise % 53'e azalmıştır. Karaciğer ve kalbin bağıl ağırlıkları artarken bağıl yumurtalık ağırlığı azalmış, bu etkiler  $\beta$ -glukan muamelesiyle düzenlenmiştir. *Escherichia coli* yüklenmiş kuşlarda 7 günlük uygulamanın pozitif etkileri olmasına rağmen yüksüz kuşların vücut ağırlığı glukan muamelesiyle azalmıştır. Bu sonuçlar; glukan uygulamasının *Escherichia coli*'den kaynaklı üretim kayıplarının azalmasında etkili olduğunu göstermiştir [90].

Kogan ve Kocher ticari bir glukan örneğinin bakteriyel lektin bağlama kapasitesini test etmek için 4 bakteri cinsine ait 258 patojen türle aglütinasyon testleri yapmışlardır. Türler dünya üzerindeki farklı ülkelerden veterinerler tarafından sağlanmıştır. En yüksek aktiviteye en yaygın ve tehlikeli patojenler olan *Escherichia coli*, *Salmonella enteridis*, *Salmonella typhimurium* ve *Clostridium* türlerine karşı rastlanırken test edilmiş ürün bakteri türlerinin ortalama % 56'sında etkili olmuştur.

Böylece ürünün sağlık koruyucu ve performans arttırıcı özelliği in vitro testlerle tamamen onaylanmıştır. Bu ürünün domuz besini olarak kullanımı; bakterilerin karbonhidrat-bağlayıcı kısımlarını bloke ederek gastrointestinal epitel dokuya patojen bağlanmasını inhibe etmiş, besindeki mikotoksinlere bağlanarak toksik etkilerini engellemiş, ince bağırsağın mukus tabakasında yer alan lenfatik dokular olan Peyer plaklarındaki (lenf dokusu plakları) bağışıklık hücrelerini ve bağışıklık savunma mekanizmalarını uyarmış ve hayvan sağlığı ve verimliliğinin korunmasına yol açmıştır [91].

Hiss ve Sauerwein yaptıkları çalışmada domuzlarda maya hücre duvar bileşenlerinden  $\beta$ -1,3/1,6-glukanın bağışıklık fonksiyonu ve büyüme performansı üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Sütten kesilmiş 75 tane domuz yavrusu 4 haftalığına 3 farklı gruba ayrılmış, besinleri % 0, 0.015 ya da 0.03  $\beta$ -glukan içeriğiyle desteklenmiştir. Tüm hayvanlar domuz üreme ve solunum sendromuna karşı aşılanmıştır. 4 hafta sonra  $\beta$ -glukan uygulanan domuzların ortalama günlük kazanımları ile kontrol grubundakilerin aynı olduğu tespit edilmiştir. Besin verimi değişmeksizin besin alımı, % 0.03  $\beta$ -glukan içeriğiyle beslenen hayvanlarda önemli derecede ( $p < 0.01$ ) artmıştır. 4 haftalık uygulamanın sonundaki serum heptaglobulin konsantrasyonları, gruplar arasında bir farklılık olmaksızın ( $p > 0.05$ ) başlangıç seviyeleriyle kıyaslandığında tüm gruplarda yükselmiştir ( $p < 0.05$ ). Heptaglobulin seviyelerinin ortalama günlük kazanımla doğru orantılı olduğu tespit edilmiştir. Lenfosit oluşum indeksinin de kontrol grubu ve uygulamalı gruplarda benzer olduğu görüşmüştür. Çalışma sonucunda  $\beta$ -glukanın büyüme performansını olumlu yönde etkilediği sonucuna varılmıştır [92].

Staykov ve arkadaşları gökkuşağı balığı (*Salmo gairdneri irideus* G.) ve sazan balığında (*Cyprinus carpio* L.)  $\beta$ -glukan içerikli yemin büyüme performansı, hayatta kalma ve bağışıklık fonksiyonları üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Gökkuşağı alabalığı ve sazan balığının yem dönüşüm oranı, vücut ağırlığı ve hayatta kalma oranının  $\beta$ -glukan uygulamasıyla geliştiğini, serum lizozom konsantrasyonu ve tamamlayıcı aktiviteyle bu balıkların bağışıklık kapasitesinin arttığını tespit etmişlerdir [93].

Garcia-Ruiz ve arkadaşları 35-63 günlük tavşanlarda performans ve ölüm oranını ölçerek tavşan yemlerinde artan  $\beta$ -glukan (Fibosel®) seviyelerinin etkilerini çalışmışlardır. Farklı  $\beta$ -glukan içerikli (0, 50, 100, 150, 200 ve 250 ppm) 6 adet deneysel yem rasyonu hazırlanmıştır. Kontrol besini ve 50, 100, 150, 200 ve 250 ppm  $\beta$ -glukan katkılı yemlerde ayrı kafeslerdeki tavşanlarda 7, 5, 5, 4, 4 ve 4 tane ölüme rastlanmıştır. Kafeslerde yetiştirilen tavşanların performansına bakıldığında 100 ve 150 ppm  $\beta$ -glukan katkılı yemle beslenen hayvanların 63 gün sonra kontrol grubuna kıyasla daha yüksek vücut ağırlığı, ağırlık kazanımı ve besin alımına sahip olduğu görülmüştür. Grup halinde yetiştirilen tavşanlarda, vücut ağırlığı ve ağırlık kazanımındaki  $\beta$ -glukan etkisi de araştırılmıştır. Bu hayvan gruplarında, 50 ve 150 ppm  $\beta$ -glukan katkılı yemle beslenmiş tavşanlar kontrol grubuna oranla daha yüksek vücut ağırlığına (% 5.50) ve ağırlık kazanımına (% 9.80) sahipken, 100 ppm  $\beta$ -glukan içerikli yemle beslenen tavşanlarda bu parametrelerin ortalama değerlerde olduğu görülmüştür. Belirgin farklılıklar not edilmemesine rağmen kontrol grubuna kıyasla 150 ppm  $\beta$ -glukanlı besinle beslenen tavşanlarda daha düşük ölüm oranına rastlanmıştır. Sonuç olarak; 150 ppm  $\beta$ -glukan içerikli besinler, tavşanın büyüme performansını geliştirirken ölüm oranını da azaltmıştır [94].

Siwicki ve arkadaşları yaptıkları çalışmada gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) *Yersinia ruckeri* aşılmasından sonra  $\beta$ -1,3/1,6-glukanın antikör salgılayıcı hücrelerine ve spesifik Ig seviyelerine etkisini incelemişlerdir. Balıklar her gün 0.50 g/100g (% 0.50) dozlarda  $\beta$ -1,3/1,6-glukan içeren peletlerle beslenmiştir. Bir haftalık uygulamadan sonra balıklara aşı takviyesiyle bağışıklık kazandırılmıştır. Bu işlemde 7, 14, 21, 28 ve 40 gün sonra, bağışıklık çalışmaları için her gruptaki 20 balıktan kan ve pronephros (böbrek gelişiminin ilk evresinde omurgalılarda gelişen üç boşaltım organının en basiti) alınmıştır. Yapılan analizler sonucunda  $\beta$ -1,3/1,6-glukanın serumdaki spesifik Ig seviyesini ve spesifik antikör salgılayıcı hücrelerin sayısını arttırdığı bulunmuştur. Kısacası bu araştırmada elde edilen sonuçlar  $\beta$ -1,3/1,6-glukanın, balıklarda *Yersinia ruckeri*'ya karşı yapılan aşısının etkilerini arttırdığını göstermiştir [95].

Bonaldo ve arkadaşları Avrupa'da yetişen bir çeşit deniz levreğinde (*Dicentrarchus labrax*)  $\beta$ -1,3/1,6-glukan beslemesinin doğal (doğuştan gelen) ve uyarılan bağışıklık

tepkileri üzerindeki etkilerine bakmışlardır. Çalışma süresince iki deneme yapılmıştır. İlk denemede  $\beta$ -glukan beslemesinin belirli gün aralıklarında (4, 7, 10, 14, 21 ve 25 gün) çeşitli bağışıklık parametrelerine etkileri incelenmiştir. Deney süresince farklı besleme gruplarından alınan pronephroslarındaki makrofajlarda oksidatif patlama (özellikle nötrofil ve monositler gibi bağışıklık hücrelerinde hidrojen peroksit gibi rekatif oksijen türlerinin salınımı) farklı zamanlarda artmış ve azalmıştır. 250 ppm  $\beta$ -glukan yem katkısı ile beslenen balıkların pronephroslarındaki makrofajlar 21.günde kontrol grubuna kıyasla yüksek seviyede oksidatif patlama aktivitesi göstermiştir. Bu deneme süresince lizozim aktivitesinde önemli bir değişime rastlanmamıştır. İkinci denemede ise  $\beta$ -glukan beslemesinin alginat-kaplı *Vibrio* aşısının oral yolla uygulandığı balıkların bağışıklık tepkisine etkileri üzerine çalışmışlardır. Serum lizozim aktivitesi ilk deneyde elde edilen sonuçlardan daha yüksek olarak bulunmasına rağmen tüm denemelerdeki makrofajların oksidatif patlama ve serum lizozim aktivitesinde düşüşe rastlanmıştır. *Vibrio* aşısı verilmiş balıklarda 2.haftada yapılan son aşılama ile antikor tepkisinde önemli derecede yükseliş görülürken,  $\beta$ -glukanın bu seviyelerin değişimini etkilemediği görülmüştür. *Vibrio* aşısının tüm bağışıklık sisteminin uyarılmasına yol açarak  $\beta$ -glukanın sebep olduğu herhangi bir uyarıcı etkiyi maskeleyebilmiş olabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak; *Dicentrarchus labrax*'a uygulanan  $\beta$ -glukanın bağışıklığı arttırdığı tespit edilmiştir [96].

#### 2.2.3.3.3. Mayonez yapımında kullanımı

Worrasinchai ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, mayonezdeki yağ yerine, atık bira mayasından hazırlanmış  $\beta$ -glukanın kullanımını ele almışlardır. Yağ, 25B, 50B ve 75B formülasyonları olarak ifade edilen % 25, 50 ve 75 seviyelerindeki  $\beta$ -glukanla değiştirilmiştir. Kontrol grubu olarak  $\beta$ -glukan içermeyen tam yağlı mayonez kullanılmıştır. Tam yağlı ve az yağlı mayonezin fizikokimyasal, akışkanlık ve mikrobiyolojik analizleriyle duyuşal değerlendirmeleri yapılmıştır. Sonuçlar; tüm az yağlı mayonezlerin tam yağlı karşılıklarına göre daha düşük enerji içeriğine fakat daha yüksek su hacmine sahip olduğunu ve bu farklılıkların  $\beta$ -glukanın miktarı arttıkça yükseldiğini göstermiştir. pH'a bakıldığında ise bir günlük muhafazadan sonra tüm mayonezler arasında belirgin farklılıklara rastlanmamıştır. Buna rağmen,

iki aylık depolama evresinden sonra az yağlı örneklerin pH değerleri gluklan miktarı arttıkça azalmıştır. Yapı bakımından 50B ve 75B formülasyonları tam yağlı örnektekiyle benzer özellikler göstermiştir. Tüm mayonezlerin mikroorganizma yükleri depolama süresince kabul edilebilir sınırlarda olmuştur. Az yağlı mayonezlerin tam yağlı mayonezlere göre daha yüksek raf ömrüne sahip oldukları gösterilmiştir. Bu da mayonez yapımında yağ yerine  $\beta$ -glukanın kullanılabilmesini ispatlamıştır. Böylece düşük kaloriye sahip  $\beta$ -glukanlı mayonezleri kullanan bireylerde kalp hastalıkları, hipertansiyon ve obezite oluşumunun en aza indirilebileceği düşünülmüştür [97].

#### **2.2.3.3.4. Krem yapımında kullanımı**

$\beta$ -glukandan krem yapımında da yararlanılmaktadır. Vücuttaki en büyük bağışıklık sistemi organı olan ciltteki Langerhans hücrelerinin cilt bütünlüğünün devamlılığını sağlamaktan sorumlu olduğu ve bu bütünlüğün güneşe, yaralanmalara, yabancı maddelere, kimyasallara ve kirlilik etmenlerine maruz kalmaktan ileri gelen zararları önlemek için gerekli olduğu tespit edilmiştir. Fakat yaşlanmayla bağışıklık sisteminin yeni maddelere karşı savunması azalmaktadır.  $\beta$ -glukan içerikli kremin ise bu bütünlüğün yeniden sağlanmasının yanı sıra kırışıklıkları azaltmada, nem tutmayı ve deri içerisindeki moleküler haberleşmeyi geliştirmede, cilt esnekliğinin iyileştirilmesinde, epidermal beslenmeyi arttırmada etkili olduğu denemelerle ispatlanmıştır [8, 9].

Kanlayavattanakul ve Lourith çözünmeyen  $\beta$ -1,3-glukanı karboksimetilasyonla çözünür şekle dönüştürüp tıbbi ve kozmetik ürünler için biyolojik bir materyal olarak kullanmışlardır. Bu şekilde hazırlanan gluklanın yaşlanma ve kırışıklıkları önlemede kullanılabilmesinin yanı sıra cildi besleyici bir özelliği olduğunu da in vitro ve klinik çalışmalar sonucunda tespit etmişlerdir [10].

### **2.3. Literatür çalışması**

Ürünlerinin farklı alanlarda kullanılabilmesinden dolayı pek çok araştırmacı *Saccharomyces cerevisiae* maya hücresini parçalamak amacıyla birçok yöntem

geliştirmiştir. Tüm metotların ortak özelliği iki temel bileşen olan mannan ve glukanın birbirinden ayrılmasına yöneliktir [13, 98]. Yapılan ilk çalışmalarda genellikle maya hücreleri kimyasal yollarla parçalanmıştır. Northcote incelemeleri sonucunda mannan, glikojen ve glukanın sıcak 0.75 N NaOH ile maya hücresinden izole edilebileceğini tespit etmiştir. Alternatif olarak, maya hücresinin cam boncuklarla parçalanıp çökelti kısmındaki mannan ve glukanın da kimyasal ekstraksiyonla ayrılabilceğini bulmuştur [27].

Bu yönde yapılan çalışmalar *Saccharomyces cerevisiae* hücre duvarını parçalamak için farklı kimyasalların da kullanılabilceğini göstermiştir. Bu çalışmaların biri; eskiden beri maya hücre duvarını parçalamak için kullanılan HCl'in aşındırıcı yapısı, toksik etkisi ve atık problemleri nedeniyle, tıbbi uygulamalarda yararlanılan glukanın ekstraksiyonunda kullanılmasının sakıncalı güçlü bir asit olduğunu ve bu amaçla HCl yerine  $H_3PO_4$ ,  $CH_3COOH$  ve  $HCOOH$  kullanılıp kullanılmayacağı yönünde yapılmıştır. *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerini önce 0.75 N NaOH konsantrasyonunda 100°C sıcaklıkta tutup ayrı ayrı çöken kısımları 2.50, 1.75 ve 0.94 N HCl,  $H_3PO_4$ ,  $CH_3COOH$  ve  $HCOOH$  ile muamele etmişlerdir. Elde edilen çökeltiyi ilk olarak kaynar % 1 asidik etanolle ardından kaynar % 1 alkali etanolle muamele ettikten sonra distile suyla yıkayıp kurutmuşlardır. % 3-5 oranında verime ulaşmışlardır. Zayıf protik asitlerin HCl solüsyonuna göre daha büyük moleküler ağırlık, boyut ve polydispersity (çoklu dağılım) gösterdiğini bulmuşlardır. Ancak bu durumu asit konsantrasyonu ya da hidroliz süresini arttırarak değiştirilebilmişlerdir. Böylece bu asitlerin glukanın *Saccharomyces cerevisiae* hücre duvarından izolasyonunda kullanılabilceğini ortaya çıkarmışlardır [99].

Ohno ve arkadaşları zymosan'ın yapısı ve biyolojik işlevleri hakkındaki araştırmalarında, zymosan'ın temel olarak  $\beta$ -glukandan oluştuğunu ancak bir miktar mannan, protein ve nükleik asiti de içerdiğini ileri sürmüşlerdir.  $\beta$ -glukanın saflık oranını arttırmak için hücrelere NaClO uygulamışlardır [100].

Wang ve arkadaşları, *Saccharomyces cerevisiae*'dan  $\beta$ -glukanı izole etmek için hücreleri otoliz edip NaClO oksidasyonuna maruz bırakmışlardır. Yaptıkları çalışmada en yüksek otoliz oranına 52°C sıcaklıkta rastlamışlardır. Bu sıcaklıktan



sonra ise enzimler inaktive oldukları için otoliz oranının azaldığını görmüşlerdir. Otolizde rol oynayan enzimler düşük pH değerlerinde çalıştıklarından en uygun pH değerini de 5.50 olarak bulmuşlar ve ideal glukan verimine ulaştıklarını belirtmişlerdir [5].

Farklı kimyasallar kullanılmış başka bir çalışmada ise Magnani ve ekip arkadaşları ilk aşamada hücre duvarının direncini azaltmak için hücreleri 24 saat 55°C sıcaklıkta % 3 NaCl ile muamele ederek hücreleri ses dalgaları ile parçaladıktan sonra yağ içeriğini petrol eteriyle ortamdaki uzaklaştırmışlardır. Son olarak kalan proteinleri de ortamdaki uzaklaştırmak için özel bir enzim kullanmışlardır [101].

Hücre parçalanması için farklı cihazlar da kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan araçlardan biri homojenizatördür. Homojenizatörle hücre parçalanmasının etkinliği, uygulanan basınca ve darbe sayısına göre değişmektedir. Bunun yanı sıra homojenizatörle hücre yıkımı esnasında hücre şekli, hücre hacmi ve hücre duvarının kimyasal bileşenlerinin de önemli olduğu tespit edilmiştir [102, 103]. Kelemen ve Sharpe araştırmalarında *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerini homojenizatörde  $1.5 \times 10^8$  Pa basınçta parçalayabildiklerini ileri sürmüşlerdir [102]. Homojenizatör ve NaOH'in birlikte kullanıldığı başka bir çalışmada da araştırmacılar hücre içerisindeki proteinin büyük bir kısmını uzaklaştırdıklarını tespit etmişlerdir [104]. Kimyasal kullanımının hücre bileşenlerine zarar verdiğini düşünen Xiao-Yong Liu ve arkadaşları otoliz, sıcak su ve organik çözücü muamelesi, homojenizasyon ve proteaz hidrolizinden oluşan yeni bir ekstraksiyon metodu geliştirmişlerdir. Bu metotla geleneksel metotlar kıyaslandığında, daha yüksek verimde ve saflıkta  $\beta$ -glukan elde edilebildiğini ve bu polisakkaritin doğal yapısını bozmadıklarını ifade etmişlerdir [4]. Kimyasal kullanımının bu polisakkaritin yararlı etkilerini azalttığını düşünen başka araştırmacılar da hücreleri sıcak su muamelesi, su, organik çözücü ve proteaz uygulamalarından oluşan işlem basamaklarını uygulayarak yüksek saflıkta  $\beta$ -glukan elde etmişlerdir [2].

Hücre parçalanmasında kullanılan yöntemlerden bir diğeri ise ses dalgalarıyla (ultrasonikasyon) hücrelerin yıkımıdır. Ultrasonik dalgaların hücreler üzerindeki fiziksel ve kimyasal etkilerinin kaynağı akustik kavitezyon (yüksek enerji

dalgaları)'dur. Ultrasonik dalgaların fiziksel etkileri hücre yıkımı ve lipozom oluşumu gibi biyokimyasal uygulamalar için önemlidir [103]. Borthwick ve arkadaşları ultrasonik dalgalarla yaptıkları çalışmada maya hücre duvarını yıkmak amacıyla iki tip sonikatörden yararlanmışlardır. 267-kHz tübüler sonikatörle ölü hücre sayısı % 50.10 iken 20 kHz probu olan sonikatörle bu değer % 29.10 olarak tespit edilmiştir [105].

Mikroorganizmalardan biyoteknolojik ürünleri elde etmek amacıyla kimyasal ve fiziksel yöntemlerin yanı sıra biyolojik metotlar da geliştirilmiştir. Kimyasal parçalama metotlarında, protein ya da enzimlerin yapısı bozulabileceğinden biyolojik ya da mekanik yöntemler daha popüler olmuştur. Biyolojik işlemler, maya hücrelerini parçalayan enzim sistemleriyle hücrenin sindirimi ya da otolizini içermektedir [13]. Yüksek üretim verimine rağmen maliyetinden dolayı endüstride üreticiler tarafından çok fazla tercih edilen bir yöntem değildir. Mayanın enzimatik yıkımı; bakteri, bitki, maya ve hayvan kaynaklı enzim preparasyonlarıyla gerçekleştirilmektedir. Enzimatik yıkım maya inaktive edilmeden önce yapılırsa maya hücrelerinin kendi enzimleri de bu işleme katkıda bulunabilmektedir. Uygulanan enzim preparasyonları; proteolitik aktivite, hücre duvarı yıkım aktivitesi, amilaz ya da glikojen yıkım aktivitesi, RNA yıkım aktivitesi, lipolitik aktivite ya da deaminaz aktivite gibi aktivitelerin bir ya da birkaçını kullanarak hücreyi parçalamaktadır. Bu yöntemlerden birinde Milič ve arkadaşları maya özütü elde etmek amacıyla papain ve lyticase olarak isimlendirilen iki farklı enzim kullanmışlardır. Farklı konsantrasyonlarda kullandıkları enzimlerle hücreyi etkili bir biçimde parçalayabildiklerini ileri sürmüşlerdir [98].

Maya hücrelerinin parçalanması için enzim kullanılmış çalışmalardan bir diğeri ise Zlatković ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar ekmek mayası *Saccharomyces cerevisiae* hücre duvarındaki karbonhidratların yapısal özelliklerini incelemek amacıyla hücreleri asetat tamponu, NaOH, sıcak su ve asetik asitle muamele etmişler, saflık oranını arttırmak için de amilaz ve pullulanase enzimi uygulamışlar ve hücre duvarındaki glukanın yapısal özelliklerini tespit edebilecek kadar yüksek saflıkta bu polisakkariti elde etmişlerdir [33].

Kath ve Kulicke, maya hücresi *Saccharomyces cerevisiae* hücre bileşenleri mannan ve glukanları yapısal değişime uğratmadan izole etmek amacıyla çevreye zarar vermeyen enzimatik bir izolasyon yöntemi geliştirmişlerdir. İlk olarak hücre duvarını mekanik olarak parçalamak için cam boncuklar kullanıp petrol eteriyle lipitleri ortamdaki uzaklaştırmışlardır. Cam boncuklar ve petrol eteri atıldıktan sonra uyguladıkları enzim karışımları ile hücre duvarının dış tabakasını yıkarak mannan bileşimini çözünür hale getirmişlerdir. Kullanılan yöntemin endüstriyel olarak maliyetli olduğunu düşünmelerine rağmen çevre kirliliğine yol açmadığı ve hücre duvar polisakkaritlerinin doğal yapısını bozmadığı için etkili bir yöntem olduğu kararına varmışlardır [13].

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1. Laboratuvar

Bu araştırma, Kocaeli Üniversitesi Köseköy Meslek Yüksekokulu Fermentasyon Laboratuvarı'nda 2007-2010 yılları arasında yapılmıştır.

#### 3.2. Kullanılan Hammadde

Araştırmada İzmir Pakmaya Fabrikası'ndan elde edilen atık ekmek mayası (*Saccharomyces cerevisiae*) kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan hammaddenin bileşimi Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1: Araştırmada kullanılan atık ekmek mayasını (*Saccharomyces cerevisiae*) bileşimi

ATIK EKMEK MAYASI ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) BİLEŞİMİ	
Bileşen Adı	Bileşen Miktarı (%)
Protein	40-46
Karbonhidrat	30-37
Mineraller	7-8
Nükleik asit	6-8
Lipit	4-7
Nem	2-5

#### 3.3. Yöntem

##### 3.3.1. Deney Düzenegi

###### 3.3.1.1. NaOH konsantrasyonunun $\beta$ -glukan ekstraksiyonuna etkisi

İzmir Pakmaya Fabrikası'ndan temin edilen atık ekmek mayasından 200 g alınıp 1 l 1.50, 1.00, 0.75, 0.50 ve 0.25 N NaOH konsantrasyonlu çözeltiler içerisine ilave edilmiştir. Karışım 90°C sıcaklıkta 60 dakika ARED marka karıştırıcı ısıtıcıyla

sürekli karıştırılarak ısıtılmış ve oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Daha sonra sigma 3-16K marka santrifüjle 5000 devirde 5 dakika santrifüjlenerek üst sıvı atılmış ve geriye kalan çökelti kısmı 2 kez 1 l distile suyla yıkanmıştır. Yıkamanın sonunda numuneler elektro-mag M5040 marka etüvde  $105\pm 5^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta 15 saat kurutulduktan sonra toplam protein miktarları hesaplanmıştır.

### **3.3.1.2. Ekstraksiyon süresi, sıcaklığı ve yıkama sayısının etkisi**

Bölüm 3.2.1.1.'de protein içeriği açısından en düşük değeri veren NaOH konsantrasyonu sabitlenerek aynı işlem 65, 70, 80, 85 ve  $90^{\circ}\text{C}$  sıcaklıklarda, 30, 60, 90 dakika ve 1 ve 2 kez yıkamalar üzerine uygulanmıştır. Yıkamanın sonunda numuneler  $105\pm 5^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta 15 saat kurutulduktan sonra toplam protein miktarları hesaplanmıştır. En düşük protein değerini veren numunenin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri alınmıştır.

### **3.3.1.3. Farklı uygulamaların $\beta$ -glukan ekstraksiyonuna etkisi**

#### **3.3.1.3.1. Patent uygulaması**

Deneyin bu bölümünde B. A. Donzis tarafından oluşturulan metot temel alınmıştır [106]. Herbirinin içerisinde 200 g atk ekmek mayası bulunan 1 l 1.50 N ve 0.50 N NaOH konsantrasyonlu çözeltiler hazırlanmıştır. 0.50 N NaOH konsantrasyonuna sahip karışımlar  $90^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta 60 dakika karıştırıcı ısıtıcıyla devamlı karıştırılarak, 1.50 N NaOH konsantrasyonlu karışım ise 60 dakika NÜVE OT 032 marka otoklavda otoklavlanmıştır. Süre sonunda oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Otoklavlanan materyal santrifüjle 5000 devirde 5 dakika santrifüjlenerek üst sıvı atılıp geriye kalan çökelti kısmı 3 kez 1 l distile suyla yıkanmıştır. Suyla yıkanmış kısım  $85^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta 3 saat % 3'lük asetik asit solüsyonunda bekletilmiştir. Karışım 1 kez daha 1 l distile suyla yıkanmıştır. Geriye kalan çökelti 600 ml % 100 etanolle yıkanıp santrifüjlenmiştir. 0.50 N NaOH konsantrasyonunda  $90^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta 60 dakika bekletilen numunelerden biri bu basamakta kurumaya bırakılmıştır. Geriye kalanlardan alınan çökelti 600 ml aseton ile yıkanıp tekrar santrifüjlenmiştir. Numuneler etüvde  $105\pm 5^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta 15 saat

kurutulduktan sonra kuru madde, ham yağ, toplam protein, XRF’de inorganik madde (kül) ölçümleri yapılmıştır.

### **3.3.1.3.2. Sıcak su uygulaması**

Herbirinin içerisinde 200 g atık ekmek mayası bulunan 1 l 1.50 ve 0.50 N NaOH konsantrasyonlu çözeltiler ve 1 l distile sulu çözelti hazırlanmıştır. Süspansiyonlar 60 dakika otoklavlandıktan sonra oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. 5000 rpm’de 5 dakika santrifüjlenerek üst sıvı atılmış, NaOH içermeyen numune  $105\pm 5^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta 15 saat etüvde kurumaya bırakılmıştır. Diğer iki numune ise santrifüjden sonra 2 kez 1 l distile suyla yıkanıp santrifüjlenmiştir. Yıkamanın sonunda kalan çökelti etüvde  $105\pm 5^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta 15 saat süreyle kurutulup her iki numunenin de kuru madde miktarları yüzde olarak hesaplanmıştır.

### **3.3.1.4. Mantar ve maya $\beta$ -glukanı test prosedürü (Megazyme)**

0.50 N NaOH solüsyonunda  $90^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta 60 dakika bekletilip 2 kez yıkanmış numune (0.5N.90.60dk.2kz.), 1.50 N NaOH solüsyonunda otoklavlanmış patent prosesi uygulanmış numune (1.5N.P.), 0.50 N NaOH solüsyonunda otoklavlanmış 2 kez yıkanmış numune (0.5N.O.2kz.), 0.50 N NaOH solüsyonunda  $90^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta 60 dakika bekletilip patent prosesi uygulanmış numune (0.5N.90.60dk.P.), 0.50 N NaOH solüsyonunda  $90^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta 60 dakika bekletilip patent prosesi uygulanmış alkolden sonra alınmış numune (0.5N.90.60dk.P.A.S.) ve otoklavlanmış maya numunelerinin (O.M.H.) kurutulmuş örneklerinde glukan ölçümleri yapılmıştır. Kontrol grubu olarak da hiçbir işlem uygulanmamış maya örneği kullanılmıştır [107].

#### **3.3.1.4.1. Toplam glukan miktarı ölçümü ( $\alpha$ -glukan + $\beta$ -glukan)**

Daha önceden kurutulmuş ve elekten geçirilmiş numuneden 100 mg tüpe alınmıştır. Üzerine 1.50 ml konsantre HCl (% 37 v/v) ilave edilip elektro-mag M16 marka vorteks cihazında karıştırılmıştır. Karışım  $30^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta elektro-mag M96K isimli su banyosunda 45 dakika tutulup her 15 dakikada bir vorteks cihazında

çalkalanmıştır. Süre sonunda 10 ml distile su eklenip karıştırıldıktan sonra tüp kapakları gevşetilir 100°C sıcaklıktaki su banyosuna yerleştirilmiştir. 5 dakika sonunda kapaklar tekrar sıkıştırılıp numune 100°C sıcaklıkta 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Tüpler oda sıcaklığına soğutulduktan sonra 10 ml 2 N KOH ilave edilmiştir. Numune 100 ml'lik volumetrik balonlara aktarılmıştır, tüpleri temizlemek için 200 mM sodyum asetat tamponu (pH 5.0) kullanılarak distile su ile hacme tamamlanmıştır. Karışım 10 dakika 1500 g devirde (3840 rpm) santrifüjlenmiştir. Elde edilen ekstrattan 2 kopya şeklinde 0.10 ml tüplere pipetlenmiştir. Her tüpe hazırlanan ekzo-1,3-β-glukanaz + β-glukosidaz süspansiyonundan 0.10 ml ilave edilip karıştırılmıştır. Numune 40°C sıcaklıktaki su banyosunda 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İşlemin sonunda her bir tüpe 3 ml glikoz oksidaz/peroksidaz karışımı (GOPOD ayırıcı) eklenip 40°C sıcaklıkta 20 dakika bekletilmiştir. Bekleme işlemi biter bitmez spektrofotometrede 510 nm'de absorbans ölçülmüştür. Ayrıca her bir numune için 1 tane kontrol maya preparatı ve 4 kopya şeklinde de glikoz standardı ve ayıraç blankı oluşturulmuştur [107].

#### **3.3.1.4.2. α-glukan miktarı ölçümü**

Kurutulmuş ve elekten geçirilen numuneden 100 mg kapaklı tüpe koyulmuştur. Üzerine 2 ml 2 M KOH ilave edilmiş ve 20 dakika boyunca manyetik karıştırıcı üzerindeki buz/su banyosunda çalkalanmıştır. Karıştırarak 8 ml 1.20 M sodyum asetat tamponu (pH 3.8) ilave edilmiştir. 0.20 ml amiloglukosidaz+invertaz solüsyonu eklenip ters düz edilmiştir. Numune vorteks cihazında karıştırılarak 30 dakika 40°C sıcaklıktaki su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Karışım 10 dakika 1500 g devirde (3840 rpm) santrifüjlenmiştir. Elde edilen üst sıvıdan 2 kopya şeklinde 0.10 ml tüplere aktarılmıştır. Her tüpe 3 ml GOPOD ilave edilip 20 dakika süresince 40°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Inkübasyon bitince spektrofotometrede 510 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Ayrıca her bir numune için 1 tane kontrol maya preparatı ve 4 kopya şeklinde de glikoz standardı ve ayıraç blankı oluşturulmuştur [107].

### **3.3.1.5. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) incelemesi**

Numunelerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) incelemesi, BRİSA Mikro-inceleme Laboratuvarı'nda bulunan Jeol JSM-840A cihazında yapılmıştır.

#### **3.3.1.5.1. Numune hazırlanması**

Kurutulmuş toz şeklindeki numune, saçarak kaplayıcı (Sputter Coater) cihazı kullanılarak, iletken bir tabaka elde etmek için, yaklaşık 20 nm kalınlığında altın ile kaplanmıştır.

### **3.3.2. Analiz Yöntemleri**

#### **3.3.2.1. Kuru madde tayini**

Kuru madde tayini; yaş veya havada kuru maddenin belirli bir miktarının, belirli ısı derecesinde suyu uçurulduktan sonra kalan kısmının yüzde olarak hesaplanmasını baz alır. Yaş numune petrilere dökülerek etüvde 105±5°C sıcaklıkta 15 saat kurumaya bırakılmıştır. Bu süre sonunda numune sabit tartıma gelene kadar aynı sıcaklıkta bekletilmiştir. Tam kuruma sağlandıktan sonra numune 1 mm'lik elekten geçecek şekilde öğütülmüştür. Kurutma dolabında kurutulduktan sonra desikatörde soğutulmuş olan petri kabının darası alınmıştır. Öğütülmüş numuneden petri kabına 5 g alınıp 105±5°C sıcaklıkta 60 dakika daha bekletilmiştir. Oda sıcaklığına soğutulduktan sonra tartılıp gerekli hesaplamalar yapılmıştır.

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

a =Dara (g)

b =Dara+numune (g)

c =Dara+kuru madde (g) [108]

#### **3.3.2.2. XRF kül tayini**

Önceden kurutulmuş numuneden 4 g, bağlayıcı wax örneğinden ise 0.9 g alınıp SpectroMill markalı bilyeli agad değirmeninde 4 dakika öğütülerek homojenize



edilmiştir. Daha sonra bu karışım 15 ton basınç altında 1.5 dakika süre ile preslenerek tablet haline getirilmiştir. Bu tablet Spectro X-Lab 2000 markalı EDXRF cihazında Tq-3756 isimli screening analiz yöntemi kullanılarak kantitatif olarak analiz edilmiştir.

### 3.3.2.3. Toplam protein ölçümü (Kjeldahl protein)

Kjeldahl balonu içerisine 1 g numune tartılmıştır. Numune üzerine 3 g katalizör (selen reaktifi;  $\text{CuSO}_4+\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ve 15 ml teknik sülfürik asit ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) ilave edilmiştir. Balon Gerhardt TT 625M marka yakma ünitesine yerleştirilmiş ve sıcaklık  $420\pm 10^\circ\text{C}$ 'ye ulaştıktan sonra 60 dakika bekletilmiştir. Yakma işlemi tamamlandıktan sonra balon soğutulup üzerine 40 ml distile su ilave edilerek seyreltilmiştir. Ayrı bir erlenmayer içerisine de az miktarda protein içeren numuneler (% 15'ten az) için 15 ml, fazla proteinliler için ise 20 ml 7 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  eklenmiştir. Sülfürik asit üzerine 7-8 damla metil kırmızısı indikatörü ve bir miktar distile su ilave edilmiştir. Numune 9 dakika damıtmaya bırakılmıştır. Damıtma sonunda 7 N NaOH ile titre edilmiştir.

$$\% \text{ Toplam Azot} = [(a-b) \times 6.25] / m \times 100$$

a =Erlenmayere konulan 7 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  miktarı (ml)

b =Titrasyonda sarf edilen 7 N NaOH miktarı (ml)

m =Alınan örnek miktarı (g)

6.25 = Sabit [109]

### 3.3.2.4. Toplam yağ tayini

Yağ analizi, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (T.Ü.B.İ.T.A.K.) Marmara Araştırma Merkezi Gıda Enstitüsü tarafından AOAC 991.36,2005 nolu metotla, asit hidrolizi uygulamalı soxtec sistemiyle yapılmıştır [110].

### 3.3.2.5. Mantar ve maya $\beta$ -glukanı tayini (Megazyme)

Bu metot; maya ve mantarlardaki (1-3) (1-6)- $\beta$ -glukan ölçümü için kullanılmaktadır. Aynı numune için öncelikle toplam glukan daha sonra da  $\alpha$ -glukan miktarları tespit

edildikten sonra (1-3) (1-6)- $\beta$ -glukan miktarı hesaplanmıştır. Analiz yöntemindeki standart hata <math>\leq 5\%</math> tir [107].

### 3.3.2.5.1. Toplam glukan miktarı tayini ( $\alpha$ -glukan + $\beta$ -glukan)

Toplam glukan miktarı elde edilen absorban değerleri kullanılarak aşağıda verilen formülle hesaplanmıştır.

$$\begin{aligned}\text{Toplam Glukan (\%w/w)} &= \Delta E \times F \times 100 / 0.1 \times 1 / 1000 \times 100 / W \times 162 / 180 \\ &= \Delta E \times F / W \times 90 \text{ [107]}\end{aligned}$$

### 3.3.2.5.2. $\alpha$ -glukan miktarı tayini

$\alpha$ -glukan miktarı spektrofotometrede okunan absorban değerleri kullanılarak aşağıda verilen formülle hesaplanmıştır.

$$\begin{aligned}\alpha\text{-Glukan (\%w/w)} &= \Delta E \times F \times 103 \times 1 / 1000 \times 100 / W \times 162 / 180 \\ &= \Delta E \times F / W \times 9.27\end{aligned}$$

$$\beta\text{-Glukan} = \text{Toplam Glukan (+oligomerler vb)} - \alpha\text{-Glukan (+oligomerler vb)}$$

$\Delta E$  = Reaksiyon absorbanı – blank absorbanı

F = D-glikoz absorbanını  $\mu\text{g}$ 'a çevirme faktörü

= 100 ( $\mu\text{g}$  cinsinden D-glikoz standardı)/100  $\mu\text{g}$  D-glikoz standardı için

GOPOD absorbanı

100/ 0.10 = Hacim ayar faktörü (Toplam glukan için)

103 =  $\alpha$ -Glukan için hacim ayar faktörü

1/1000 =  $\mu\text{g}$ 'dan mg'a çevirme

100/W = 100 mg'a çevirme

W = Numune miktarı (g)

162/180 = Serbest D-glikozdan anhidroglikoza çevirme faktörü [107]

## 3.4. İstatistik

NaOH konsantrasyonuna ve uygulamalara bağlı olarak protein değerinde meydana gelen değişimler ve uygulamalara bağlı olarak toplam glukan,  $\alpha$ -glukan ve  $\beta$ -glukan değerlerindeki farklılıklar Tek Yönlü Varyans Analizi (SPSS 1999) ile

karşılaştırılmıştır. Farklı ekstraksiyon süresi, sıcaklığı ve yıkatma sayısının protein miktarı üzerindeki değişimleri ise Çift Yönlü Varyans analizi ile değerlendirilmiştir (SPSS 1999) [111]. Ortalamalar arası farklar Scheffe testleri ile belirlenmiştir. Değerlendirmelerde anlamlılık düzeyi  $\alpha = 0.05$  olarak esas alınmıştır.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. NaOH Konsantrasyonun $\beta$ -Glukan Ekstraksiyonuna Etkisi

*Saccharomyces cerevisiae* hücre duvarının parçalanması çok uğraşlı bir işlemdir. Yapılan bir çalışmada araştırmacılar hücreyi parçalamak için hücreleri 72 saat süresince iki farklı enzimle muamele etmişlerdir. Çalışmanın ilk 24 saatinde glikojen ve trehaloz gibi depo karbonhidratların kolaylıkla hücreden ayrılabilmesine rağmen glukun ve mannan gibi yapısal karbonhidratların ancak 72 saat sonra hücreden atılabildiğini tespit etmişlerdir. Bu da *Saccharomyces cerevisiae* hücre duvarının sağlam bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir [98]. Bu kuvvetli yapıyı parçalamak için öncelikle hücre duvarının dış tabakasını oluşturan proteinlerin ortamdaki uzaklaştırılması gerekmektedir. Hücre duvarının dış tabakasını oluşturan proteinlerin birçoğu mannanlara kovalent olarak bağlanan mannoproteinler olup *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerini korumak için jelimsi bir özellik göstermektedir. Koruyucu jelimsi yapıyı parçalamak ve  $\beta$ -glukan saflığını arttırmak için ilk aşamada otoliz işleminin etkili olabileceği düşünülmüştür. Otoliz; hücrelerin, düşük moleküler ağırlıktaki ürünleri oluşturan fosfolipaz, proteinaz ve ribonükleaz gibi kendi enzimlerinin etkisiyle hücre içi biyopolimerlerinin hidrolizi olarak ifade edilmektedir. Hücre otolizinde sıcaklık, pH, hücre konsantrasyonu ve otoliz aktifleştiricilerinin etkili olduğu tespit edilmiştir [4, 112].

Bu çalışmada, ilk olarak bölüm 3.2.1.1.'de anlatıldığı gibi *Saccharomyces cerevisiae* mayası, sıcaklık ve ekstraksiyon süresi (90°C sıcaklıkta 60 dakika) sabit tutularak farklı NaOH konsantrasyonlarında (0.25, 0.50, 0.75, 1.00 ve 1.50 N NaOH) hidroliz ve otolize maruz bırakılmıştır. Yıllardır süren araştırmalar sonucunda sıcak NaOH ve KOH'in maya ve maya hücre duvarından protein ve alkalide çözünen polisakkaritlerin atılmasında çok etkili kimyasallar olduğu bulunmuştur. Aynı

zamanda yağların da bazik koşullar altında gliserin ve yağ asitlerine kolayca dönüşebildiği ortaya çıkmıştır [2]. Çalışmamızda NaOH kullanılmasının temel sebebi de bu faktörlerdir.

Hücrelerin otolizi sırasında ortaya çıkan düşük moleküler ağırlıktaki ürünlerin ortamın pH'ını değiştirebileceği düşünülmüştür (Şekil 4.1). Bu sebeple otoliz ve hidroliz basamakları sırasında pH değişimleri sürekli olarak takip edilmiştir. En fazla pH değişimi 0.25 N NaOH konsantrasyonu ile muamele edilmiş numunede görülmüştür. 0.25, 0.50 ve 0.75 N NaOH konsantrasyonlarındaki numunelerin pH değerleri sırasıyla % 8.43, 3.15 ve 0.18 oranında azalırken 1.00 ve 1.50 N NaOH konsantrasyonlarındaki örneklerin pH'ı % 1.17 ve 0.90 oranlarında artmıştır. 0.25 N NaOH konsantrasyonundaki örnekte yüksek oranda pH değişiminin olması bu konsantrasyonda pH'ın sabit kalmadığını ve hücre parçalanmasının diğer konsantrasyonlardaki kadar etkili olmadığını kanıtlamıştır (Tablo 4.1- 4.5).

Tablo 4.1: 0.25 N NaOH konsantrasyonundaki pH değişimleri

pH DEĞİŞİMLERİ	
Süre (dakika)	pH
0	10.80 ± 0.33
5	10.38 ± 0.61
10	10.29 ± 0.84
15	10.21 ± 0.89
20	10.18 ± 0.87
25	10.16 ± 0.93
30	10.16 ± 0.97
35	10.11 ± 0.99
40	10.08 ± 0.96
45	10.03 ± 0.95
50	10.06 ± 0.94
55	9.97 ± 0.99
60	9.89 ± 0.92

Tablo 4.2: 0.50 N NaOH konsantrasyonundaki pH değişimleri

pH DEğİŞİMLERİ	
Süre (dakika)	pH
0	10.48 ± 0.08
5	10.22 ± 0.09
10	10.26 ± 0.09
15	10.29 ± 0.10
20	10.24 ± 0.09
25	10.21 ± 0.09
30	10.22 ± 0.10
35	10.27 ± 0.09
40	10.23 ± 0.09
45	10.20 ± 0.10
50	10.27 ± 0.11
55	10.20 ± 0.09
60	10.15 ± 0.11

Tablo 4.3: 0.75 N NaOH konsantrasyonundaki pH değişimleri

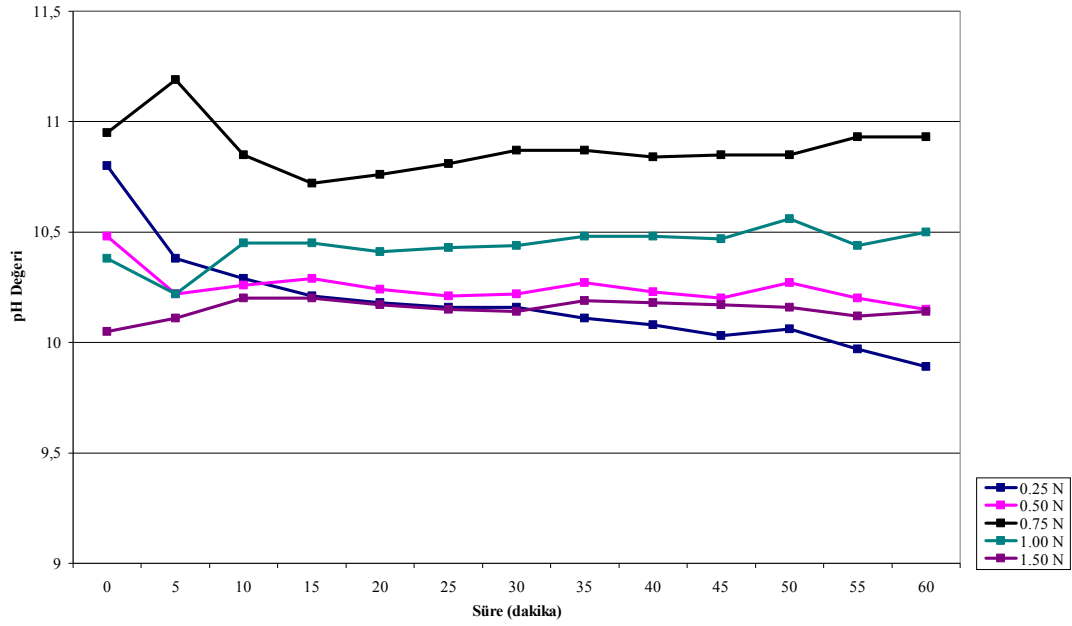
pH DEğİŞİMLERİ	
Süre (dakika)	pH
0	10.95 ± 0.88
5	11.19 ± 0.65
10	10.85 ± 0.73
15	10.72 ± 0.90
20	10.76 ± 0.93
25	10.81 ± 0.84
30	10.87 ± 0.79
35	10.87 ± 0.87
40	10.84 ± 0.85
45	10.85 ± 0.81
50	10.85 ± 0.82
55	10.93 ± 0.75
60	10.93 ± 0.75

Tablo 4.4: 1.00 N NaOH konsantrasyonundaki pH değişimleri

pH DEğİŞİMLERİ	
Süre (dakika)	pH
0	10.38 ± 0.03
5	10.22 ± 0.01
10	10.45 ± 0.04
15	10.45 ± 0.05
20	10.41 ± 0.01
25	10.43 ± 0.03
30	10.44 ± 0.01
35	10.48 ± 0.02
40	10.48 ± 0.03
45	10.47 ± 0.03
50	10.56 ± 0.08
55	10.44 ± 0.01
60	10.50 ± 0.06

Tablo 4.5: 1.50 N NaOH konsantrasyonundaki pH değişimleri

pH DEğİŞİMLERİ	
Süre (dakika)	pH
0	10.05 ± 0.040
5	10.11 ± 0.090
10	10.20 ± 0.020
15	10.20 ± 0.010
20	10.17 ± 0.010
25	10.15 ± 0.010
30	10.14 ± 0.010
35	10.19 ± 0.020
40	10.18 ± 0.010
45	10.17 ± 0.003
50	10.16 ± 0.003
55	10.12 ± 0.020
60	10.14 ± 0.020



Şekil 4.1: Farklı NaOH konsantrasyonlarındaki pH değişimleri

Otoliz ve hidroliz basamaklarından sonra örnekler 24 saat boyunca sedimentasyona (çökme) bırakılmıştır. Sedimentasyon; otoliz ve hidroliz işlemleri sonucunda parçalanmış hücre ve açığa çıkmış hücre içeriklerinin bir göstergesi olarak düşünüldüğünden, süre sonunda numunelerdeki sedimentasyon miktarları değerlendirilmiştir. En fazla çökmeye 1.50 N NaOH konsantrasyonundaki numunede daha sonra da 1.00 N, 0.75 N, 0.50 N ve 0.25 N NaOH konsantrasyonlarındaki numunelerde rastlanmıştır. 0.25 N NaOH konsantrasyonundaki numunede sedimentasyon işlemi çok zor olmuş, bu da parçalama işleminin çok da başarılı olmadığını düşündürmüştür.

Tablo 4.6: Farklı NaOH konsantrasyonlarında protein miktarları

PROTEİN DEĞERLERİ			
NaOH Miktarı	(n)	Min-Mak(%)	( $\bar{x} \pm SH$ )*
Kontrol	5	39.171 - 41.996	40.583 $\pm$ 0.65a
0.25 N	5	33.060 - 36.520	34.790 $\pm$ 0.80b
0.50 N	5	9.3850 - 11.115	10.250 $\pm$ 0.40c
0.75 N	5	7.1250 - 10.585	8.8550 $\pm$ 0.80c
1.00 N	5	6.8450 - 10.305	8.5750 $\pm$ 0.80c
1.50 N	5	7.6200 - 11.080	9.3500 $\pm$ 0.80c

\*Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.001; Scheffe testi)

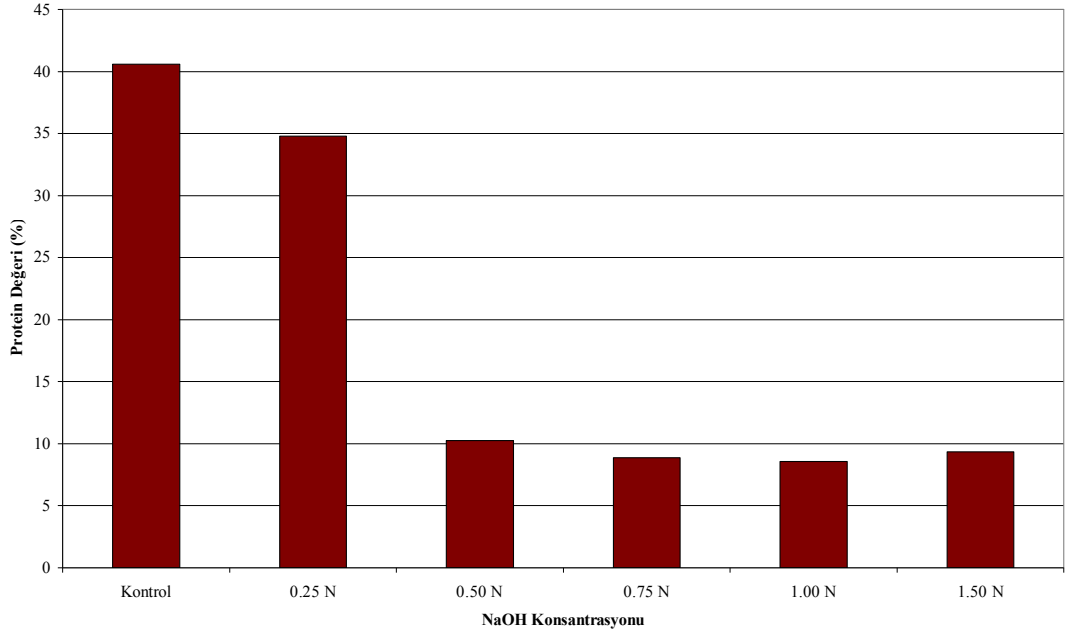


Sedimentasyon basamağından sonraki yıkama ve kurutma işlemlerinin ardından örneklerin protein analizleri yapılmıştır. Farklı NaOH konsantrasyonlarının protein içeriğine etkisi Şekil 4.2’de gösterilmektedir. Kontrol ve farklı NaOH konsantrasyonları uygulanan deney gruplarında (0.25, 0.50, 0.75, 1.00 ve 1.50 N NaOH) protein miktarları sırasıyla ortalama % 40.583, 34.79, 10.25, 8.855, 8.575 ve 9.35 olarak belirlenmiştir (Tablo 4.6). 0.25 N NaOH konsantrasyonuna sahip numunenin protein değeri kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik sergilemiştir ( $P<0.004$ ). Ancak 0.50, 0.75, 1.00 ve 1.50 N NaOH konsantrasyonu içeren numuneler kontrol grubu ve 0.25 N NaOH konsantrasyonu içeren grup hariç kendi aralarında anlamlı bir fark göstermemiştir ( $P>0.001$ ). Normalde uygulanan NaOH konsantrasyonu arttıkça protein değerinin düşmesi beklendiğinden, en düşük protein miktarının 1.50 N NaOH konsantrasyonundaki numunede olacağı düşünülmüştür. Ancak bu numunenin protein değeri 0.75 N NaOH içerikli gruptakinden fazla olarak bulunmuştur. Bunun sebebinin de analiz ya da işlem basamağındaki herhangi bir hata olabileceği düşünülmektedir.

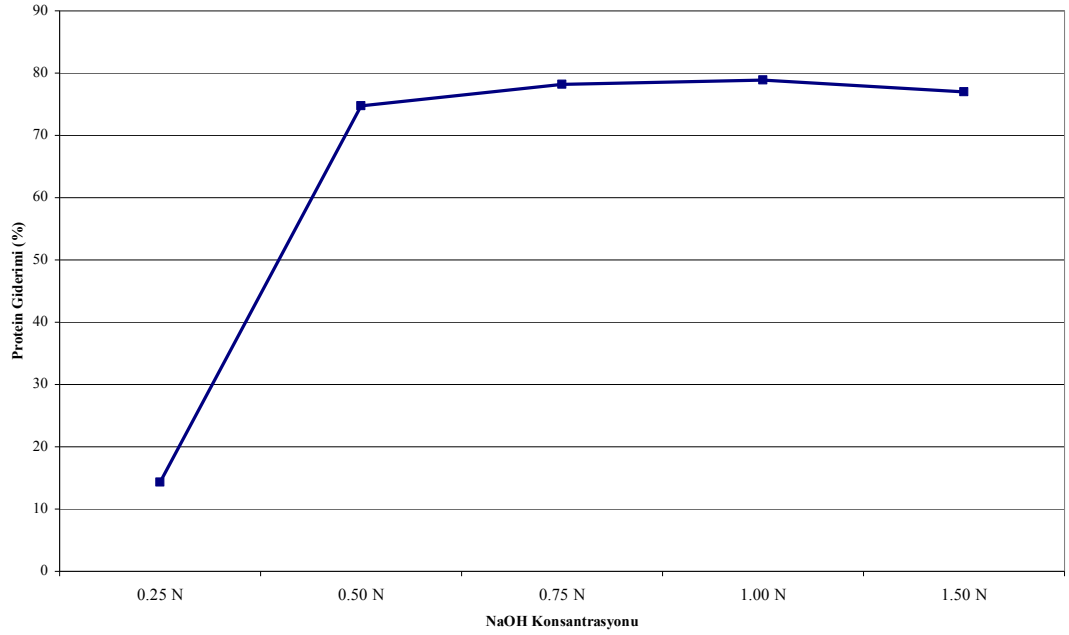
Tablo 4.7: Farklı NaOH konsantrasyonlarında protein giderim yüzdeleri

PROTEİN GİDERİMİ	
Uygulanan NaOH Miktarı	Giderim (%)
0.25 N	14.28
0.50 N	74.74
0.75 N	78.18
1.00 N	78.87
1.50 N	76.96

Şekil 4.3’te de farklı NaOH konsantrasyonlarının protein giderim yüzdeleri gösterilmektedir. En az protein giderimi % 14.28 ile 0.25 N NaOH uygulamasında görülmüştür. Etkin protein giderimi 0.50 N NaOH konsantrasyonundan sonra tespit edilmiştir. 0.50 N NaOH konsantrasyonundan sonra protein giderim yüzdesinde önemli bir yükselişe rastlanmamıştır. Bu, reaksiyonun doygunluk derecesine geldiğini kanıtlamaktadır. Farklı NaOH konsantrasyonların ekstraksiyona etkisi üzerine yapılan çalışmada benzer protein sonuçlarını vermesi ve daha az NaOH kullanımından dolayı optimum konsantrasyon oranı 0.50 N olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.7).



Şekil 4.2: Farklı NaOH konsantrasyonlarındaki protein miktarları



Şekil 4.3: Farklı NaOH konsantrasyonlarında protein giderim yüzdeleri

Suphantharika ve arkadaşları atık bira mayası *Saccharomyces cerevisiae* ile yaptıkları çalışmanın ilk aşamasında hücreyi parçalayıp hücre içeriğini boşaltmak için farklı NaOH konsantrasyonlarını (0.50, 1.00, 1.50 ve 2.00 N NaOH) kullanmışlardır. Yapmış olduğumuz çalışmanın aksine bu çalışmada 1.00 N NaOH

konsantrasyonu uygulamasında protein içeriğini % 1.80 oranına kadar düşürmüşler ve bu konsantrasyondan sonra protein içeriğinde bir farka rastlamamışlardır. Bu yüzden de optimum NaOH konsantrasyonunu 1.00 N olarak tespit etmişlerdir [32].

Farklı kimyasallar kullanılmış başka bir araştırmada Magnani ve ekip arkadaşları farklı kimyasal maddeler kullanarak yaptıkları ekstraksiyon işlemi sonucunda protein içeriğini % 18.02 olarak bulmuşlardır. Bulunan bu değer, çalışmamızdaki 0.50 N NaOH konsantrasyonlu örneğin protein değerinden yüksek olduğu görülmüştür. Bu da parçalama işleminde kullanılan NaOH'in NaCl'e kıyasla daha etkili olduğunu göstermiştir [101].

#### **4.2. Ekstraksiyon süresi, sıcaklığı ve yıkama sayısının etkisi**

Farklı NaOH konsantrasyonlarıyla yapılan denemeler sonucunda, 0.50 N NaOH uygulanmış örnek, verimli ürün elde edilebilecek en az miktarlarda NaOH miktarına sahip olduğundan ve daha yüksek NaOH konsantrasyonları uygulanmış örneklerin protein değerleri ile arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığından endüstriyel açıdan en uygun örnek olarak seçilmiştir. Bu sonuçtan yola çıkarak 200 g atık ekmek mayası (*Saccharomyces cerevisiae*) 1 l 0.50 N NaOH konsantrasyonuyla hazırlanmış ve farklı sıcaklıklarda (65, 70, 80, 85 ve 90°C) ekstraksiyona bırakılmıştır. Otoliz işlemi süresince pH değişimleri sürekli kontrol altında tutulmuştur (Tablo 4.8-4.12). 90 dakikalık hidroliz ve otoliz aşaması sonucunda en yüksek pH değişim yüzdesinin % 7.52 ile 65°C sıcaklıktaki numunede, en düşük pH değişim yüzdesinin ise % 2.79 ile 90°C sıcaklıklardaki numunede olduğu görülmüştür (Şekil 4.4). 70, 80 ve 85°C sıcaklıktaki numunelerin pH değişim yüzdeleri ise sırasıyla % 4.80, 4.82 ve 3.88 olarak tespit edilmiştir. Sıcaklık arttıkça pH değişimleri daha az olmuştur, bunun sebebi, muhtemelen parçalanma işleminin düşük sıcaklıklarda stabil olmaması olabilir.

Tablo 4.8: 65°C sıcaklıktaki pH değişimleri

pH DEğİŞİMLERİ	
Süre (dakika)	pH
0	11.44 ± 0.04
5	11.13 ± 0.06
10	11.03 ± 0.09
15	10.99 ± 0.06
20	10.93 ± 0.04
25	10.89 ± 0.06
30	10.83 ± 0.04
35	10.80 ± 0.04
40	10.71 ± 0.05
45	10.71 ± 0.04
50	10.68 ± 0.04
55	10.68 ± 0.05
60	10.67 ± 0.05
65	10.67 ± 0.03
70	10.64 ± 0.04
75	10.55 ± 0.08
80	10.58 ± 0.03
85	10.61 ± 0.04
90	10.58 ± 0.02

Tablo 4.9: 70°C sıcaklıktaki pH değişimleri

pH DEğİŞİMLERİ	
Süre (dakika)	pH
0	11.05 ± 0.17
5	10.78 ± 0.11
10	10.68 ± 0.09
15	10.68 ± 0.06
20	10.67 ± 0.04
25	10.62 ± 0.02
30	10.57 ± 0.03
35	10.61 ± 0.04
40	10.59 ± 0.01
45	10.51 ± 0.03
50	10.51 ± 0.04
55	10.53 ± 0.02
60	10.51 ± 0.01
65	10.53 ± 0.01
70	10.54 ± 0.03
75	10.46 ± 0.06
80	10.44 ± 0.04
85	10.53 ± 0.02
90	10.52 ± 0.03

Tablo 4.10: 80°C sıcaklıktaki pH değişimleri

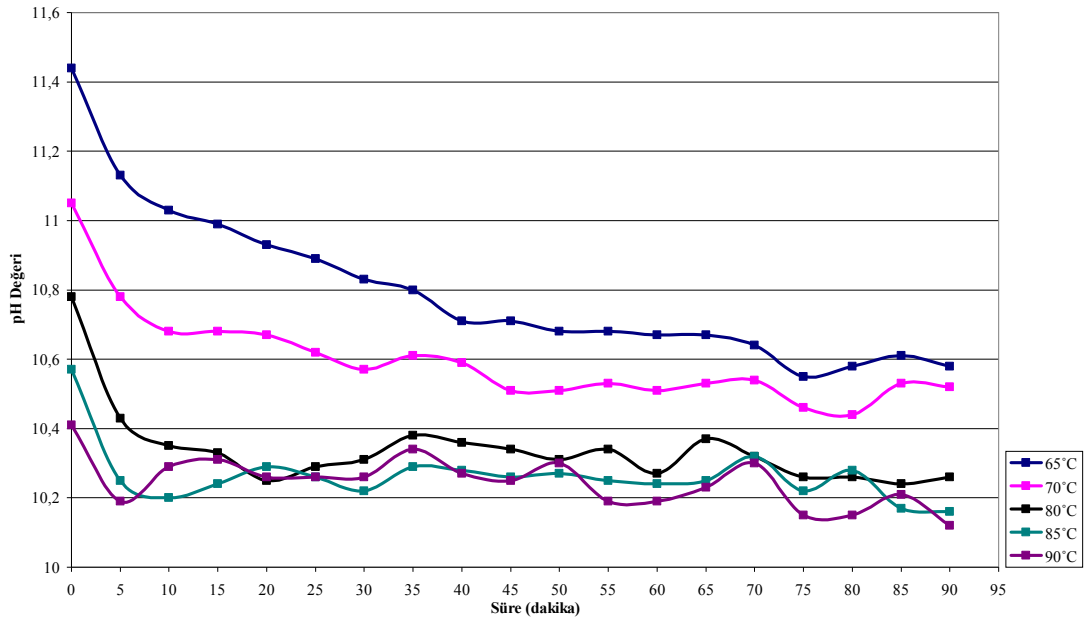
pH DEğİŞİMLERİ	
Süre (dakika)	pH
0	10.78 ± 0.06
5	10.43 ± 0.03
10	10.35 ± 0.04
15	10.33 ± 0.02
20	10.25 ± 0.02
25	10.29 ± 0.03
30	10.31 ± 0.01
35	10.38 ± 0.03
40	10.36 ± 0.02
45	10.34 ± 0.04
50	10.31 ± 0.01
55	10.34 ± 0.03
60	10.27 ± 0.01
65	10.37 ± 0.03
70	10.32 ± 0.03
75	10.26 ± 0.03
80	10.26 ± 0.06
85	10.24 ± 0.01
90	10.26 ± 0.03

Tablo 4.11: 85°C sıcaklıktaki pH değişimleri

pH DEğİŞİMLERİ	
Süre (dakika)	pH
0	10.57 ± 0.06
5	10.25 ± 0.04
10	10.20 ± 0.01
15	10.24 ± 0.01
20	10.29 ± 0.03
25	10.26 ± 0.03
30	10.22 ± 0.03
35	10.29 ± 0.02
40	10.28 ± 0.02
45	10.26 ± 0.01
50	10.27 ± 0.02
55	10.25 ± 0.02
60	10.24 ± 0.01
65	10.25 ± 0.02
70	10.32 ± 0.04
75	10.22 ± 0.03
80	10.28 ± 0.09
85	10.17 ± 0.07
90	10.16 ± 0.01

Tablo 4.12: 90°C sıcaklıktaki pH değişimleri

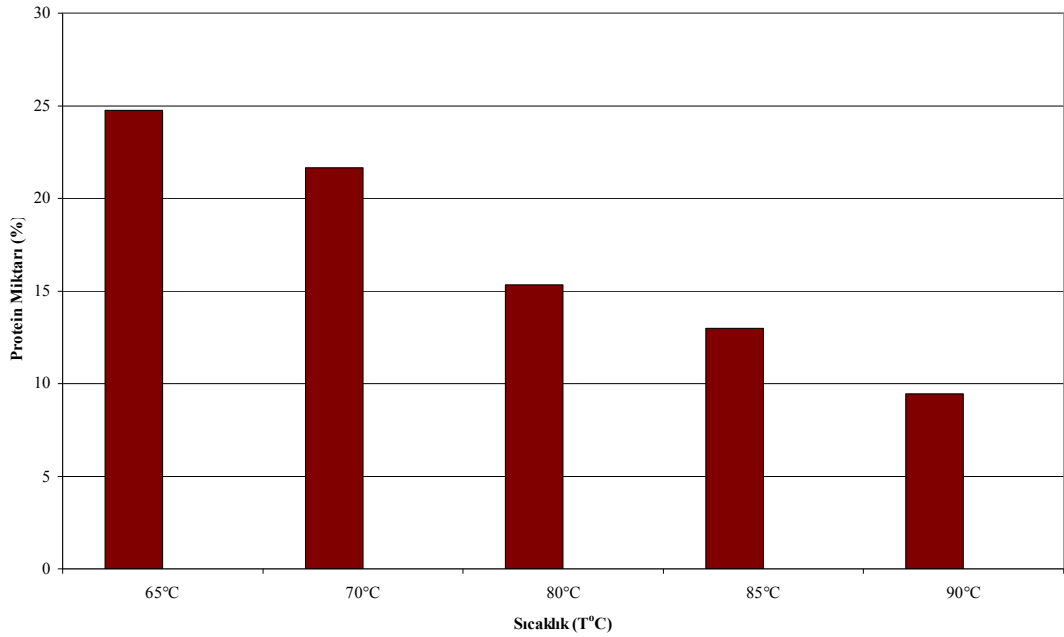
pH DEĞİŞİMLERİ	
Süre (dakika)	pH
0	10.41 ± 0.04
5	10.19 ± 0.03
10	10.29 ± 0.03
15	10.31 ± 0.03
20	10.26 ± 0.02
25	10.26 ± 0.01
30	10.26 ± 0.03
35	10.34 ± 0.02
40	10.27 ± 0.03
45	10.25 ± 0.04
50	10.30 ± 0.01
55	10.19 ± 0.03
60	10.19 ± 0.03
65	10.23 ± 0.04
70	10.30 ± 0.06
75	10.15 ± 0.03
80	10.15 ± 0.02
85	10.21 ± 0.04
90	10.12 ± 0.02



Şekil 4.4: Farklı sıcaklıklardaki pH değişimleri

İkinci basamak olarak otoliz ve hidroliz işlemleri 30, 60 ve 90 dakikalık sürelerde yapılmıştır. Tüm numuneler bu işlemten sonra 24 saat sedimentasyona bırakılmıştır. Beş farklı sıcaklık aralığında da en az çökmeye 30 dakikalık, en fazla çökmeye ise 90

dakikalık numunelerde rastlanmıştır. Sedimentasyon basamağının 65 ve 70°C sıcaklıklarda 30 dakikalık otoliz ve hidroliz işleminin sonucunda yüzeyde olması gereken üst sıvı (dökelti) dibe çökmüştür. 65°C sıcaklıkta hiç çökmenin görülmediği numuneler de olmuştur. Düşük sıcaklıklarda üst sıvı ve çökelti fazları arasında belirgin bir ayırım görülmemiştir. Otoliz sıcaklığı arttıkça fazlar arasındaki ayırım ve sedimentasyon miktarı artmış, bu sonuç parçalamanın sıcaklık yükseldikçe daha başarılı olduğunu kanıtlamıştır.



Şekil 4.5: İki kez yıkanan örneklerin farklı uygulama sıcaklıklarındaki protein miktarları

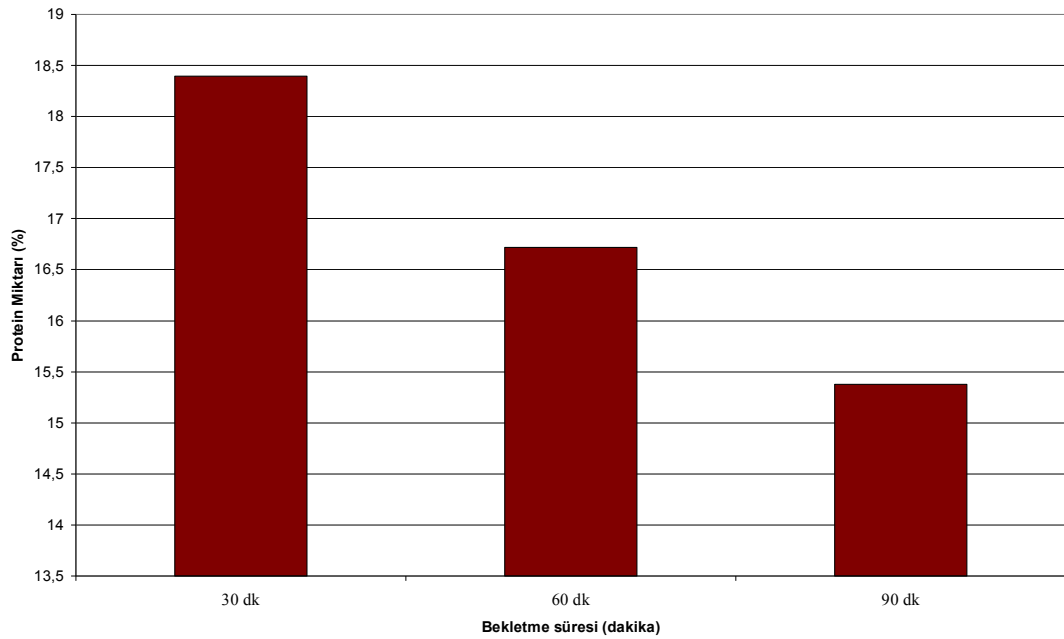
Tablo 4.13: İki kez yıkanan örneklerin farklı uygulama sıcaklıklarındaki protein değerleri

PROTEİN DEĞERLERİ			
Uygulama Adı	(n)	Min-Mak (%)	$(\bar{x} \pm SH)^*$
65°C	5	23.463 - 26.024	24.743 ± 0.601 <b>a</b>
70°C	5	20.368 - 22.929	21.648 ± 0.601 <b>b</b>
80°C	5	14.050 - 16.610	15.330 ± 0.601 <b>c</b>
85°C	5	11.696 - 14.257	12.977 ± 0.601 <b>c</b>
90°C	5	8.1710 - 10.732	9.4520 ± 0.601 <b>d</b>

\*Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.001; Scheffe testi).

65, 70, 80, 85 ve 90°C sıcaklıklarda 30, 60 ve 90 dakika bekletilmiş numuneler 1 ve 2 kez yıkanmıştır. Bu işlemin hem karışımın nötralizasyonunu sağladığı hem de

glukan, protein ve polisakkaritler arasındaki bağları yıktığı düşünülmektedir [2]. Kurutma işleminden sonra numunelerin protein analizleri yapılmıştır. 2 kez yıkanan gruplarda sıcaklık değişimlerinin protein miktarı üzerine etkilerine bakıldığında Şekil 4.5'te görüldüğü gibi uygulanan sıcaklık arttıkça protein değerinin düştüğü gözlemlenmiştir. En düşük protein miktarı 90°C sıcaklıkta otolizlenen grupta görülmüştür. 65, 70, 80, 85 ve 90°C sıcaklıklarda otolizlenen örneklerin protein değerleri sırasıyla ortalama % 24.743, 21.648, 15.33, 12.977 ve 9.452 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.13). 65, 70 ve 90°C sıcaklıkta bekletilen grupların protein değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ( $P < 0.001$ ), 80 ve 85°C sıcaklıktaki grupların protein değerlerinin birbirleriyle arasında belirgin bir farka rastlanmamıştır ( $P > 0.001$ ).



Şekil 4.6: İki kez yıkanan gruplarda bekletme süresinin protein değerine etkisi

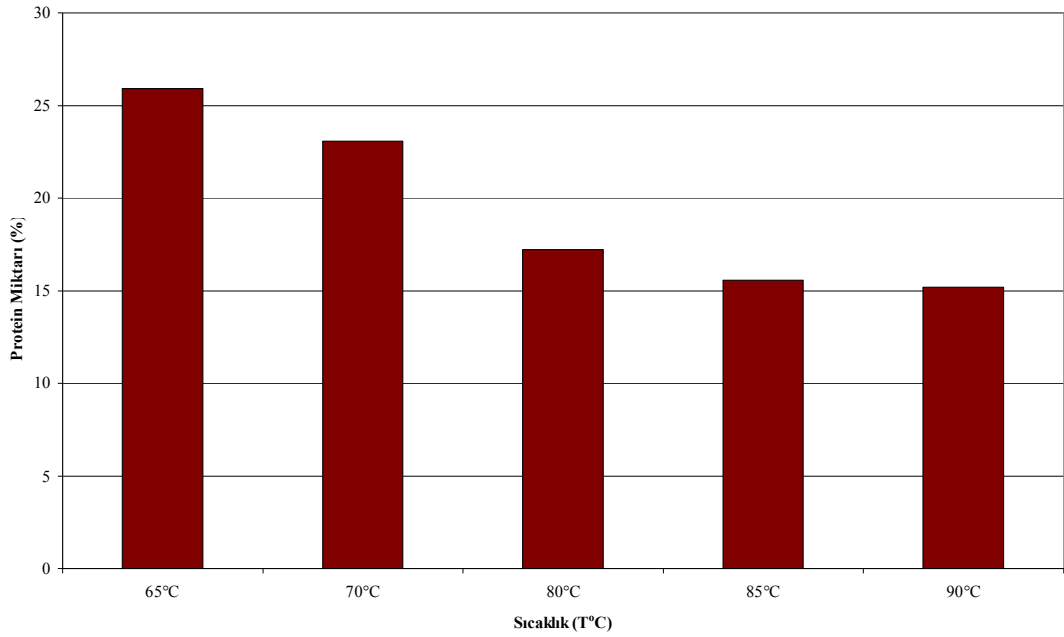
Tablo 4.14: İki kez yıkanan gruplarda farklı bekletme sürelerindeki protein değerleri

PROTEİN DEĞERLERİ			
Uygulama Adı	(n)	Min-Mak (%)	( $\bar{x} \pm SH$ )*
30 dk	5	17.405 - 19.389	18.397 ± 0.465a
60 dk	5	15.726 - 17.710	16.718 ± 0.465ab
90 dk	5	14.383 - 16.367	15.375 ± 0.465b

\*Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ( $P > 0.001$ ; Scheffe testi).



2 kez yıkanan gruplarda bekletme sürelerine bakıldığında ise otoliz süresi arttıkça protein değerinin düştüğü görülmüştür (Şekil 4.6). 30, 60 ve 90 dakika bekletilen grupların protein değerleri sırasıyla ortalama % 18.397, 16.718 ve 15.375 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.14). En düşük protein içeriğine 30 dakika otolizlenen örnekte rastlanırken 60 ve 90 dakika otolizlenen grupların protein değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ( $P>0.001$ ). 2 kez yıkanan örnekler arasında 90°C sıcaklıkta 60 dakika bekletilen numune en uygun protein içeriğine sahip grup olarak seçilmiştir.



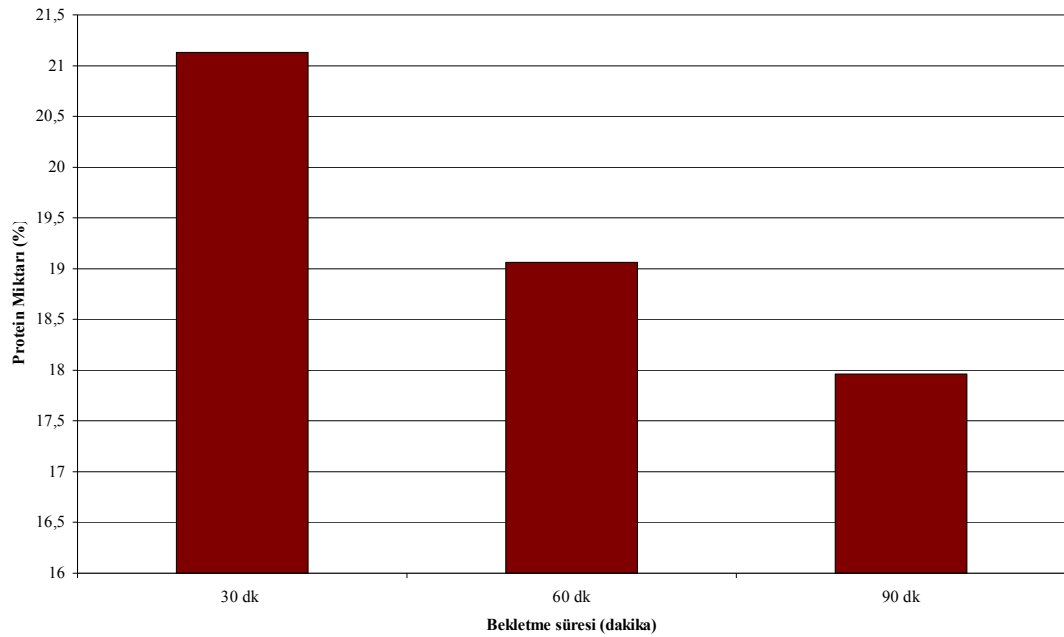
Şekil 4.7: Bir kez yıkanan numunelerde farklı sıcaklıkların protein giderimine etkisi

Tablo 4.15: Bir kez yıkanan örneklerde farklı sıcaklıklardaki protein miktarları

PROTEİN DEĞERLERİ			
Uygulama Adı	(n)	Min-Mak (%)	$(\bar{x} \pm SH)^*$
65°C	5	24.599 - 27.201	25.900 $\pm$ 0.610 <sup>a</sup>
70°C	5	21.778 - 24.379	23.078 $\pm$ 0.610 <sup>a</sup>
80°C	5	15.913 - 18.514	17.213 $\pm$ 0.610 <sup>b</sup>
85°C	5	14.251 - 16.852	15.552 $\pm$ 0.610 <sup>b</sup>
90°C	5	13.884 - 16.486	15.185 $\pm$ 0.610 <sup>b</sup>

\*Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ( $P>0.001$ ; Scheffe testi).

1 kez yıkanan numunelerde de uygulanan sıcaklık arttıkça protein değerinin düştüğü görülmüştür (Şekil 4.7). En yüksek protein içeriği 65°C sıcaklıkta otolizlenen grupta görülürken (% 25.90), en düşük protein miktarına ise 90°C sıcaklıktaki örnekte (% 15.185) rastlanmıştır. 70, 80 ve 85°C sıcaklıkta bekletilen numunelerin protein değerleri sırasıyla ortalama % 23.078, 17.213 ve 15.552 olarak bulunmuştur (Tablo 4.15). 65 ve 70°C sıcaklıktaki grupların protein değerlerindeki farkın birbiri arasında, 80, 85 ve 90°C sıcaklıktaki örneklerin protein değerleri arasındaki farkın ise yine birbiri arasında istatistiksel olarak anlamsız olduğu tespit edilmiştir ( $P>0.001$ ).



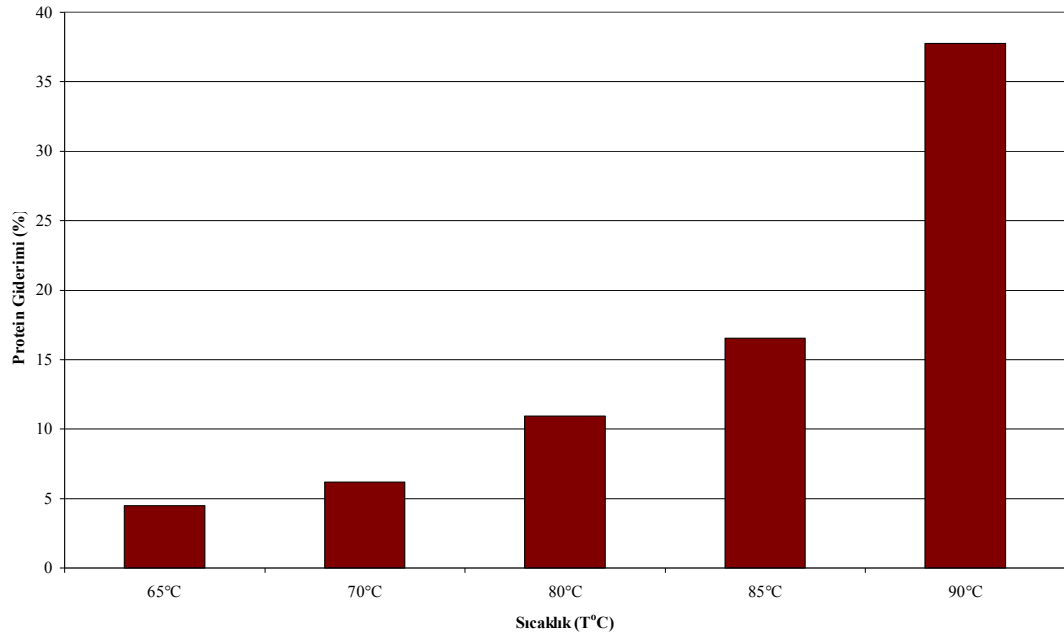
Şekil 4.8: Bir kez yıkanan numunelerde farklı bekletme sürelerinin protein miktarına etkileri

Protein gideriminde bekletme sürelerinin de etkili olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.8). 1 kez yıkanan numuneler arasında 30, 60 ve 90 dakika otolizlenen örneklerin protein değerleri aynı sıra ile ortalama % 21.131, 19.063 ve 17.963 olarak belirlenmiştir (Tablo 4.16). 60 ve 90 dakika otolizlenen grupların protein değerleri arasında istatistiksel bir farka rastlanmazken ( $P>0.001$ ) 30 dakika bekletilen numunenin protein değeri diğer grupların protein değerinden farklı olarak bulunmuştur ( $P<0.001$ ).

Tablo 4.16: Bir kez yıkanan numunelerin farklı bekletme sürelerindeki protein değerleri

PROTEİN DEĞERLERİ			
Uygulama Adı	(n)	Min-Mak (%)	( $\bar{x} \pm SH$ )*
30 dk	5	20.123 - 22.139	21.131 $\pm$ 0.473a
60 dk	5	18.055 - 20.071	19.063 $\pm$ 0.473b
90 dk	5	16.955 - 18.971	17.963 $\pm$ 0.473b

\*Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.001; Scheffe testi).

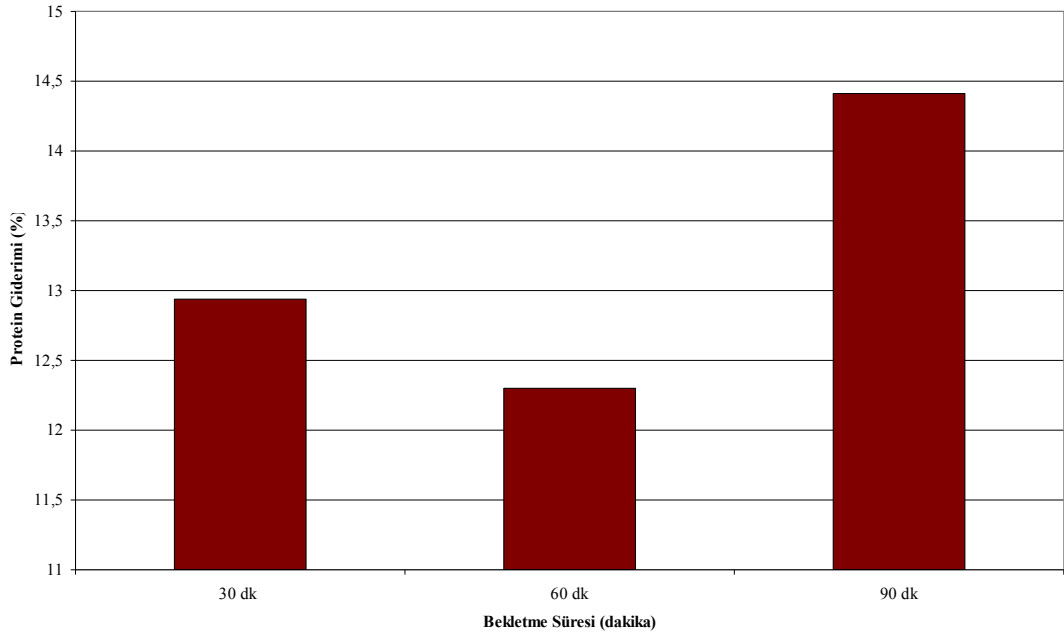


Şekil 4.9: Farklı sıcaklık uygulamalarında 1 ve 2 kez yıkanan numuneler arasındaki protein giderimi

Numune yıkatımının da protein giderimini dolayısıyla da  $\beta$ -glukan saflığını arttırabileceği düşünüldüğünden örnekler 1 ve 2 kez suyla yıkanmış ve iki yıkama arasındaki protein giderimlerine bakılmıştır. Uygulanan sıcaklık yükseldikçe protein gideriminin de arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.9). 65, 70, 80, 85 ve 90°C sıcaklıklardaki grupların 1 ve 2 kez yıkanan numuneler arasındaki protein giderimleri sırasıyla ortalama % 4.47, 6.20, 10.94, 16.56 ve 37.75 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.17). Protein giderimindeki en uygun sıcaklık 90°C olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.17: Farklı sıcaklıklardaki 1 ve 2 kez yıkanan numuneler arasındaki protein giderimleri

PROTEİN GİDERİMİ	
Uygulama Adı	Giderim (%)
65°C	4.47
70°C	6.20
80°C	10.94
85°C	16.56
90°C	37.75



Şekil 4.10: Farklı bekletme sürelerinde 1 ve 2 kez yıkanan numuneler arasındaki protein giderimi

Tablo 4.18: Farklı bekletme sürelerinde 1 ve 2 kez yıkanan numuneler arasındaki protein giderim yüzdeleri

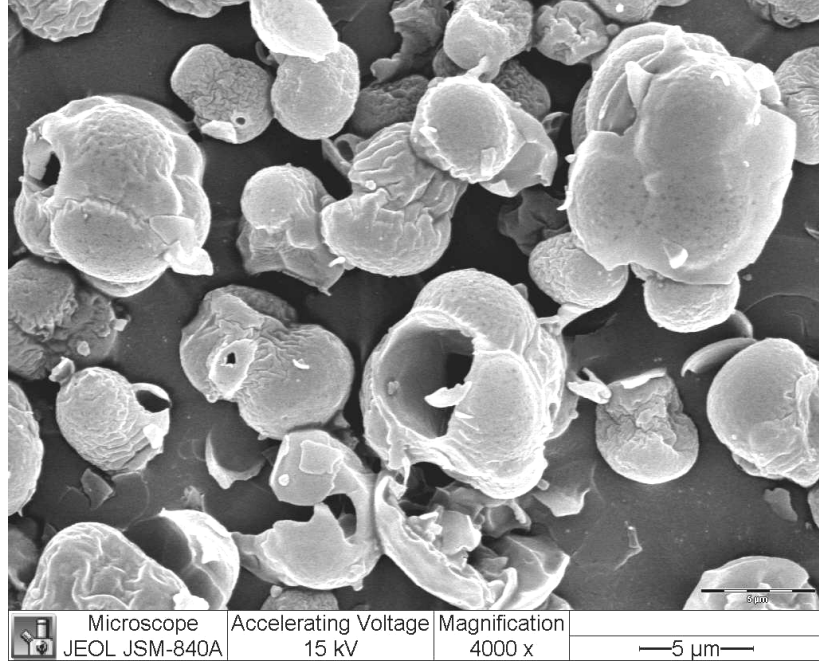
PROTEİN GİDERİMİ	
Uygulama Adı	Giderim (%)
30 dk	12.94
60 dk	12.30
90 dk	14.41

Bekletme sürelerine bakıldığında ise (Şekil 4.10) 1 ve 2 kez yıkananlar arasındaki en fazla protein giderimi 90 dakika otolizlenen gruplarda görülmüştür. En az protein gideriminin 30 dakika otolizlenen numunede olması beklenirken bu değere 60 dakika bekletilen gruplarda (% 12.30) rastlanmıştır (Tablo 4.18). Bu beklenmeyen sonucun sebebi deneme sırasındaki herhangi bir analiz hatası olabilir. Bulunan sonuçlar 1 ve 2

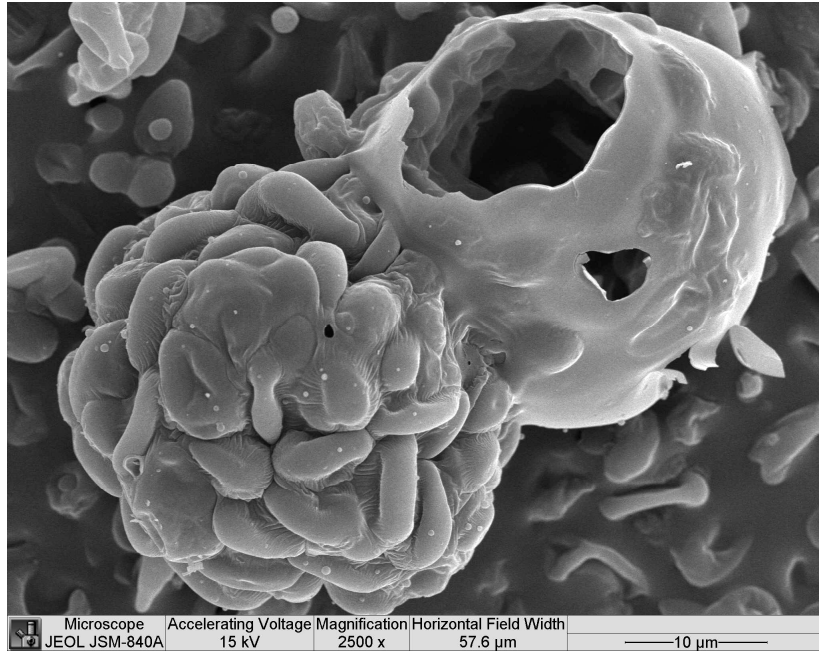
kez yıkamada bekletme süresinin uygulanan sıcaklık kadar fazla etkili olmadığını kanıtlamıştır. 30, 60 ve 90 dakika bekletilen grupların 1 ve 2 kez yıkamaları arasında çok belirgin bir protein giderim farkı bulunmaması ve genel olarak daha etkili olan 2 kez yıkanmış örneklerin 60 ve 90 dakika otolizlenme süreleri arasında istatistiksel bir fark bulunmamasından dolayı en uygun bekletme süresi 60 dakika olarak tespit edilmiştir.

Yapılan denemenin bu aşamasında optimum protein giderimine 90°C sıcaklıkta 60 dakika bekletilip 2 kez yıkanan grupta rastlanmıştır.

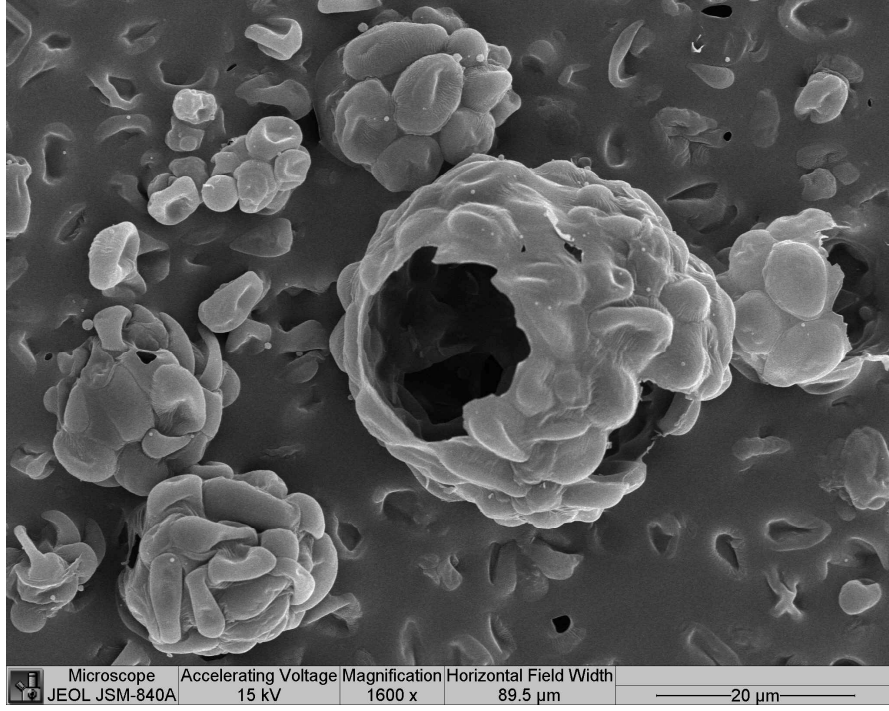
Farklı NaOH konsantrasyonları, sıcaklık, ekstraksiyon süreleri ve 1 ve 2 kez yıkanarak yapılan denemeler sonucunda endüstriyel olarak en uygun örnek olan numune içerisindeki *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinin morfolojik değişimlerini gözlemlemek için taramalı elektron mikroskopisi (SEM) uygulanmıştır (Şekil 4.11-4.14). *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri normalde uzun, yumurta şeklinde olup düz bir yüzeye sahipken otoliz işleminden sonra sitoplazmik içeriklerin hücre dışına çıkmasından dolayı hücre hacminin Xiao-Yong ve arkadaşlarının çalışmalarında [4] olduğu gibi azaldığı görülmüştür. Hücre duvarındaki mannoproteinlerin ortamdan uzaklaştırılmasıyla hücrelerin mekanik kuvvetinin azaldığı ve sıcaklığın da etkisiyle hücrelerin şişip patladığı düşünülmektedir. Bazı bölgelerde *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinin tamamen parçalanmış olması yapılan uygulamaların etkinliğini kanıtlamıştır.



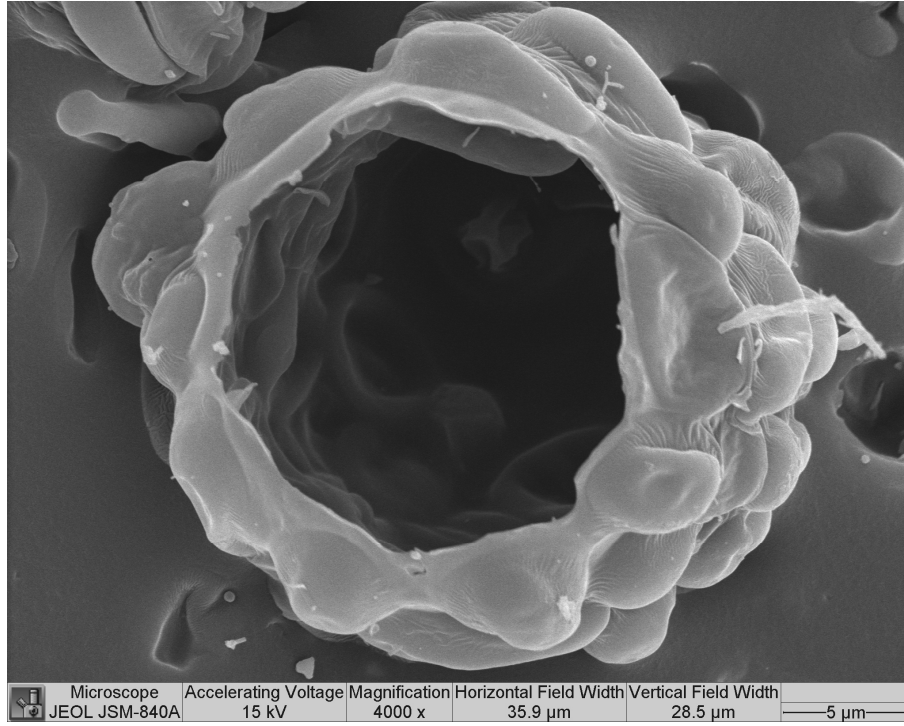
Şekil 4.11: Parçalanmış maya hücrelerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü



Şekil 4.12: Parçalanmış maya hücrelerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü



Şekil 4.13: Parçalanmış maya hücrelerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü



Şekil 4.14: Parçalanmış maya hücrelerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü

Suphantharika ve arkadaşları atık bira mayası *Saccharomyces cerevisiae* ile yaptıkları çalışmanın ikinci aşamasında  $\beta$ -glukanı saflaştırmak için sabit NaOH konsantrasyonunda (1.00 N NaOH) farklı ekstraksiyon süreleri (30, 60, 90 ve 120 dakika) kullanmışlardır. Mevcut çalışmadakiyle benzer şekilde en uygun ekstraksiyon süresini 60 dakika olarak tespit etmişlerdir. Bu basamaktan sonra sabit bekletme süresinde (60 dakika) farklı ekstraksiyon sıcaklıklarında (50, 70 ve 90°C) hücreleri parçalamayı denemişlerdir. Mevcut çalışmadakiyle benzer olarak en düşük protein içeriğine (% 1.90) 90°C sıcaklıktaki denemelerde rastlamışlardır. Bu da bizim sonuçlarımızı desteklemektedir [32].

Xiao-Yong ve arkadaşları yaptıkları çalışmada % 15 oranında kuru madde içeriğine sahip bira mayası *Saccharomyces cerevisiae*'yı 24 saat 55°C sıcaklıkta % 3 NaCl ile otolizlemişlerdir. Üst sıvıdaki protein içeriğinin, otolizin ilk 20 saatinde artmaya devam ettiğini, 24 saatten 48 saate kadar da durağan faza girdiğini tespit etmişlerdir. Bunun maya hücrelerinin protein hidrolizine yardımcı olan çeşitli hücre içi proteazlarına sahip olmasından kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Protein hidrolizinden sonra gerçekleşen otoliz oranının da ilk 20 saatte doğrusal olarak artıp 24 saat sonra sabitlendiğini gözlemlemişlerdir. Yapılan çalışmanın bu aşamasında protein içeriğini mevcut çalışmada tercih edilen sıcaklıktaki (90°C) gruba kıyasla daha az düşürebilmişler ve protein içeriğini % 19.69 olarak tespit etmişlerdir. Aynı çalışmanın ikinci aşamasında ise otolize uğratılmış hücreleri 80°C sıcaklıkta 15 dakika bekletmişler ve protein içeriğini % 10.38 oranına kadar düşürmüşlerdir. Benzer protein değeri daha az işleme mevcut çalışmadaki 0.50 N NaOH konsantrasyonunda, 2 kez yıkanan numunede görülmüştür [4].

### **4.3. Farklı uygulamaların $\beta$ -glukan ekstraksiyonuna etkisi**

#### **4.3.1. Patent uygulaması**

NaOH çalışmalarından sonra  $\beta$ -glukanın saflığını arttırmak için farklı uygulamalara başvurulmuştur. Byron A. Donzis tarafından geliştirilmiş patent uygulaması [106] 0.50 N NaOH ile sulandırılmış 90°C sıcaklıkta 60 dakika bekletilmiş numune üzerine uyarlanmış, örneklerden biri alkolden diğeri ise asetondan sonra alınmıştır. Farklı



uygulamaların  $\beta$ -glukan ekstraksiyonuna etkisindeki ikinci kısım olan sıcak su uygulamasındaki 1.5N.2kz. örneği de, işlemin protein içeriğini ne kadar etkilediğini tespit etmek için bu bölümdeki sonuçlarla birlikte değerlendirilmiştir.

Tablo 4.19: Farklı uygulamalar sonucundaki protein değerleri

FARKLI UYGULAMALARDA PROTEİN DEĞERLERİ			
Uygulama Adı	(n)	Min-Mak(%)	( $\bar{x} \pm SH$ )*
Kontrol	5	40.00 - 41.00	40.583 $\pm$ 0.77a
0.5N.90.60dk.P.A.S.	5	7.940 - 7.950	7.945 $\pm$ 0.940b
0.5N.90.60dk.P.	5	6.100 - 9.46	7.720 $\pm$ 0.600b
1.5N.2kz	5	2.800 - 7.00	4.900 $\pm$ 0.94bc
1.5N.P.	5	1.740 - 1.91	1.825 $\pm$ 0.940c

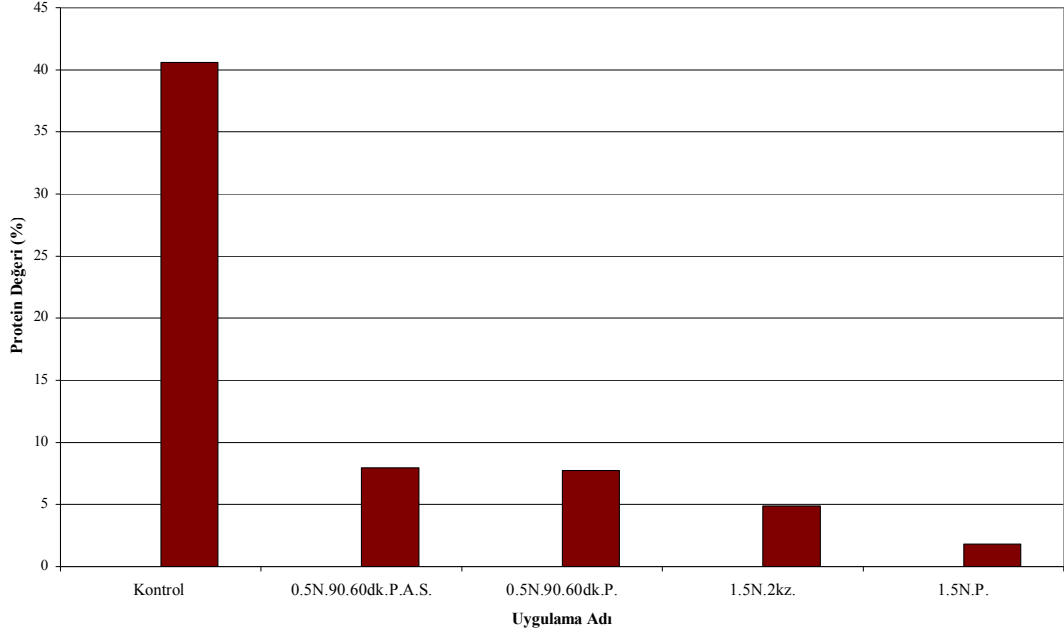
\*Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ( $P > 0.001$ ; Scheffe testi).

Tablo 4.20: Farklı uygulamalar sonucundaki protein giderim yüzdeleri

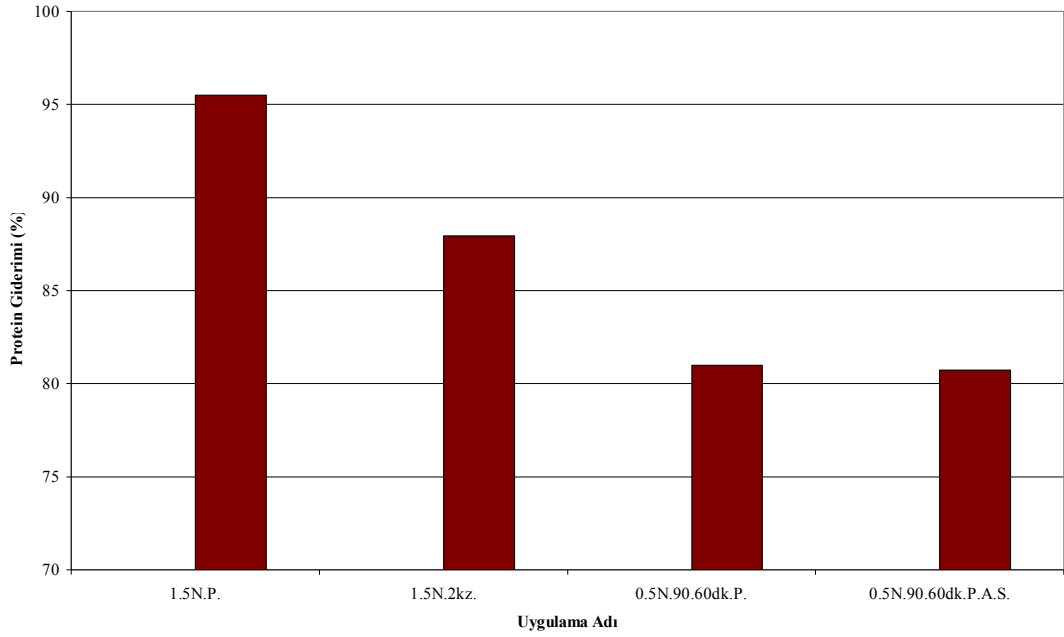
PROTEİN GİDERİMİ	
Uygulama Adı	Giderim (%)
1.5N.P.	95.50
1.5N.2kz.	87.93
0.5N.90.60dk.P.	80.98
0.5N.90.60dk.P.A.S.	80.42

Şekil 4.15'te görüldüğü gibi glukan saflığının ilk göstergesi olarak protein içerikleri incelenmiştir. 1.5N.P., 0.5N.90.60dk.P., 0.5N.90.60dk.P.A.S. ve 1.5N.2kz. örneklerin protein değerleri sırasıyla ortalama % 1.825, 7.720, 7.945 ve 4.90 olarak bulunmuştur. Şekil 4.16 ve Tablo 4.20'de görüldüğü üzere bu örneklerin protein giderimleri de yine aynı sırayla % 95.50, 80.98, 80.42 ve 87.93 olarak tespit edilmiştir. Tüm örneklerin protein değerleri kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik göstermiştir ( $P < 0.001$ ). 1.5N.P. ve 1.5N.2kz. örneklerinin protein değerleri arasında istatistiksel olarak bir fark görülmezken ( $P > 0.001$ ) diğer numunelerle arasında ise fark olduğu gözlemlenmiştir ( $P < 0.001$ ). 0.5N.90.60dk.P., 0.5N.90.60dk.P.A.S. ve 1.5N.2kz. örnekleri arasında ise anlamlı bir değişime rastlanmamıştır ( $P > 0.001$ ) (Tablo 4.19). Patent prosesli uygulamalara bakıldığında aseton basamağının protein giderimini etkilemediği, uygulanan NaOH konsantrasyonunun daha etkili olduğu görülmüştür. Ancak iki farklı proses uygulanan 1.5N.2kz. ve 1.5N.P. örneklerinin protein değerleri arasında istatistiksel

olarak anlamlı bir sonuç vermemesi uzun patent prosesinin gereksiz olduğunu, sıcak su ve NaOH uygulamasının protein giderimi için yeterli olabileceğini kanıtlamıştır.



Şekil 4.15: Farklı uygulamalar sonucundaki protein değerleri



Şekil 4.16: Farklı uygulamalar sonucundaki protein giderim yüzdeleri

Homojenizasyonu temel alan bir incelemede izolasyon işlemi sonucunda % 3.70 oranında protein içeriğine sahip yarı saflıkta glukomannan elde etmişlerdir. Araştırmacılar protein içeriğini mevcut çalışmadakine kıyasla daha fazla düşürmüşlerdir ancak glukani mannanla birlikte izole edebilmişlerdir [104].

Benzer bir çalışmada Xiao-Yong ve arkadaşları bira mayası *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerine otoliz ve sıcak su uyguladıktan sonra zayıflattıkları hücre duvarlarını homojenizatörle parçalamışlardır. Bu mekanik parçalamanın ardından protein içeriğini % 4.30 olarak bulmuşlardır. Araştırmacılar homojenizasyondan sonra organik çözücülerle yağları ortamdaki uzaklaştırmışlar ve proteinlerin açığa çıkmasıyla protein içeriğini % 4.68 olarak tespit etmişlerdir. Son aşamada ise bir çeşit proteaz enzimi kullanarak kalan proteinleri de atmışlardır. Fakat bu durumda bile örnekte % 2.99 oranında protein içeriği tespit etmişlerdir. Bulunan protein miktarının, mevcut çalışmadaki 1.5N.P. örneğinden fazla, 0.5N.90.60dk.P. örneğinden ise düşük olduğu görülmüştür. Bu da, hücre parçalanmasında uygulanan prosesin yanı sıra kimyasal madde konsantrasyonunun da etkili olduğunu kanıtlamıştır [4].

Sonikasyon yoluyla maya hücrelerinden protein salınımını temel alan bir çalışmada ise araştırmacılar işlem sonucunda üst sıvıda 467 mg/g protein içeriğine rastlamışlardır. Ancak yapılan her iki çalışmada da düşük hücre konsantrasyonlarıyla çalışılmıştır. Düşük hücre konsantrasyonuyla çalışılmış olması prosesin endüstriyel olarak uygun olmadığını düşündürmektedir [103].

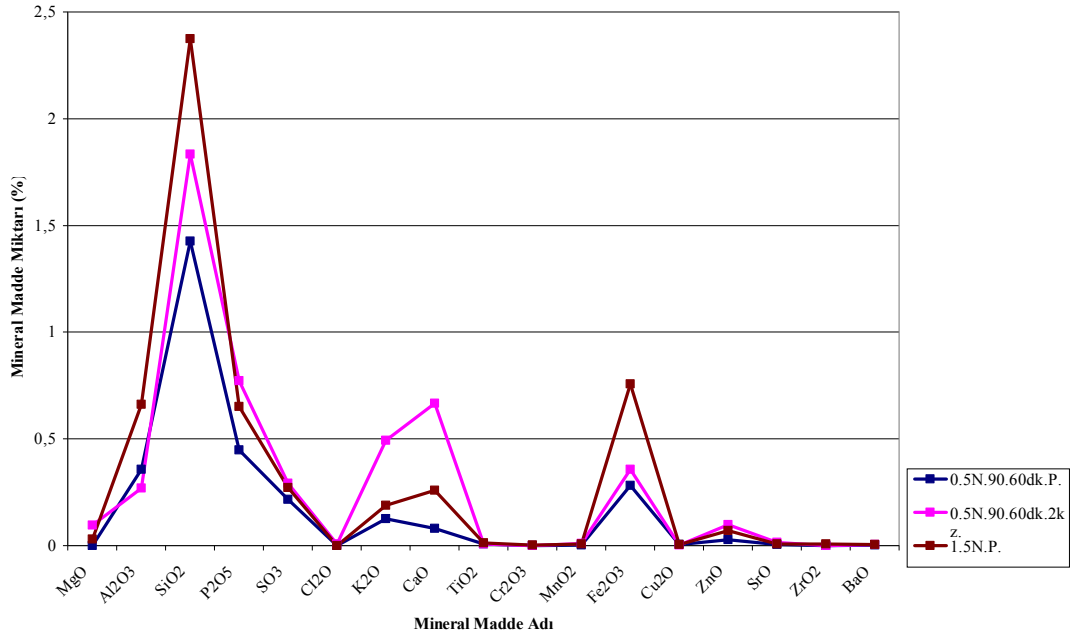
Yapılan bir çalışmada araştırmacılar NaCl uygulamasından sonra hücreleri sıcak su ile muamele ederek protein değerini % 3.25 değerine kadar düşürmüşlerdir. Bu değer araştırmamızdaki 1.5N.2kz. denemesindeki sonuçları desteklemektedir. Çalışmanın devamında hücre duvarındaki glukan fibrilleri arasındaki safsızlık etmeni olan  $\beta$ -1,6-glukanları ortamdaki uzaklaştırmak için sonikasyon yapmışlar, yağ ekstraksiyonu ve proteaz enzimi uygulamasından sonra ise toplam protein miktarını % 0.13 olarak tespit etmişlerdir [101].

Başka bir çalışmada sıcak su uygulamasıyla proteinin % 80'i ve mannopteinlerin % 60'ı ortamdaki uzaklaştırılarak üründe % 20 oranında protein içeriği saptanmıştır. Çalışmanın devamında uygulanan proteaz enzimiyle ise bu oran mevcut çalışmadaki 1.5N.2kz. grubuyla benzer bir protein değerine kadar düşürülmüştür. Bu da protein giderimi için yüksek maliyetli enzim muamelesine ihtiyaç duyulmadığını kanıtlamıştır [2].

0.5N.90.60dk.2kz; 0.5N.90.60dk.P. ve 1.5N.P. örnekleri arasındaki kül ve yağ miktarları ve verim değerleri de karşılaştırılmıştır. Kül miktarlarına bakıldığında, tablo 4.21'de belirtildiği gibi % 5.60 oranla en yüksek kül miktarı 1.5N.P. örneğinde görülürken, daha sonra da % 5.10 ile 0.5N.90.60dk.2kz. örneği, en son olarak da % 3.1 ile 0.5N.90.60dk.P. örneğinin en yüksek kül içeriğine sahip olduğu bulunmuştur (Şekil 4.17). 0.5N.90.60dk.P. numunesinin kül miktarı, Xiao-Yong ve arkadaşlarının çalışmalarında buldukları miktarla (% 3.87) tutarlılık göstermiştir [4].

Tablo 4.21: Farklı uygulamalar sonucundaki kül içerikleri

KÜL DEĞERLERİ			
Mineral Madde	0.5N.90.60dk.2kz.	0.5N.90.60dk.P.	1.5N.P.
MgO	0.0960	0	0.0293
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.2690	0.35740	0.6613
SiO <sub>2</sub>	1.8340	1.42700	2.3750
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.7725	0.44870	0.6520
SO <sub>3</sub>	0.2921	0.21610	0.2713
Cl <sub>2</sub> O	0.0084	0	0
K <sub>2</sub> O	0.4942	0.12630	0.1885
CaO	0.6659	0.07940	0.2591
TiO <sub>2</sub>	0.0069	0.00700	0.0133
Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.0007	0.00110	0.0032
MnO <sub>2</sub>	0.0105	0.00240	0.007
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.3582	0.28090	0.7582
Cu <sub>2</sub> O	0.0029	0.00390	0.0047
ZnO	0.0986	0.02667	0.0701
SrO	0.0150	0.00380	0.0076
ZrO <sub>2</sub>	0.0005	0.00070	0.0076
BaO	0.0045	0.00320	0.0051
Toplam	5.1	3.1	5.6



Şekil 4.17: Farklı uygulamalar sonucundaki kül değerleri

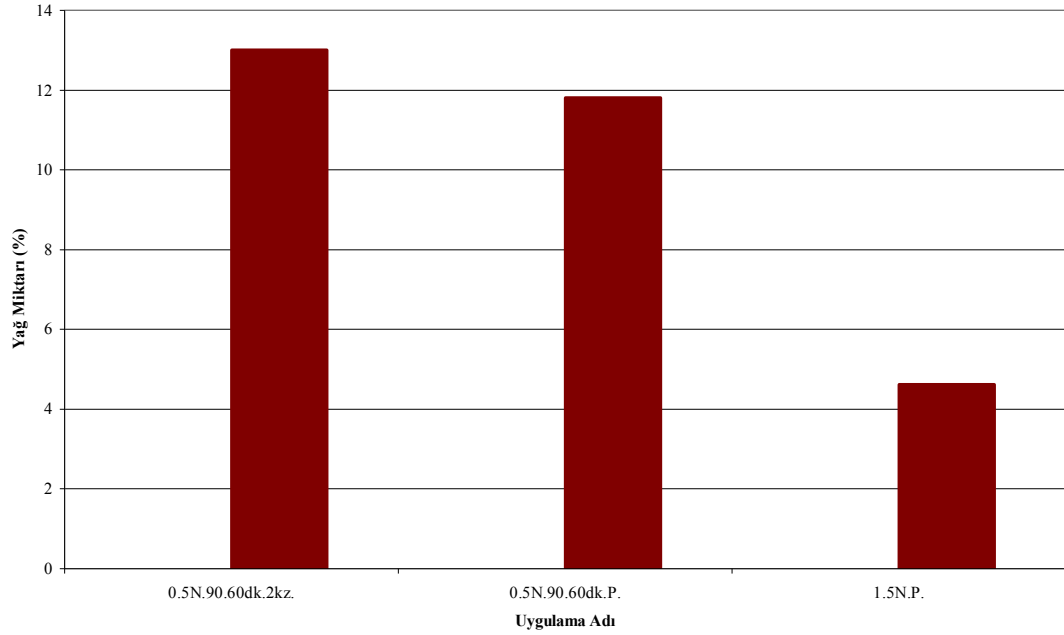
Otero ve arkadaşları homojenizasyon ve NaOH ekstraksiyonuyla izole ettikleri yarı-saf glukomannanda % 3.50 oranında kül olduğunu tespit etmişlerdir. Sonuçlar mevcut çalışmadaki 0.5N.90.60dk.P. örneğinin kül oranıyla benzerlik göstermiş olup homojenizasyon işleminin mevcut çalışmadaki birçok basamağın yerine kullanılabileceğini kanıtlamıştır [104].

0.5N.90.60dk.2kz., 0.5N.90.60dk.P. ve 1.5N.P. numunelerinin yağ analizleri T.Ü.B.İ.T.A.K. Marmara Araştırma Merkezi Gıda Enstitüsü tarafından asit hidrolizi uygulamalı, soxtec sistemiyle yapılmıştır (Tablo 4.22). En yüksek yağ miktarına %  $13.01 \pm 0.007$  ile 0.5N.90.60dk.2kz. örneğinde rastlanmıştır. En yüksek yağ giderimi de %  $4.62 \pm 0.007$  ile 1.5N.P. numunesinde görülmüştür. 0.5N.90.60dk.P. örneğinin yağ miktarı da %  $11.81 \pm 0.007$  olarak bulunmuştur (Şekil 4.18.). Patent prosesinde numunedeki yağları ortamdaki uzaklaştırmak amacıyla alkol ve aseton uygulamaları yapılmıştır. Ancak aynı işlem uygulanmış, farklı NaOH konsantrasyonu ve sıcaklıkla çalışılmış iki örneğin (0.5N.90.60dk.P. ve 1.5N.P.) yağ değerleri arasında % 60.90 oranında bir farka rastlanmıştır. Sonuçlar yağ gideriminde alkol ve asetonun çok uygulanan NaOH miktarının ve sıcaklığın daha etkili olduğunu göstermiştir. Benzer bir çalışmada isopropanolle yapılan ekstraksiyonla yağ miktarı % 0.10 oranına

düşürülürken petrol eteri ile aynı değer % 0.09 oranına kadar azaltılmıştır. Bu değerlerin mevcut çalışmadaki sonuçlardan düşük olmasının nedeni lipit ekstraksiyonundan önce araştırmacıların uyguladıkları sıcak su ve sonikasyon muameleleri sırasında da yağları giderebilmeleri olabilir [101].

Tablo 4.22: Farklı uygulamalar sonucundaki yağ içerikleri

YAĞ DEĞERLERİ	
Uygulama Adı	Yağ Miktarı (%)
0.5N.90.60dk.2kz.	13.01 ± 0.007
0.5N.90.60dk.P.	11.81 ± 0.007
1.5N.P.	4.620 ± 0.007



Şekil 4.18: Farklı uygulamalar sonucundaki yağ değerleri

Kesler ve Nickerson yaptıkları çalışmada mekanik olarak parçaladıkları ekmek mayası *Saccharomyces cerevisiae* hücre duvarından yağları uzaklaştırmak için 3 basamaklı bir ekstraksiyon prosesi uygulamışlardır. Bu uzun süreli işlem sonunda ekmek mayası *Saccharomyces cerevisiae*'dan tespit ettikleri yağ miktarını çalışmamızdaki 0.5N.90.60dk.2kz. ve 0.5N.90.60dk.P. örnektekilerle benzer bir

değer (% 10.19) bulmuşlardır. Bu benzerlik yapılan 3 basamaklı ekstraksiyon işleminin gereksiz olduğunu göstermiştir [113].

*Saccharomyces cerevisiae*  $\beta$ -glukanının izolasyonu ve saflaştırılması üzerine yapılan benzer bir çalışmada araştırmacılar NaCl otoliziyle yağ oranını % 3.68'e kadar düşürmüşlerdir. Araştırmalarının devamında sıcak su uygulamasıyla aynı değer % 4.00'e, homojenizasyon uygulamasından sonra % 2.68'e, organik çözücünden sonra ise % 0.28 oranına kadar azaltılmıştır. Bu değerlerin çalışmamızda bulunan yağ değerlerine göre düşük olduğu ve bunun muhtemel sebebinin hücre duvarının etkili bir şekilde parçalanıp bağlı yağların açığa çıkması ancak ortaya çıkan yağların atılamamasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir [4].

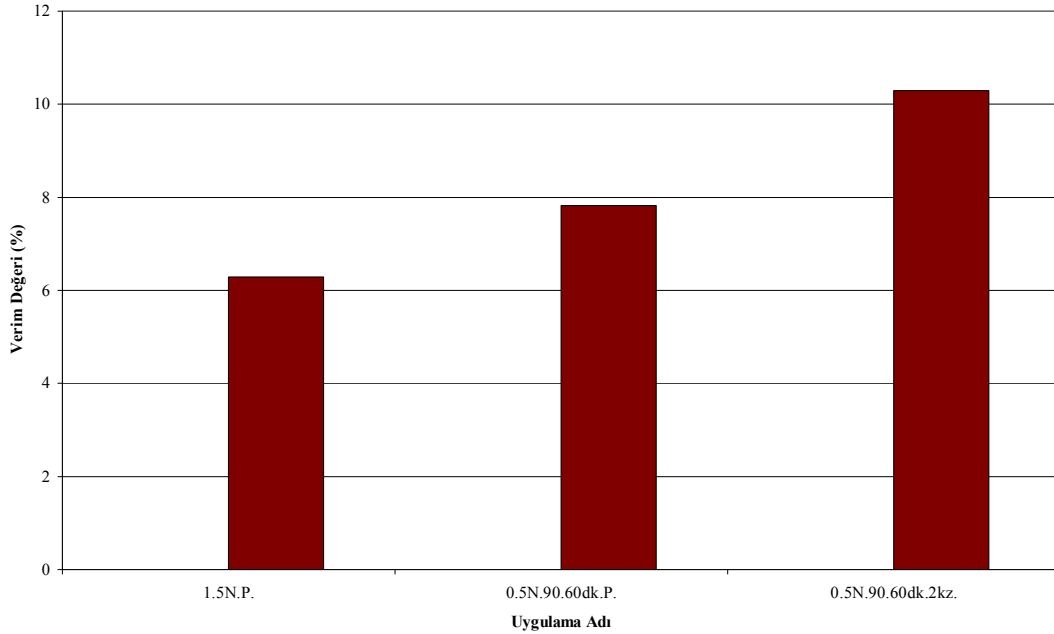
Başka bir incelemede ise üretilen yarı-safılıkta glukomannandan yağı etkili bir şekilde uzaklaştırarak % 1.50 oranında yağ içeriği tespit edilmiştir. Araştırmacılar homojenizasyon işlemi ve daha düşük sıcaklık (75°C) ve NaOH konsantrasyonu (0.25 N) kullanarak çalışmamızda bulunan yağ miktarlarından daha düşük yağ oranlarına ulaşmayı başarmışlardır. Bu sonuç yağ gideriminde homojenizatör uygulamasının da etkili olabileceğini düşündürmüştür [104].

Farklı bir çalışmada yağ oranı iz miktarlara kadar indirilmiştir. Sıcak su uygulamasıyla fosfolipit veya gliserit gibi yağların suda-çözünebilir kısımlarından dolayı % 26'sı, enzim muamelesiyle % 8'i, aseton uygulamasıyla da geriye kalanın atıldığı ileri sürülmüştür. Ancak mevcut çalışmada aseton basamağı yağları uzaklaştırmada etkili olmadığından; bu sonuç elde ettiğimiz değerlerle çelişmektedir [2].

Tablo 4.23: Farklı uygulamalar sonucunda elde edilen  $\beta$ -glukan verimi

VERİM DEĞERİ	
Uygulama Adı	Verim (%)
1.5N.P.	6.290 $\pm$ 0.45
0.5N.90.60dk.P.	7.820 $\pm$ 0.25
0.5N.90.60dk.2kz.	10.29 $\pm$ 0.32

Seçilen üç örnek arasında (1.5N.P., 0.5N.90.60dk.P. ve 0.5N.90.60dk.2kz.) (1→3)(1→6)-β-glukanın verimine de bakılmıştır (Şekil 4.19). 1.5N.P., 0.5N.90.60dk.P. ve 0.5N.90.60dk.2kz. örneklerinin verim değerleri sırasıyla ortalama % 6.29, 7.82 ve 10.29 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.23). En yüksek verimin 0.5N.90.60dk.2kz. örneğinde olmasının sebebi bu numunede diğer örneklere oranla daha fazla β-glukan saflığını bozan protein, yağ ve mineral madde gibi içeriklerin bulunması olabilir. Ancak buna rağmen 1.5N.P. ve 0.5N.90.60dk.P. örneklerinin verimi de olması gerekenden düşük olarak bulunmuştur. Bunun nedeni de işlem basamakları sırasında üst sıvı kısmıyla çökelti kısmının da yanlışlıkla atılmış olması olabilir.



Şekil 4.19: Farklı uygulamalar sonucunda elde edilen β-glukan verimi

Xiao-Yong ve arkadaşları 0.5N.90.60dk.2kz. örneğiyle benzer verim (% 10.29) elde etmişlerdir. Yapılan uygulamalar esnasında kaybın fazla olmasından dolayı benzer çalışma aşamalarının olduğu 1.5N.P. ve 0.5N.90.60dk.P. numunelerin veriminin daha düşük olduğu görülmüştür [4].

Magnani ve arkadaşları; sonikasyon, lipid ekstraksiyonu ve enzim muamelesi yoluyla *Saccharomyces cerevisiae* hücre duvarından β-glukanı izole edecekleri yeni bir metot



geliştirmişlerdir. Çalışma sonucunda % 11.08 oranında  $\beta$ -glukan verimi elde etmişlerdir. Buldukları değerin araştırmamızdaki 0.5N.90.60dk.2kz. örneğinin verimine çok yakın olduğu tespit edilmiştir [101].

*Saccharomyces cerevisiae* hücre duvarını parçalamak için 1.00 N NaOH konsantrasyonu kullanılan bir çalışmada katı madde verimi % 19-22 bulunmuşken aynı NaOH konsantrasyonunda 90°C sıcaklıkta 60 dakikalık ekstraksiyon işlemi sonucunda ise % 31 oranında katı verimine ulaşılmıştır. Tespit edilen verim değerlerinin çalışmamızda elde ettiğimiz numunelerin verim değerlerine göre daha yüksek olduğu görülmüştür [32].

İki farklı hammadde kullanılan, sıcak su ve enzim muamelelerini baz alan bir çalışmada ise glukan verimleri % 25 ve % 26 olarak bulunmuştur. Bu verim çalışmamızda elde etmiş olduğumuz değerlerden daha fazla olup muhtemel sebebinin uygulanan işlemler sırasında elde edilen numune kaybının az olmasından dolayı olabileceği düşünülmektedir [2].

#### **4.4. Mantar ve maya $\beta$ -glukanı testi (Megazyme)**

Bu çalışmada son olarak farklı uygulamalar sonucundaki  $\beta$ -glukan miktarları kıyaslanmıştır. Numunelerin  $\beta$ -glukan içerikleri; toplam glukan ve  $\alpha$ -glukan içerikleri ölçülüp aralarındaki farkın alınmasıyla hesaplanmıştır. Kontrol grubu olarak hiçbir işlem uygulanmamış maya hücresi seçilmiş ve toplam glukan miktarı % 23.093 olarak tespit edilmiştir. O.M.H, 0.5N.90.60dk.2kz., 0.5N.90.60dk.P.A.S., 0.5N.90.60dk.P., 0.5N.O.2kz. ve 1.5N.P. numunelerinin toplam glukan miktarları ise sırasıyla ortalama % 25.933, 53.642, 61.530, 64.620, 65.838 ve 65.433 olarak bulunmuştur (Tablo 4.24). O.M.H. numunesi hariç diğer örneklerin toplam glukan miktarları kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermiştir ( $P < 0.001$ ). Farklı uygulamalar birbiriyle kıyaslandığında ise 0.5N.90.60dk.2kz. ve 0.5N.90.60dk.P.A.S. örnekleri arasında ve 0.5N.90.60dk.P.A.S., 0.5N.90.60dk.P., 1.5N.P. ve 0.5N.O.2kz. örneklerinin toplam glukan değerleri arasında istatistiksel olarak bir farka rastlanmamıştır ( $P > 0.001$ ).

Tablo 4.24: Farklı uygulamalar sonucundaki toplam glukan içerikleri

TOPLAM GLUKAN DEĞERLERİ			
Uygulama Adı	(n)	Min-Mak(%)	( $\bar{x} \pm SH$ )*
Kontrol	4	20.042 - 26.143	23.093 $\pm$ 1.480 <b>a</b>
O.M.H.	4	22.882 - 28.983	25.933 $\pm$ 1.480 <b>a</b>
0.5N.90.60dk.2kz.	4	51.151 - 56.132	53.642 $\pm$ 1.210 <b>b</b>
0.5N.90.60dk.P.A.S.	4	57.216 - 65.844	61.530 $\pm$ 2.10 <b>bc</b>
0.5N.90.60dk.P.	4	62.129 - 67.111	64.620 $\pm$ 1.210 <b>c</b>
0.5N.O.2kz.	4	62.787 - 68.888	65.838 $\pm$ 1.480 <b>c</b>
1.5N.P.	4	62.943 - 67.924	65.433 $\pm$ 1.210 <b>c</b>

\*Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.001; Scheffe testi).

Tablo 4.25: Farklı uygulamalar sonucundaki  $\alpha$ -glukan içerikleri

$\alpha$ -GLUKAN DEĞERLERİ			
Uygulama Adı	(n)	Min-Mak(%)	( $\bar{x} \pm SH$ )*
Kontrol	4	1.987 - 3.498	2.742 $\pm$ 0.370 <b>a</b>
O.M.H.	4	2.270 - 3.780	3.025 $\pm$ 0.370 <b>a</b>
0.5N.90.60dk.2kz.	4	6.602 - 7.835	7.218 $\pm$ 0.300 <b>b</b>
0.5N.90.60dk.P.A.S.	4	4.772 - 6.908	5.840 $\pm$ 0.52 <b>bc</b>
0.5N.90.60dk.P.	4	7.723 - 8.957	8.340 $\pm$ 0.30 <b>bc</b>
0.5N.O.2kz.	4	7.392 - 8.903	8.148 $\pm$ 0.370 <b>c</b>
1.5N.P.	4	7.130 - 8.363	7.747 $\pm$ 0.300 <b>c</b>

\*Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.001; Scheffe testi).

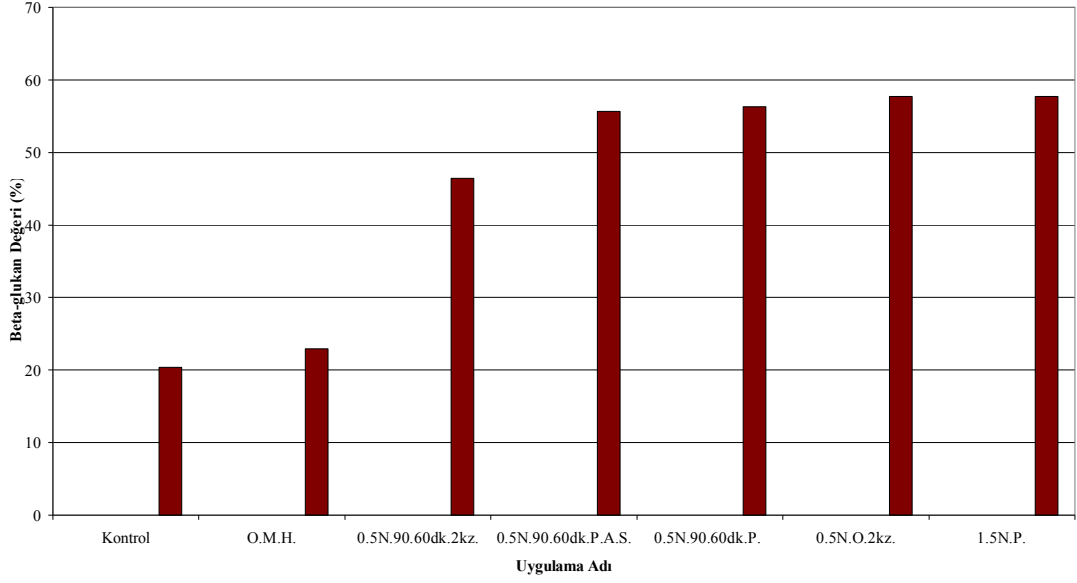
Kontrol, O.M.H., 0.5N.90.60dk.2kz., 0.5N.90.60dk.P.A.S., 0.5N.90.60dk.P., 0.5N.O.2kz. ve 1.5N.P. gruplarının  $\alpha$ -glukan değerleri ise sırasıyla ortalama % 2.742, 3.025, 7.218, 5.840, 8.340, 8.148 ve 7.747 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.25). O.M.H. örneği dışında diğer tüm örneklerin  $\alpha$ -glukan değerlerinde kontrol grubuna göre meydana gelen farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P<0.001). 0.5N.90.60dk.P.A.S., 0.5N.90.60dk.2kz. ve 1.5N.P. grupları ve 0.5N.90.60dk.2kz., 1.5N.P., 0.5N.O.2kz ve 0.5N.90.60dk.P. grupların bu değerleri arasında ise istatistiksel olarak belirgin bir fark görülmemiştir (P>0.001).

Tablo 4.26: Farklı uygulamalar sonucundaki  $\beta$ -glukan içerikleri

$\beta$ -GLUKAN DEĞERLERİ			
Uygulama Adı	(n)	Min-Mak(%)	( $\bar{x} \pm SH$ )*
Kontrol	4	17.069 - 23.631	20.350 $\pm$ 1.59 $a$
O.M.H.	4	19.626 - 26.189	22.908 $\pm$ 1.59 $a$
0.5N.90.60dk.2kz.	4	43.744 - 49.102	46.423 $\pm$ 1.30 $b$
0.5N.90.60dk.P.A.S.	4	51.050 - 60.330	55.690 $\pm$ 2.25 $c$
0.5N.90.60dk.P.	4	53.601 - 58.959	56.280 $\pm$ 1.30 $c$
0.5N.O.2kz.	4	54.409 - 60.971	57.690 $\pm$ 1.59 $c$
1.5N.P.	4	55.008 - 60.366	57.687 $\pm$ 1.30 $c$

\*Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir ( $P > 0.001$ ; Scheffe testi).

Toplam glukan ve  $\alpha$ -glukan miktarları tespit edildikten sonra  $\beta$ -glukan miktarları hesaplanmıştır. Kontrol, O.M.H., 0.5N.90.60dk.2kz., 0.5N.90.60dk.P.A.S., 0.5N.90.60dk.P., 0.5N.O.2kz. ve 1.5N.P. gruplarının sırasıyla ortalama % 20.35, 22.908, 46.423, 55.690, 56.280, 57.690 ve 57.687  $\beta$ -glukana sahip oldukları bulunmuştur (Şekil 4.20). Kontrol grubuyla kıyaslandığında O.M.H. örneği hariç diğer tüm gruplardaki  $\beta$ -glukan saflıkları istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler göstermiştir ( $P < 0.001$ ). Bu durum, sıcak su uygulamasının tek başına  $\beta$ -glukan saflığını arttırmada yeterli olmadığını kanıtlamıştır. Gruplar kendi aralarında kıyaslandığında 0.5N.90.60dk.2kz. örneğinin  $\beta$ -glukan içeriğinin diğer farklı uygulamaların içeriğinden azlığı istatistiksel olarak tespit edilmiştir ( $P < 0.001$ ) (Tablo 4.26). 0.5N.90.60dk.P.A.S., 0.5N.90.60dk.P., 0.5N.O.2kz. ve 1.5N.P. gruplarının  $\beta$ -glukan içerikleri arasında ise belirgin bir fark çıkmamıştır ( $P > 0.001$ ). Sonuçlar;  $\beta$ -glukan saflığını arttırmada yüksek NaOH konsantrasyonuna ve uzun patent prosesine gerek olmadığını aynı değerlere düşük NaOH içerikli sıcak su uygulamasını içeren bir işlemle de ulaşılabileceğini ispatlamıştır. Farklı bir çalışmada, NaOH uygulaması ile ultrasonikasyon işlemleri uygulayarak % 96-99 saflığında  $\beta$ -glukan elde etmişlerdir [6]. Mevcut araştırmanın aksine asit ya da alkali ekstraksiyonun  $\beta$ -glukanın doğal yapısını bozduğu düşüncesiyle sıcak su uygulaması ve enzimatik yıkımı temel alan bir çalışma sonucunda ise % 92 ve 87 saflık oranlarında  $\beta$ -glukan üretilmiştir. Ancak çalışmada glukan değeri glikoz cinsinden hesaplandığından glukanın tam değerini vermemektedir [2].



Şekil 4.20: Numunelerin farklı uygulamalar sonucundaki  $\beta$ -glukan içerikleri

Otoliz ve sıcak alkali uygulamasıyla  $\beta$ -glukan izolasyonu yapılan başka bir çalışmada glukan içeriği % 53 olarak tespit edilmiştir. Bu değer çalışmamızdaki 0.5N.90.60dk.2kz. örneğindeki değere göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Bunun muhtemel sebebinin uygulanan NaOH konsantrasyonunun yüksek ve kullandıkları hammaddenin bira mayası olmasından dolayı olabileceği düşünülebilir [114].

0.50 N NaOH konsantrasyonunda yapılan mevcut çalışmadaki % 46.423 oranındaki  $\beta$ -glukan içeriğine karşılık Suphantharika ve arkadaşları farklı uygulamalar sonucunda 1.00 N NaOH konsantrasyonu kullanarak bira mayası *Saccharomyces cerevisiae*'dan % 50.50 oranında  $\beta$ -glukan izole etmişlerdir. Bu  $\beta$ -glukan miktarındaki değişikliğin sebebi, uygulanan NaOH konsantrasyonu ve  $\beta$ -glukan analizinde kullanılan metodun farklılığından kaynaklanıyor olabilir. Bu farklılık glukan saflaştırılmasında NaOH konsantrasyonunun etkili olduğunu göstermiştir. Ancak 0.50 N NaOH konsantrasyonu uygulanarak otoklavlanan süspansiyonda,  $\beta$ -glukan değeri % 57.69 olarak bulunmuştur. Bu sonuç,  $\beta$ -glukanın izolasyonunda NaOH konsantrasyonu yanında basınç ve sıcaklığın da etkili olduğunu vurgulamıştır [32].

Otoliz ve NaClO ile oksidasyonu temel alan başka bir çalışmada tüm uygulama basamakları sonucunda  $\beta$ -glukan miktarını, mevcut çalışmadaki sadece sıcak su uygulanmış maya sonuçlarıyla yakın değerlerde ( % 22.90) tespit etmişlerdir [5].

Xiao-Yong ve arkadaşları bira mayası *Saccharomyces cerevisiae* ile yaptıkları çalışmanın ilk aşamasında hücreleri otoliz ve sıcak su uygulamasına maruz bırakmışlar ve % 46.92 oranında  $\beta$ -glukan elde etmişlerdir. Bu oran mevcut çalışmadaki 0.5N.90.60dk.2kz örneğindeki değerle benzerdir. Ancak mevcut çalışmada bu değere daha kısa sürede ulaşılmıştır. Bunun sebebi de araştırmacıların uyguladıkları sıcaklığın yeterli olmaması olabilir. Aynı çalışmada otoliz ve sıcak su uygulamalarından sonra yapılan homojenizasyon işlemi glukan oranını % 84'e kadar çıkartmıştır. Araştırmacılar otoliz ve sıcak su muamelesiyle protein, mannoprotein ve diğer polisakkaritlerin ortamdan uzaklaştırıldığını, aynı zamanda da hücre duvarının mekanik kuvvetinin de azaldığını ve uygulanan homojenizasyon işleminin de bu sebeple glukan saflığını arttırdığını ileri sürmüşlerdir.  $\beta$ -glukan saflığını arttırmak amacıyla örneklere organik çözücü ve proteaz enzimi uygulamışlardır. Organik çözücü uygulamasından sonra % 85.56 oranında, proteaz muamelesinden sonra ise % 93.12 oranında  $\beta$ -glukan elde etmişlerdir. Fakat çalışmaya göre *Saccharomyces cerevisiae* hücresindeki  $\beta$ -glukan içeriği yaklaşık olarak % 60 olduğu için tespit edilen değerler bu durumla çelişmektedir [4].

Endüstriyel olarak kullanılmakta olan ürünlerde  $\beta$ -glukan saflıkları kullanım amacına göre farklılık göstermektedir. Yem katkı maddesi olarak kullanılan Molarmix Invivomos® markalı üründe toplam  $\beta$ -glukan (1,3-1,6) miktarı % 25'tir [115]. Bir çeşit bağışıklık destekleyicisi olan High Dose, Highly Purified Beta 1,3/1,6 Glucan üründe  $\beta$ -glukan miktarı % 86.6 iken aynı amaç için kullanılan Life Source Immune System Activator üründe  $\beta$ -glukan saflığı % 95 olarak verilmiştir [116, 117]. Farklı bir bağışıklık arttırıcı Transfer Point Beta 1,3-D-glucan markalı ürünün ise % 83-86.50 oranında  $\beta$ -1,3-D-glukan kompleksi içerdiği belirtilmiştir [118]. Bu literatürler ışığında çalışmamızdaki farklı glukan içerikli numunelerden, sektörlerin kullanım şekline bağlı olarak, çeşitli saflıkta birçok ürün oluşturulabileceği ortaya çıkmaktadır.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

*Saccharomyces cerevisiae* hücresinden  $\beta$ -glukanın izolasyonu ve saflaştırılması üzerine yapılan çalışmamızda farklı NaOH konsantrasyonlarının  $\beta$ -glukan saflığına etkileri incelenmiştir. Hücrelerin otolizi esnasında ortaya çıkan düşük moleküler ağırlıktaki ürünlerin ortamın pH'ını değiştirebildiği düşünüldüğünden hücre parçalanmasının başarısını tespit etmek için pH değerleri kaydedilmiştir. 0.25 N NaOH konsantrasyonundaki örnekte pH değişim oranının çok fazla olması, bu değişimin nedeninin hücrelerin etkin olarak parçalanmamasından dolayı olabileceğini göstermiştir.

Farklı NaOH konsantrasyonu uygulamasının hücre parçalamasındaki etkinliğinin belirlenmesi için sedimentasyon işlemi irdelenmiştir. 1.50 N NaOH uygulanan örnekte en fazla sedimentasyona rastlanırken, 0.25 N NaOH uygulanan örnekte sedimentasyonun çok zor gerçekleştiği görülmüştür. Bu görüntüden, 0.25 N NaOH konsantrasyonunun hücre parçalanmasında diğer NaOH konsantrasyonlara oranla daha az etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

$\beta$ -glukan saflığının göstergesi olarak farklı NaOH konsantrasyonları uygulanmış olan numunelerin protein içeriklerine bakılmıştır. Deney grupları içerisinde ortalama olarak en yüksek protein değeri 0.25 N NaOH uygulanmış numunelerde görülürken, en düşük protein değeri ise 1.00 N NaOH konsantrasyonunda gözlemlenmiştir. Kontrol ve NaOH uygulanan deney gruplarında (0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.50 N) protein değerleri sırasıyla % 40.58, 34.79, 10.25, 8.86, 8.58, 9.35 olarak belirlenmiştir. Deney gruplarının protein değerlerinin kontrol grubunun protein değerine kıyasla istatistiksel olarak farklı olduğu belirlenmiştir. 0.25 N NaOH uygulanmış grup hariç, tüm grupların protein değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.

Bulunan en uygun NaOH konsantrasyonu (0.50 N) sabit tutularak sıcaklık, ekstraksiyon süresi ve yıkama sayısının protein giderimine olan etkileri incelenmiştir. Hücre parçalanmasının bir göstergesi olarak pH değişimlerine bakıldığında 65°C sıcaklıkta pH değişiminin çok fazla olduğu görülürken, 90°C sıcaklıkta pH değişiminin az olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun düşük sıcaklıklarda hücrelerin parçalanmasının stabil olmamasından dolayı olabileceği düşünülmüştür. Nitekim sıcaklık yükseldikçe pH değişim oranlarının azaldığı tespit edilmiştir.

Deney gruplarının sedimentasyon oranları kıyaslandığında ekstraksiyon süresi ve uygulama sıcaklığı arttıkça sedimentasyon miktarının da arttığı gözlenmiştir.

2 kez yıkanan gruplarda ekstraksiyon sıcaklığı ve yıkama sayısı arttıkça grupların protein içeriklerinin azaldığı tespit edilmiştir. En düşük protein değeri 90°C sıcaklık uygulanan örneklerde görülürken en yüksek protein miktarına 65°C sıcaklık uygulanan numunede rastlanmıştır. 80 ve 85°C sıcaklıktaki numunelerin protein değerleri arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmazken diğer tüm grupların protein miktarlarındaki farklılıkların anlamlı olduğu gözlemlenmiştir. Ekstraksiyon süresi uzadıkça da protein miktarında azalmalara rastlanmıştır. 30, 60 ve 90 dakika bekletilen grupların protein değerleri sırasıyla % 18.397, 16.718 ve 15.375 olarak bulunurken 60 ve 90 dakika otolizlenen gruplar arasındaki farkın anlamlı olmadığı görülmüştür.

1 kez yıkanan gruplarda 65 ve 70°C sıcaklıklardaki grupların protein değerleri birbiri içerisinde, 80, 85 ve 90°C sıcaklıktaki grupların protein değerleri de birbirleri arasında anlamlı bir fark sergilememiştir. Ekstraksiyon süresi uzadıkça protein miktarının düşmesine rağmen 60 ve 90 dakikalık denemeler arasındaki bu düşüş anlamlı bulunmamıştır.

Karışımın nötralizasyonunu sağladığı ve glukan, protein ve polisakkaritler arasındaki bağları yıktığı için yıkama sayısına bağlı olarak protein gideriminin de önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir. Farklı sıcaklıklardaki grupların 1 ve 2 kez yıkamaları arasındaki protein giderimlerinin en fazla 90°C sıcaklıkta (% 37.75), en

düşük ise 65°C sıcaklıkta (% 4.47) olduğu tespit edilmiştir. Farklı ekstraksiyon sürelerindeki 1 ve 2 kez yıkanan numuneler içerisinde 30, 60 ve 90 dakika otolizlenen örneklerin protein giderimleri ortalama % 12.94, 12.30 ve 14.41 olarak bulunmuştur.

NaOH konsantrasyonu sabit tutulup farklı ekstraksiyon süresi, sıcaklığı ve yıkama sayısı üzerine yapılan bu çalışmada optimum protein giderimine 90°C sıcaklıkta 60 dakika bekletilip 2 kez yıkanan grupta rastlanmıştır.

Protein giderim oranının uygulanan yönteme bağlı olarak değiştiği gözlemlenmiştir. Farklı uygulamalar sonucunda en yüksek protein miktarına 0.5N.90.60dk.P.A.S. grubunda, en düşük değere ise 1.5N.P. grubunda rastlanmıştır. Kontrol ve deney gruplarındaki (0.5N.90.60dk.P.A.S., 0.5N.90.60dk.P., 1.5N.2kz., 1.5N.P.) ortalama protein değerleri % 40.58, 7.95, 7.72, 4.90, 1.83 olarak tespit edilmiştir. Tüm deney gruplarının protein değerlerinin kontrole göre istatistiksel olarak farklı olduğu bulunmuştur. 0.5N.90.60dk.P.A.S., 0.5N.90.60dk.P. ve 1.5N.2kz. deney gruplarının protein değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken, 1.5N.P. grubuyla bu örneklerin protein değerleri arasındaki fark anlamlı bulunmuştur.

Geliştirdiğimiz metot sonucunda oluşturduğumuz deney grubu (0.5N.90.60dk.2kz.), en düşük protein değerini veren grup (1.5N.P.) ve patent uygulamasına göre değiştirilmiş grup (0.5N.90.60dk.P.) arasında kül miktarlarındaki değişime bakıldığında 1.5N.P. grubunun kül değerinin (% 5.6), 0.5N.90.60dk.P. (% 3.1) ve 0.5N.90.60dk.2kz. (% 5.1) gruplarınkinden fazla olduğu bulunmuştur.

0.5N.90.60dk.2kz., 0.5N.90.60dk.P. ve 1.5N.P. grupları arasında yağ miktarlarının sırasıyla ortalama % 13.01, 11.81 ve 4.62 olduğu tespit edilmiştir.

Seçilen aynı üç deney grubunda katı madde verimine bakıldığında, verimin 1.5N.P. grubunda ortalama % 6.29, 0.5N.90.60dk.P. grubunda % 7.82, 0.5N.90.60dk.2kz. grubunda ise % 10.29 olduğu belirlenmiştir.



Farklı uygulama metotlarının  $\beta$ -glukan saflığına etkilerini incelemek için deney gruplarının toplam glukan ve  $\alpha$ -glukan değerleri tespit edildikten sonra  $\beta$ -glukan miktarları hesaplanmıştır. Kontrol ve deney gruplarının (O.M.H., 0.5N.90.60dk.2kz., 0.5N.90.60dk.P.A.S., 0.5N.90.60dk.P., 0.5N.O.2kz., 1.5N.P.) toplam glukan miktarları sırasıyla ortalama % 23.09, 25.93, 53.64, 61.53, 64.62, 65.84 ve 65.43 olarak belirlenmiştir. O.M.H. örneği hariç tüm grupların toplam glukan miktarları kontrolden istatistiksel olarak farklı bulunmuştur. 0.5N.90.60dk.2kz. ve 0.5N.90.60dk.P.A.S. gruplarının toplam glukan değerleri kendi aralarında, 0.5N.90.60dk.P.A.S., 0.5N.90.60dk.P., 0.5N.O.2kz. ve 1.5N.P. gruplarının toplam glukan değerlerinin de kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği tespit edilmiştir.

Yapılan incelemede en düşük  $\alpha$ -glukan içeriği O.M.H. deney grubunda gözlemlenirken; en yüksek değer ise 0.5N.90.60dk.P. grubunda bulunmuştur. Kontrol ve deney gruplarının (O.M.H., 0.5N.90.60dk.2kz., 0.5N.90.60dk.P.A.S., 0.5N.90.60dk.P., 0.5N.O.2kz., 1.5N.P.)  $\alpha$ -glukan miktarları aynı sıra ile % 2.74, 3.03, 7.22, 5.84, 8.34, 8.15, 7.75 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında O.M.H. deney grubu hariç tüm gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak geçerli olarak bulunmuştur. 0.5N.90.60dk.2kz., 0.5N.90.60dk.P.A.S., 0.5N.90.60dk.P. gruplarının  $\alpha$ -glukan değerleri birbiri arasında, 0.5N.O.2kz., 1.5N.P., 0.5N.90.60dk.P. ve 0.5N.90.60dk.P.A.S. deney gruplarının değerlerinin de birbiri arasında anlamsız farklılıklar gösterdiği görülmüştür.

$\beta$ -glukanın izolasyonu ve saflaştırılmasının esas alındığı çalışmamızda en fazla  $\beta$ -glukan miktarının 0.5N.O.2kz., en az  $\beta$ -glukan miktarının ise O.M.H. deney gruplarında olduğu bulunmuştur. Kontrol ve uygulama gruplarının (O.M.H., 0.5N.90.60dk.2kz., 0.5N.90.60dk.P.A.S., 0.5N.90.60dk.P., 0.5N.O.2kz., 1.5N.P.)  $\beta$ -glukan değerleri sırasıyla % 20.35, 22.91, 46.42, 55.69, 56.28, 57.69 ve 57.687 olarak hesaplanmıştır. O.M.H. grubunun  $\beta$ -glukan değeri kontrolle kıyaslandığında belirgin bir fark görülmezken; diğer tüm örnek gruplarının  $\beta$ -glukan içeriklerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklı olduğu sonucuna varılmıştır. 0.5N.90.60dk.P.A.S., 0.5N.90.60dk.P., 0.5N.O.2kz. ve 1.5N.P. gruplarının  $\beta$ -glukan değerleri arasında anlamlı bir fark tespit edilmezken, bu deney gruplarının  $\beta$ -glukan

değerleri ile 0.5N.90.60dk.2kz. grubunun aynı değerleri istatistiksel olarak fark göstermiştir.

$\beta$ -glukan; vücudu viral, bakteriyel ve fungal enfeksiyonlardan, tümörden, radyasyon ve stresin yol açtığı olumsuzluklardan koruyan doğal bir bağışıklık geliştiricisidir. Bunun yanı sıra antioksidan ve serbest radikalleri yakalama özellikleri, antibiyotiklerin etkisini arttırma ve vücuttaki LDL kolesterol seviyesini düşürme gibi çok çeşitli faaliyetlerinden dolayı  $\beta$ -glukandan ilaç, yem katkı maddesi, krem gibi farklı ürünlerin yapımında yararlanılmaktadır. Çalışmamızda *Saccharomyces cerevisiae* maya hücresinden farklı uygulamalarla çeşitli saflıklarda  $\beta$ -glukan izole edilmiştir. Bu da bize kullanım amaçlarına göre değişik  $\beta$ -glukan içerikli ürün yapabilme şansı yaratmaktadır. İleride çalışmamızda atık olarak ortaya çıkan proteince zengin üst sıvının da değerlendirilmesi doğrultusunda araştırmalarımız devam edecektir. Ayrıca elde edilen numunlerde mannan miktarlarının tespitiyle ilgili de farklı çalışmalar planlanmaktadır.

## KAYNAKLAR

- [1] Coşkun T., 'Fonksiyonel besinlerin sağlığımız üzerine etkileri', *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 48, 69-84, (2005).
- [2] Freimund S., Sauter M., Käppeli O., Dutler H., 'A new non-degrading isolation process for 1,3-β-D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*', *Carbohydrate Polymers*, 54, 159-171, (2003).
- [3] Kim K. S., Yun H. S., 'Production of soluble β-glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*', *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 496-500, (2006).
- [4] Liu X. Y., Wang Q., Cui S. W., Liu H. Z., 'A new isolation method of β-D-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*', *Food Hydrocolloids*, 22, 239-247, (2008).
- [5] Wang Y., Yao S., Wu T., 'Combination of induced autolysis and sodium hypochlorite oxidation for the production of *Saccharomyces cerevisiae* (1→3)-β-D-glucan', *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 19, 947-952, (2003).
- [6] Šandula J., Kogan G., Kačuráková M., Machová E., 'Microbial (1→3)-β-D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity', *Carbohydrate Polymers*, 38, 247-253, (1999).
- [7] Ceylan N., Çiftçi İ., İlhan Z., 'Büyütme faktörü antibiyotiklere alternatif yem katkılarının etlik piliçlerde besi performansı ve bağırsak mikroflorası üzerine etkileri', *Turk J. Vet. Anim. Sci.*, 27, 727-733, (2003).
- [8] β-glukan krem <http://www.supplementspot.com/images/cb1238.jpg> (**Ziyaret tarihi: 20 Aralık 2009**).
- [9] *Saccharomyces cerevisiae* <http://www.netnutri.com/browse.cfm/4.1975.html>. (**Ziyaret tarihi: 20 Aralık 2009**)
- [10] Kanlayavattanakul M., Lourith N., 'Carboxymethylglucan in cosmetics', *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal*, 3, 3, 378-382, (2008).
- [11] Barnett J. A., Robinow C. F., 'A history of research on yeasts 4: cytology part II, 1950-1990', *Yeast*, 19, 745-772, (2002).
- [12] *Saccharomyces cerevisiae* <http://botit.botany.wisc.edu/toms.fungi/dec.2002.html> (**Ziyaret tarihi: 6 Ekim 2009**).

[13] Kath F., Kulicke W. M., ‘Mild enzymatic isolation of mannan and glucan from yeast *Saccharomyces cerevisiae*’, *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, 268, 59-68, (1999).

[14] *Saccharomyces cerevisiae*  
<http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Saccharomyces> (Ziyaret tarihi: 6 Ekim 2009).

[15] *Saccharomyces cerevisiae*  
<http://www.chateauneuf.dk/en/production/vinification.htm> (Ziyaret tarihi: 9 Ekim 2009)

[16] *Saccharomyces cerevisiae maya hücresi*  
[www.bakeinfo.co.nz/school/images/yeast.jpg](http://www.bakeinfo.co.nz/school/images/yeast.jpg) (Ziyaret tarihi: 1 Ekim 2009).

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

[18] Reed G., Pepler H., J., ‘Yeast Technology’, First edition, *The Avi Publishing Company, Inc.*, 17-19, (1973).

[19] Maya hücre duvarının yapısı [www.biovet.com.tr/Default.aspx?tabid=64](http://www.biovet.com.tr/Default.aspx?tabid=64) (Ziyaret tarihi: 7 Mayıs 2009).

[20] Kim K. S., Yun H. S., ‘Production of soluble  $\beta$ -glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*’, *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 496-500, (2006).

[21] Kitin, <http://www.coe.drexel.edu/ret/personalsites/2005/Nyachwaya/STRUCTURE%20OF%20CHITIN.jpg> (Ziyaret tarihi: 7 Mayıs 2009).

[22] Lesage G., Bussey H., ‘Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*’, *Microbiol Mol. Biol. Rev.*, 70, 317-343, (2006).

[23] Bowman S. M., Free S. J., ‘The structure and synthesis of the fungal cell wall’, *BioEssays*, 28, 799-808, (2006).

[24] Lipke P. N., Ovalle R., ‘Minireview: Cell wall architecture in yeast: New structure and new challenges’, *Journal of Bacteriology*, 180, 15, 3735-3740, (1998).

[25] Molano J., Bowers B., Cabib E., ‘Distribution of chitin in the yeast cell wall’, *The Journal of The Cell Biology*, 85, 199-212, (1980).

[26] Klis F. M., Boorsma A., De Groot P. W. J., ‘Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*’, *Yeast*, 23, 185-202, (2006).

[27] Northcote, D. H., 1970, *The structure and organization of the polysaccharides of yeast* [Online], The Polysaccharides of Yeast,

<http://media.iupac.org/publications/pac/1963/pdf/0704x0669.pdf> (**Ziyaret tarihi: 18 Haziran 2009**).

[28] Cawley T. N., Ballou C. E., 'Identification of two *Saccharomyces cerevisiae* cell wall mannan chemotypes', *Journal of Bacteriology*, 111, 3, 690-695, (1972).

[29] Mannan, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=glyco2&part=ch21> (**Ziyaret tarihi: 18 Haziran 2009**).

[30] Zlotnik H., Fernandez M. P., Bowers B., Cabib E., 'Saccharomyces cerevisiae mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity', *Journal of Bacteriology*, 159, 3, 1018-1026, (1984).

[31] *Saccharomyces cerevisiae*, [http://tr.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces cerevisiae](http://tr.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae) (**Ziyaret tarihi: 18 Haziran 2009**).

[32] Suphantharika M., Khunrae P., Thanardkit P., Verduyn C., 'Preparation of spent brewer's yeast  $\beta$ -glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*', *Bioresource Technology*, 88, 55-60, (2002).

[33] Zlatković D., Jakovljević D., Zeković D., Vrvić M. M., 'A glucan from active dry baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): A chemical and enzymatic investigation of the structure', *J. Serb. Chem. Soc.*, 68, 11, 805-809, (2003).

[34] Disease & Beta-Glucan Chemistry, <http://www.corenutritional.com/customer/pages.php?pageid=14&mode=preview> (**Ziyaret tarihi: 5 Şubat 2009**).

[35] Structure of beta-glucan, <http://www.aureo.co.jp/english/glucan/glucan4.html> (**Ziyaret tarihi: 11 Mayıs 2010**).

[36] 1-6 beta glucan, [http://www.corenutritional.com/images/beta-glucan\\_1-6.gif](http://www.corenutritional.com/images/beta-glucan_1-6.gif) (**Ziyaret tarihi: 11 Mayıs 2010**).

[37] Scleroglucan, [http://www.ualberta.ca/~csps/JPPS10\\_1/REVIEW\\_1167/review\\_1167\\_clip\\_image002\\_0003.gif](http://www.ualberta.ca/~csps/JPPS10_1/REVIEW_1167/review_1167_clip_image002_0003.gif) (**Ziyaret tarihi: 9 Mayıs 2010**).

[38] Survase S. A., Saudagar P. S., Bajaj I. B., Singhal R. S., 'Scleroglucan: Fermentative production, downstream processing and applications', *Food Technol. Biotechnol.*, 45, No.2, 107-118, (2007).

[39] Kang X., Wang Y., Harvey L. M., McNeil B., 'Effect of air flow rate on scleroglucan synthesis by *Sclerotium glaucanicum* in an airlift bioreactor with an internal loop', *Bioprocess Engineering*, 23, 69-74, (2000).

[40] Survase S. A., Saudagar P. S., Singhal R. S., 'Production of scleroglucan from *Sclerotium rolfsii* MTCC 2156', *Bioresource Technology*, 97, 989-993, (2006).

- [41] Pretus H. A., Ensley H. E., McNamee R. B., Jones E. L., Browder I. W., Williams D. L., 'Isolation, physicochemical characterization and periclinical efficacy evaluation of soluble scleroglucan', *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 257, 1, 500-510, (1991).
- [42] Fariña J. I., Siñeriz F., Molina O. E., Perotti N. I., 'High scleroglucan production by *Sclerotium rolfsii*: Influence of medium composition', *Biotechnology Letters*, 20, 9, 825-831, (1998).
- [43] Taurhesia S., McNeil B., 'Physicochemical factors affecting the formation of the biological response modifier scleroglucan', *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 59, 2, 157-163, (2004).
- [44] Wang J., McNeil B., 'Paper effect of temperature on scleroglucan synthesis and organic acid production by *Sclerotium gluconicum*', *Enzyme and Microbial Technology*, 17, 10, 893-899, (1995).
- [45] Coviello T., Palleschi A., Grassi M., Matricardi P., Bocchinfusu G., Alhaique F., 'Scleroglucan: A versatile polysaccharide for modified drug delivery', *Molecules*, 10, 6-33, (2005).
- [46] Freeney M., Casadei M. A., Matricardi P., 'Carboxymethyl derivative of scleroglucan: a novel thermosensitive hydrogel forming polysaccharide for drug delivery applications', *J. Mater Sci.: Mater Med.*, 20, 1081-1087, (2009).
- [47] Coviello T., Grassi M., Lapasin R., Marino A., Alhaique F., 'Scleroglucan/borax: characterization of a novel hydrogel system suitable for drug delivery', *Biomaterials*, 24, 16, 2789-2798, (2003).
- [48] Mastromarino P., Petruzzello R., Macchia S., Rieti S., Nicoletti R., Orsi N., 'Antiviral activity of natural and semisynthetic polysaccharides on the early steps of rubella virus infection', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 39, 339-345, (1997).
- [49] Pietropaolo V., Seganti L., Marchetti M., Sinibaldi L., Orsi N., Nicoletti R., 'Effect of natural and semisynthetic polymers on rabies virus infection in CER cells', *Research in Virology*, 144, 151-158, (1993).
- [50] Marchetti M., Pisani B., Pietropaolo V., Seganti L., Nicoletti R., Degener A., Orsi N., 'Antiviral effect of a polysaccharide from *Sclerotium gluconicum* towards herpes simplex virus type 1 infection', *Planta Med.*, 62, 4, 303-307, (1996).
- [51] Matsuyama H., Mangindaan R. E. P., Yano T., 'Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. Infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*)', *Aquaculture*, 101, 197-203, (1992).
- [52] Bousquet M., Escoula L., Peurière S., Pipy B., Roubinet F., Chavant C., 'Immunopharmacologic study in mice of 2 beta-1,3, beta-1,6 polysaccharides

(scleroglucan and PSAT) on the activation of macrophages and T lymphocytes', *Annals of Veterinary Research*, 20, 2, 165-173, (1989).

[53] Chen J., Seviour R., 'Medicinal importance of fungal  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-glucans', *Mycological research* 3, 47, 635-652, (2007).

[54] Maeda Y. Y., Watanabe S. T., Chihara C., Rokutanda M., 'Denaturation and renaturation of a  $\beta$ -1,6;1,3-glucan, lentinan, associated with expression of T-cell-mediated responses', *Cancer Research*, 48, 671-675, (1988).

[55] Maeda Y. Y., Chihara G., 'Immunomodulatory Agents from Plants', *Birkhäuser*, 203-221, (1999).

[56] Drandarska I., Kussovski V., Nikolaeva S., Markova N., 'Combined immunomodulating effects of BCG and lentinan after intranasal application in guinea pigs', *International Immunopharmacology*, 5, 4, 795-803, (2005).

[57] Markova N., Kussovski V., Radoucheva T., Dilova K., Georgieva N., 'Effects of intraperitoneal and intranasal application of lentinan on cellular response in rats', *International Immunopharmacology*, 2, 12, 1641-1645, (2002).

[58] Gordon M., Bihari B., Goosby E., Gorter R., Greco M., Guralnik M., Mimura T., Rudinicki V., Wong R., Kaneko Y., 'A placebo-controlled trial of the immune modulator, lentinan, in HIV-positive patients: a phase I/II trial', *J. Med.*, 29, 305-330, (1998).

[59] Gordon M., Guralnik M., Kaneko Y., Mimura T., Goodgame J., DeMarzo C., Pierce D., Baker M., Lang W., 'A phase II controlled study of a combination of the immune modulator, lentinan, with didanosine (ddl) in HIV patients with CD4 cells of 200-500/mm<sup>3</sup>', *J. Med.*, 26, 193-207, (1995).

[60] Isoda N., Eguchi Y., Nukaya H., Hosho K., Suga Y., Suga T., Nakazawa S., Sugano K., 'Clinical efficacy of superfine dispersed lentinan ( $\beta$ -1,3-glucan) in patients with hepatocellular carcinoma', *Hepato-Gastroenterology*, 56, 437-441, (2009).

[61] Rau U., 'Carbohydrate biotechnology protocols', Humana Press, *Biomedical and Life Sciences*, 43-55, (2008).

[62] Yanaki T., Norisuye T., Fujita H., 'Triple helix of *Schizophyllum commune* polysaccharides in dilute solution. 3. Hydrodynamic properties in water', *Macromolecules*, 13, 6, 1462-1466, (1980).

[63] Kony D., Damm W., Stoll S., Van Gunsteren W., Hünenberger P., 'Explicit-solvent molecular Dynamics simulations of the polysaccharide schizophyllan in water', *Biophysical Journal*, 93, 2, 444-455, (2007).

[64] Okamura K., Suzuki M., Chihara T., Fujiwara A., Fukuda T., Goto S., Ichinohe K., Jimi S., Kasamatsu T., Kawai N., Mizuguchi K., Mori T., Nakano H., Noda K.,

Sekiba K., Suzuki K., Suzuki T., Takahashi K., Takeuchi K., Takeuchi S., Yajima A., Ogawa N., 'Clinical evaluation of schizophyllan combined with irradiation in patients with cervical cancer. A randomized controlled study', *Cancer*, 58, 4, 865-872, (1986).

[65] Sakagami Y., Mizoguchi Y., Shin T., Kobayashi K., Morisawa S., Yamamoto S., 'Effects of an anti-tumor polysaccharide, schizophyllan, on interferon-gamma and interleukin 2 production by peripheral blood mononuclear cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 155, 2, 650-655, (1988).

[66] Norisuye T., 'Triple stranded helical structure of schizophyllan and its antitumor activity in aqueous solution', *Macromolecular Chemistry and Physics*, 14, 105-118, (2003).

[67] Numata M., Hasegawa T., Fujisawa T., Sakurai K., Shinkai S., 'Beta-1,3-glucan (schizophyllan) can act as a one-dimensional host for creation of novel poly (aniline) nanofiber structures', *Org. Lett.*, 6, 24, 4447-4450, (2004).

[68] Koumoto K., Mizu M., Anada T., Nagasaki T., Shinkai S., Sakurai K., 'Cholesterol-appended  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan schizophyllan for antisense oligonucleotides delivery to enhance the cellular uptake', *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 78, 10, 1821-1830, (2005).

[69] Sakurai K., Kimura T., Koumoto K., Mizu M., Kobayashi R., Shinkai S., 'Application of schizophyllan as a novel gene carrier', *Nucleic Acids Research Supplement*, 1, 223-224, (2001).

[70] Tzianabos A. O., 'Reviews: Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: Structural aspects and biologic function', *Clinical Microbiology Reviews*, 13, No.4, 523-533, (2000)

[71] Mantovani M. S., Bellini M. F., Angeli J. P. F., Oliveira R. J., Silva A. F., Ribeiro L. R., ' $\beta$ -glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer', *Reviews In Mutation Research*, 658, 154-161, (2008).

[72] Reynolds J. A., Kastello M. D., Harrington D. G., Crabbs C. L., Peters C. J., Jemski J. V., Scott G. H., Di Luzio N. R., 'Glucan-induced enhancement of host resistance to selected infectious diseases', *Infection and Immunity*, 30, 1, 51-57, (1980).

[73] Hofer M., Pospíšil, 'Glucan as stimulator of hematopoiesis in normal and gamma-irradiated mice. A survey of the authors' results', *Int. J. Immunopharmac.*, 19, No.9/10, 607-609, (1997).

[74] Vetvicka V., Vetvickova J., 'Effects of yeast-derived  $\beta$ -glucans on blood cholesterol and macrophage functionality', *Journal of Immunotoxicology*, 6, 1, 30-35, (2009).



- [75] Walinder G., Arora R. G., Bierke P., Broomé-Karlsson A., Svedenstål B. M., 'Effects of glucan on the reticuloendothelial system and on the development tumors in <sup>90</sup>Sr-exposed mice', *Acta Oncologica*, 31, 4, 461-467, (1992).
- [76] Pelizon A. C., Kaneno R., Soares A. M. V. C., Meira D. A., Sartori A., 'Immunomodulatory activities associated with  $\beta$ -glucan derived from *Saccharomyces cerevisiae*', *Physiol. Res.*, 54, 557-564, (2005).
- [77] Akinobu Y., Takeo H., Hajime M., Hitoshi M., Toru T., 'Antitumor and radiation protection effects of beta-1,3-D-glucan extracted from yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)', *Radioisotopes*, 52, 12, 687-691, (2003).
- [78] Di Luzio N. R., Williams D. L., 'Protective effect of glucan against systemic *Staphylococcus aureus* septicemia in normal and leukemic mice', *Infection and Immunity*, 20, 3, 804-810, (1978).
- [79] Kokoshis P. L., Williams D. L., Cook J. A., Di Luzio N. R., 'Increased resistance to *Staphylococcus aureus* infection and enhancement in serum lysozyme activity by glucan', *Science*, 199, 4335, 1340-1342, (1978).
- [80] Olsan E. J., Standing J. E., Griego-Harper N., Hoffman O. A., Limper A. H., 'Fungal  $\beta$ -glucan interacts with vitronectin and stimulates tumor necrosis factor alpha release from macrophages', *Infection and Immunity*, 64, 9, 3548-3554, (1996).
- [81] Battle J., Ha T., Li C., Beffa V. D., Rice P., Kalbfleisch J., Browder W., Williams D., 'Ligand binding to the (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan receptor stimulates NF $\kappa$ B activation, but not apoptosis in U937 cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 249, 2, 499-504, (1998).
- [82] Stashenko P., Wang C. Y., Riley E., Wu Y., Ostroff G., Niederman R., 'Reduction of infection-stimulated periapical bone resorption by the biological response modifier PGG glucan', *Journal of Dental Research*, 74, 1, 323-330, (1995).
- [83] Kernodle D. S., Gates H., Kaiser A. B., 'Prophylactic anti-infective activity of poly-[1-6]-beta-D-glucopyranosyl-[1-3]-beta-D-glucopyranose glucan in a guinea pig model of staphylococcal wound infection', *Antimicrob Agents Chemother*, 42, 3, 545-549, (1998).
- [84] Kırkpınar F., Açıkgöz Z., 'Kanatlı hayvanlarda nişasta tabiyatında olmayan polisakaritlerin sindirim sistemi mikroflorası üzerine etkileri', *Hayvansal Üretim*, 44, 2, 20-28, (2003).
- [85] AGRİMOS®, 'Kanatlı beslemede antibiyotiklere doğal alternatifler', *Br-09*, 54-61, (2006).
- [86] Mikotoksin tutuklayıcı, <http://www.simbiyotek.com/simDeTox.pdf> (**Ziyaret tarihi: 9 Aralık 2008**).

- [87] Alphasun®, <http://www.vimar.com.tr/images/pdf/Alphasun.pdf> (**Ziyaret tarihi: 10 Haziran 2009**).
- [88] INVIVOMOS®, <http://www.molarmos.com/invivomos.html> (**Ziyaret tarihi: 10 Haziran 2009**).
- [89] Mannanooligosakkaritler, <http://www.tarimsal.com/aquamycetes/aquamycetes.htm> (**Ziyaret tarihi: 3 Kasım 2009**).
- [90] Huff G. R., Huff W. E., Rath N. C., Tellezt G., 'Immunology, health, and disease: Limited treatment with  $\beta$ -1,3/1,6-glucan improves production values of broiler chickens challenged with *Escherichia coli*', *Poultry Science Association, Inc.*, 85, 613-618, (2006).
- [91] Kogan G., Kocher A., 'Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection', *Livestock Science*, 109, 161-165, (2007).
- [92] Hiss S., Sauerwein H., 'Influence of dietary  $\beta$ -glucan on growth performance, lymphocyte proliferation, specific immune response and haptoglobin plasma concentrations in pigs', *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.*, 87, 2-11 (2003).
- [93] Bio-Mos®, <http://aquafeed.com/docs/ns/Staykovetal.pdf> (**Ziyaret tarihi: 14 Ağustos 2009**).
- [94] García-Ruiz A. I., Pérez-Bonilla A., Pérez de Ayala P., Eissen J., 'Effect of yeast  $\beta$ -glucans on rabbit performances and mortality from 35 to 63 days of age', *9th World Rabbit Congress*, 673-676, Verona-Italy, 10-13 Haziran (2008).
- [95] Siwicki A. K., Kazuń K., Głqbski E., Terech-Majewska E., Baranovski P., Trapkowska S., '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, 54, 59-61, (2004).
- [96] Bonaldo A., Thompson K. D., Manfrin A., Adams A., Murano E., Mordenti A. L., Gatta P. P., 'The influence of dietary  $\beta$ -glucans on the adaptive and innate immune responses of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) vaccinated against vibriosis', *Ital. J. Anim. Sci.*, 6, 151-164, (2007).
- [97] Worrasinchai S., Suphantharika M., Pinjai S., Jamnong P., ' $\beta$ -glucan prepared from spent brewer's yeast as a fat replacer in mayonnaise', *Food Hydrocolloids*, 20, 68-78, (2006).
- [98] Milić T. V., Rakin M., Šiler-Marinković S., 'Utilization of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) for the production of yeast extract: effects of different enzymatic treatments on solid, protein and carbohydrate recovery', *J.Serb. Chem. Soc.*, 75, 5, 451-457, (2007).

- [99] Mler A., Ensley H., Pretus H., McNamee R., Jones E., McLaughlin E., Chandley W., Browder W., Lowman D., Williams D., ‘The application of various protic acids in the extraction of (1→3)-β-D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae*’, *Carbohydrate Research*, 299, 203-208, (1997).
- [100] Ohno N., Miura T., Miura N. N., Adachi Y., Yadomae T., ‘Structure and biological activities of hypochlorite oxidized zymosan’, *Carbohydrate Polymers*, 44, 339-349, (2001).
- [101] Magnani M., Calliari C. M., De Macedo F. C., Mori M. P., De Syllos Clus I. M., Castro-Gomez R. H., ‘Optimized methodology for extraction of (1→3)(1→6)-β-D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* and in vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of the corresponding carboxymethyl derivative’ *Carbohydrate Polymers*, 78, 658-665, (2009).
- [102] Kelemen M. V., Sharpe J. E. E., ‘Controlled cell disruption: A comparison of the forces required to disrupt different micro-organisms’, *J. Cell Sci.*, 35, 431-441, (1979).
- [103] Lida Y., Tuziuti T., Yasui K., Kozuka T., Towata A., ‘Protein release from yeast cells as an evaluation method of physical effects in ultrasonic field’, *Ultrasonics Sonochemistry*, 15, 995-1000, (2008).
- [104] Otero M. A., Vasallo María del C., Verdecia O., Fernández V. & Betancourt D., ‘A process for the complete fractionation of baker’s yeast’, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 67, 67-71, (1996).
- [105] Borthwick K. A. J., Coakley W. T., McDonnell M. B., Nowotny H., Benes E., Grschl M., ‘Development of a novel compact sonicator for cell disruption’, *Journal of Microbiological Methods*, 60, 207-216, (2005)
- [106] Donzis Byron A., ‘Method for revitalizing skin by applying topically water insoluble glucan’, *US Patent*, 5, 223, 491, (1993).
- [107] Megazyme, ‘Mushroom and yeast beta-glucan assay procedure, K-YBGL’, *Megazyme International Ireland Ltd.*, Ireland, (2005).
- [108] MEGEP, ‘Gıdalarıda Nem ve Toplam Kuru Madde Tayini, Gıda Teknolojisi’, *Mesleki Eğitim ve ğretim Güçlendirilmesi Projesi*, 20-24, Ankara, (2007).
- [109] TSE ‘Hayvan yemleri-Azot muhtevasının tayini ve ham protein muhtevasının hesaplanması-Bölüm 1: Kjeldahl metodu’, *Türk Standardları Enstitüsü*, Türkiye, (2009).
- [110] AOAC 991.36,2005 numaralı patent, [http://www.aoac.org/omarev1/991\\_36.pdf](http://www.aoac.org/omarev1/991_36.pdf) (**Ziyaret tarihi: 15 Kasım 2009**).
- [111] SPSS Inc., *SPSS 10.0 Statistics SPSS*, Chicago, IL,(1999).

[112] Martínez-Rodríguez A. J., Polo M. C., Carrascosa A. V., 'Structural and ultrastructural changes in yeast cells during autolysis in a model wine system and in sparkling wines', *International Journal of Food Microbiology*, 71, 45-51, (2001).

[113] Kessler G., Nickerson W. J., 'Glucomannan-protein complexes from cell walls of yeasts', *The Journal of Biological Chemistry*, 234, 9, 2281-2285, (1959).

[114] Thanardkit P., Khunrae P., Suphantharika M., Verduyn C., 'Glucan from spent brewer's yeast: preparation, autolysis and use as a potential immunostimulant in shrimp feed', *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 18, 527-539, (2002).

[115] Beta glukun analiz sertifikası, <http://www.molarmos.com/analiz/MolarmixMinZn.pdf> (**Ziyaret tarihi: 18 Kasım 2009**).

[116] Certificate of beta glucun analysis, [http://www.beta-glucun.com/c\\_of\\_A.htm](http://www.beta-glucun.com/c_of_A.htm) (**Ziyaret tarihi: 18 Kasım 2009**).

[117] Immune system activator, <http://www.netnutri.com/browse.cfm/4,1902.htm> (**Ziyaret tarihi: 18 Kasım 2009**).

[118] Beta glukun certificate of analysis, <http://www.transferpoint.com/t-betacertificate.aspx> (**Ziyaret tarihi: 18 Kasım 2009**).

## **ÖZGEÇMİŞ**

1983 yılında Kocaeli’de doğdu. Orta öğretimini Ankara’da Batıkent Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi’nde 2001 yılında tamamladı. Aynı yıl Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji (İngilizce) Bölümü’nü kazandı. 2006 yılında biyolog olarak mezun oldu. 2007 yılında Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalında yüksek lisansa başladı.