Bazı Makrofungus Türlerinden İzole Edilmiş Polisakkaritlerin *in vitro* ve *in vivo* Prebiyotik Aktivitesinin Belirlenmesi

Esra Uthan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Mayıs 2018

In vitro and *in vivo* Prebiotic Activity Assay of Polysaccharide Extracted from Some Mushrooms

Esra Uthan

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

May 2018

Bazı Makrofungus Türlerinden İzole Edilmiş Polisakkaritlerin *in vitro* ve *in vivo* Prebiyotik Aktivitesinin Belirlenmesi

Esra Uthan

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Temel ve Endüstriyel Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Yamaç

Mayıs 2018

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Esra Türsen Uthan'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Bazı Makrofungus Türlerinden İzole Edilmiş Polisakkaritlerin *in vitro* ve *in vivo* Prebiyotik Aktivitesinin Belirlenmesi" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Mustafa Yamaç

İkinci Danışman : ––

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Prof. Dr. Mustafa Yamaç

Üye : Prof. Dr. Aysun Pekşen

Üye : Prof. Dr. Semra İlhan

Üye : Doç. Dr. Buket Kunduhoğlu

Üye : Doç. Dr. Hakan Şentürk

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım klavuzuna göre, Prof. Dr. Mustafa Yamaç danışmanlığında hazırlamış olduğum "Bazı Makrofungus Türlerinden İzole Edilmiş Polisakkaritlerin *in vitro* ve *in vivo* Prebiyotik Aktivitesinin Belirlenmesi" başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 02/05/2018

Esra Uthan

İmza

ÖZET

Bu çalışmanın ilk aşamasında *Agaricus bisporus* (beyaz suş), *Agaricus bisporus* (kestane suşu), *Boletus edulis, Cantharellus cibarius, Ganoderma lucidum, Pleurotus ostreatus* ve *Trametes versicolor* makrofunguslarından ekstrakte edilen polisakkaritlerin *in vitro* prebiyotik etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus acidophilus* ve *Escherichia coli* bakterilerinin % 0,25, % 0,5, % 1,0 ve % 2 konsantrasyonlarında polisakkarit varlığında üremesi 48 saat süre ile mikropetri kuyularında nefalometrik olarak izlenmiştir. Negatif ve pozitif kontrol grubu olarak sırası ile glikoz ve inulin kullanılmıştır. En yüksek *in vitro* prebiyotik aktivite *Cantharellus cibarius* polisakkaridinin (CCP) % 0,25 konsantrasyonda elde edilmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında % 0,25 CCP'nin *in vivo* koşullardaki prebiyotik etkisi mikrobiyolojik, biyokimyasal ve histolojik parametreler ile araştırılmıştır. Mikrobiyolojik parametre olarak, *in vivo* deneylerden elde edilen bağırsak örneklerinde *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp. ve *Clostridium* spp. sayımı yapılmıştır. *Lactobacillus* spp. ve *Bifidobacterium* spp.'nin en fazla üremesi CCP ile beslenen sıçanlarda olmuştur. En yüksek *Bacteroides* spp. ve *Clostridium* spp. üremesinin ise negatif ve pozitif kontrol grubunda olduğu belirlenmiştir. Elde edilen veriler ışığında CCP'nin prebiyotik olarak bir potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Makrofungus, mikrobiyota, prebiyotik, *in vitro*, *in vivo.*

SUMMARY

In the first step on this study the *in vitro* prebiotic activity of some mushrooms (*Agaricus bisporus* (white), *Agaricus bisporus* (brown), *Boletus edulis, Cantharellus cibarius, Ganoderma lucidum, Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor*) polysaccharides were investigated. For this purpose, the growth of *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus acidophilus* and *Escherichia coli* bacteria in presence of 0.25%, 0.5%, 1.0% and 2% concentrations mushroom polysaccharides was monitored nephometrically in microplate wells during 48 hours. Glucose and inulin were used as negative and positive control group, respectively. The highest *in vitro* prebiotic activity was obtained in the 0.25% dose of *Cantharellus cibarius* polysaccharide (CCP). In the second step of the study, the *in vivo* prebiotic effect of CCP (0,25%) was investigated by microbiological, biochemical and histological parameters. The colonic *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp. and *Clostridium* spp. were counted as microbiological parameters. The highest colony numbers of *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. were obtained in the group of CCP. On the other hand, the highest *Bacteroid*es spp. and *Clostridium* spp. colony numbers were counted in negative and positive control groups. As a result, it has been observed that CCP has a potential as a prebiotic.

Keywords: Macrofungi, microbiota, prebiotic, *in vitro*, *in vivo.*

TEŞEKKÜR

Tez danışmanlığımı üstlenerek çalışmalarımın planlanmasında ve yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen ve bana her zaman destek olan sayın hocam Prof. Dr. Mustafa YAMAÇ'a sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmamda kullanılan *Cantharellus cibarius* bazidiokarplarının temini için destek olan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Öğretim Üyesi sayın Prof. Dr. Aysun PEKŞEN'e, besiyeri teminini finanse eden Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Araştırma Merkezi'ne teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvarda gösterdikleri yardımlaşma ve dayanışmadan dolayı tüm Fungikültür laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Bu süreçte benden desteğini asla esirgemeyen kıymetli eşim Furkan UTHAN'a çok teşekkür ederim.

İyi bir öğrenim görmem için her türlü olanağı sağlayan, bana her zaman güvenen, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili annem Birsen TÜRSEN ve sevgili babam Hasan TÜRSEN'e ve bana hem arkadaş hem de kardeş olan canım ablalarım Ebru ÖZTÜRK ve Elçin ERKARATAŞ'a en içten dileklerimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET ……..……..…….....vi
SUMMARY …….....vii
TEŞEKKÜR …..…….....viii
İÇİNDEKİLER …….....ix
ŞEKİLLER DİZİNİ …….....xi
ÇİZELGELER DİZİNİ …….....xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ …….....xv
1.GİRİŞ VE AMAÇ …….....1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI ……..…….....2
2.1. Mikrobiyota / Mikrobiyom Kavramı ……..……..…….....2
2.2. Mikrobiyotanın Konak Canlıya Yararlı Etkinlikleri …….....4
2.3. Prebiyotik besin maddeleri ……..…….....10
2.4. Makrofungusların prebiyotik olarak önemi .....…….....14
3. MATERYAL VE YÖNTEM …….....20
3.1. MATERYAL ...……..…….....20
3.1.1. Makrofungus polisakkaritlerinin *in vitro* prebiyotik aktivitesinin araştırılması ...……..……...20
3.1.1.1. *In vitro* prebiyotik aktivite belirlemede kulanılan bakteriler …..….....20
3.1.1.2. *In vitro* prebiyotik aktivitesi araştırılan makrofungus türleri 21
3.1.1.3. Kullanılan besiyerleri ve çözeltiler 21
3.1.2. Seçilen makrofungus polisakkaritinin *in vivo* prebiyotik aktivitesinin araştırılması 22
3.1.2.1. Deney hayvanları 22
3.1.2.2 Kullanılan besiyerleri ve çözeltiler ……...……..….....23
3.2. YÖNTEM ……..……..……..24
3.2.1. Makrofungus polisakkaritlerinin *in vitro* prebiyotik aktivitesinin araştırılması ……..……..….....24

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2.1.1. Makrofungus polisakkarit fraksiyonlarının hazırlanması ……...24
3.2.1.2.Makrofungus polisakkaritlerinin i*n vitro* prebiyotik aktivitesinin belirlenmesi ...……..……..……...…...25
3.2.2. Seçilen makrofungus polisakkaritinin *in vivo* prebiyotik aktivitesinin araştırılması 26
3.2.2.1. Hayvanlara ait genel inceleme parametreleri 27
3.2.2.2. Mikrobiyolojik inceleme parametreleri ……..…....…….…28
3.2.2.3. Biyokimyasal inceleme parametreleri ……...……...……..…..30
3.2.2.4. Histolojik inceleme parametreleri ……...……...……..…30
3.2.3. İstatistiksel analiz ……..……30
4. BULGULAR VE TARTIŞMA ……..……...…..…....31
4.1. Makrofungus polisakkarit fraksiyonlarının hazırlanması ……...…..….....…31
4.2. Makrofungus polisakkaritlerinin *in vitro* prebiyotik aktivitesinin araştırılması ...……...…..…34
4.3. Seçilen makrofungus polisakkaritinin *in vivo* prebiyotik aktivitesinin araştırılması 57
4.3.1. Hayvanlara ait genel inceleme parametreleri 57
4.3.1.1. Büyüme performansları ...…….……..…….....…57
4.3.1.2. Yem ve su tüketim oranı ……...……..……..…..…..58
4.3.2.Mikrobiyolojik inceleme parametreleri ...……..……..…..60
4.3.2.1. Barsağın ileum-çekum kısmında bakteri sayımı …….……...…..…60
4.3.2.2. Prebiyotik indeksin hesaplanması …….……..…..……..…....65
4.3.3.Biyokimyasal inceleme …….……..……...66
4.3.4.Histolojik inceleme ……..……..…….……...66
5. SONUÇ VE ÖNERİLER ……..……..……...……...70
KAYNAKLAR DİZİNİ ……..……...……...73

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil **Sayfa**

2.1. Sindirim sistemi bölümlerinin anatomisi ile burada yer alan bakteri grupları ve miktarları ……..…..…..3

2.2. Prebiyotiklerin konak canlı bağırsağındaki bazı etkileri ……....……...12

3.1. Nefalometre …….……25

4.1. Farklı konsantrasyonlardaki inulinin *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum* ve *Escherichia coli'*nin üremesine etkisi ……..…..35

4.2. Farklı konsantrasyonlardaki glukozun *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum* ve *Escherichia coli'*nin üremesine etkisi ……....36

4.3. Farklı konsantrasyonlardaki *Agaricus bisporus* (beyaz form) polisakkaritlerinin (ABP) *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum* ve *Escherichia coli*'nin üremesine etkisi …….…..……...39

4.4. Farklı konsantrasyonlardaki *Agaricus bisporus* (kestane formu) polisakkaritlerinin (ABKP) *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum* ve *Escherichia coli*'nin üremesine etkisi …….……...…41

4.5. Farklı konsantrasyonlardaki *Boletus edulis* polisakkaritlerinin *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum* ve *Escherichia coli* 'nin üremesine etkisi …….……..….43

4.6. Farklı konsantrasyonlardaki *Cantharellus cibarius* polisakkaritlerinin *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum* ve *Escherichia coli* 'nin üremesine etkisi ..……..…….……...…45

4.7. Farklı konsantrasyonlardaki *Ganoderma lucidum* polisakkaritlerinin *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum* ve *Escherichia coli*'nin üremesine etkisi ……..48

4.8. Farklı konsantrasyonlardaki *Pleurotus ostreatus* polisakkaritlerinin *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum* ve *Escherichia coli*'nin üremesine etkisini ……...…….....……49

4.9. Farklı konsantrasyonlardaki *Trametes versicolor* polisakkaritlerinin *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum* ve *Escherichia coli* 'nin üremesine etkisi ……...…….....52

4.10. Sıçanların yem tüketim miktarı …….……..……...…..58

4.11. Sıçanların su tüketim miktarı …….…….....….59

4.12. *Lactobacillus* sp. nin MRS besiyerinde koloni morfolojisi ……..……..…….....60

4.13. *Bifidobacterium* sp. nin Bifidobacterium Agar besiyerinde koloni morfolojisi …...61

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil **Sayfa**

4.14. Bacteroides sp. nin Bacteroides Bile Esculin Agar besiyerinde koloni morfolojisi a. Steril Bacteroides Bile Esculin Agar besiyeri, b. Bacteroides sp. varlığında Bacteroides Bile Esculin Agar besiyeri ……..……...61

4.15. *Clostridium* sp. nin Reinforced Clostridial Agar besiyerinde koloni morfolojisi 62

4.16. Mesenter dokuda yayılım göseren granüle ve degranüle mast hücrelerinin genel görünümü; granüle mast hücreleri; degranüle mast hücreleri; negatif kontrol grubu, CCP deney grubu ve pozitif deney grubu hayvanlarının mesenter dokularında tespit edilmiş olan mast hücreler…..……...68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge **Sayfa**

2.1. Çeşitli prebiyotik tipleri ve kaynakları ...14

2.2. Bazı makrofungus polisakkaritleri ve önemi ...16

3.1. Makrofungus polisakkaritlerinin *in vitro* etkisi araştırılan bağırsak mikrobiyotası üyesi bakteriler ve kaynakları ...20

3.2. Nefalometrede kullanılan değişkenler ve değerleri 26

3.3. Sayımı yapılan bakteri cinsleri ve sayım koşulları ..29

4.1. Makrofungus türleri ve polisakkarit verimleri ...31

4.2. İnulinin test mikroorganizmalarının üremesi üzerine etkisi ..34

4.3. Glukozun test mikroorganizmalarının üremesi üzerine etkisi ..37

4.4. *Agaricus bisporus* (beyaz form) polisakkaridinin (ABP) test mikroorganizmalarının üremesi üzerine etkisi ...38

4.5. *Agaricus bisporus* (kestane formu) polisakkaridinin (ABKP) test mikroorganizmalarının üremesi üzerine etkisi ..42

4.6. *Boletus edulis* polisakkaridinin (BEP) test mikroorganizmalarının üremesi üzerine etkisi ..44

4.7. *Cantharellus cibarius* polisakkaridinin (CCP) test mikroorganizmalarının üremesi üzerine etkisi ..46

4.8. *Ganoderma lucidum* polisakkaridinin (GLP) test mikroorganizmalarının üremesi üzerine etkisi ..47

4.9. *Pleurotus ostreatus* polisakkaridinin (POP) test mikroorganizmalarının üremesi üzerine etkisi ..50

4.10. *Trametes versicolor* polisakkaridinin (TVP) test mikroorganizmalarının üremesi üzerine etkisi ..51

4.11. Deney ve kontrol gruplarının *Lactobacillus plantarum* bakterisinin üremesi üzerine etkisi ..55

4.12. Deney ve kontrol gruplarının *Lactobacillus acidophilus* bakterisinin üremesi üzerine etkisi ...55

4.13. Deney ve kontrol gruplarının *Escherichia coli* bakterisinin üremesi üzerine etkisi ...56

4.14. Spesifik büyüme oranları ..57

4.15. Deney ve kontrol gruplarında bakteri koloni sayısı ...63

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

Çizelge **Sayfa**

4.16. Deney ve kontrol gruplarının prebiyotik indeks değerleri ……..……65
4.17. Deney ve kontrol gruplarının biyokimyasal parametre değerleri ….……66
4.18. Deney ve kontrol gruplarının histolojik parametre değerleri …….……...69

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
ABP	*Agaricus bisporus* polisakkarit
ABPK	*Agaricus bisporus* polisakkarit kestane
BEP	*Boletus edulis* polisakkarit
CCP	*Cantharellus cibarius* polisakkarit
GLP	*Ganoderma lucidum* polisakkarit
POP	*Pleurotus ostreatus* polisakkarit
TVP	*Trametes versicolor* polisakkarit
RNU	Relative Nephalometric Unit
MRS	Man, Rogosa and Sharpe
İMP	İnsan Mikrobiyom Projesi
mL	Mililitre
L	Litre
Da	Dalton
DNA	Deoksiribonukleik Asit
RNA	Ribonukleik Asit
mg	Miligram
g	Gram
s	Saniye
cfu	Colony Forming Unit
kob	Koloni Oluşturma Birimi
M	Molar
TCA	Triklor Asetik Asit
TMAO	Trimetilamin N_Oksit
LDL	Low Density Lipoprotein
HDL	High Density Lipoprotein
LPS	Lipopolisakkarit
SCFA	Short Chain Fatty Acid
a/h	ağırlık/hacim

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Prebiyotikler, probiyotik bakterilerin üremesini arttırma ve patojen mikroorganizmaların üremesini önleme yolu ile gastrointestinal sistemde mikrobiyota dengesini konak canlı lehine düzenleyen oligosakkarit ve polisakkarit yapıdaki biyolojik ürünlerdir (Bhakta ve Kumar, 2013).

Bir besinsel bileşenin prebiyotik olarak sınıflandırılmasında kullanılan başlıca kriterler;

a) Sindirim enzimleri tarafından hidrolize uğramaması ve absorbe olmaması,
b) Sindirim kanalındaki yararlı bakterileri seçici şekilde zenginleştirmesi ve bunların aktivitelerini yine canlının lehine değiştirmesi,
c) Konağa yararlı lokal ve sistemik etkiler yapması,

olarak özetlenebilir (Bayırbağ, 2007).

Zayıf ve dengesiz beslenme, alkol ve sigara alımı gibi etmenler obezite, diyabet, koroner hastalıklar ve kansere sebep olabilmektedir. Prebiyotikler bu hastalıkların etkilerini önlediği ya da azalttığı için prebiyotiklere olan talep giderek artmaktadır (Bhakta ve Kumar, 2013).

Makrofunguslar hücre çeperlerinde glukan, kitin ve heteropolisakkaritler gibi sindirilemeyen lifler içermeleri nedeni ile prebiyotik aktiviteye sahiptirler. Bu polisakkaritlerin en büyük avantajı bağışıklığı güçlendirici, antikanser, antibakteriyel, antifungal ve antioksidan etkilerinin bulunmasıdır. Ayrıca makrofunguslar bazı vitaminleri de içermektedir (Bederska-Lojewska vd., 2017). Bu sayede makrofungus tüketicileri prebiyotik etkinin yanı sıra diğer olası biyoaktif metabolitlerden de yararlanmış olacaklardır (Aida vd., 2009). Bu çalışmada farklı makrofungus türlerinden elde edilen polisakkarit fraksiyonlarının prebiyotik etkiye sahip olup olmadıkları *in vitro* ve *in vivo* koşullarda sorgulanmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Mikrobiyota / Mikrobiyom Kavramı

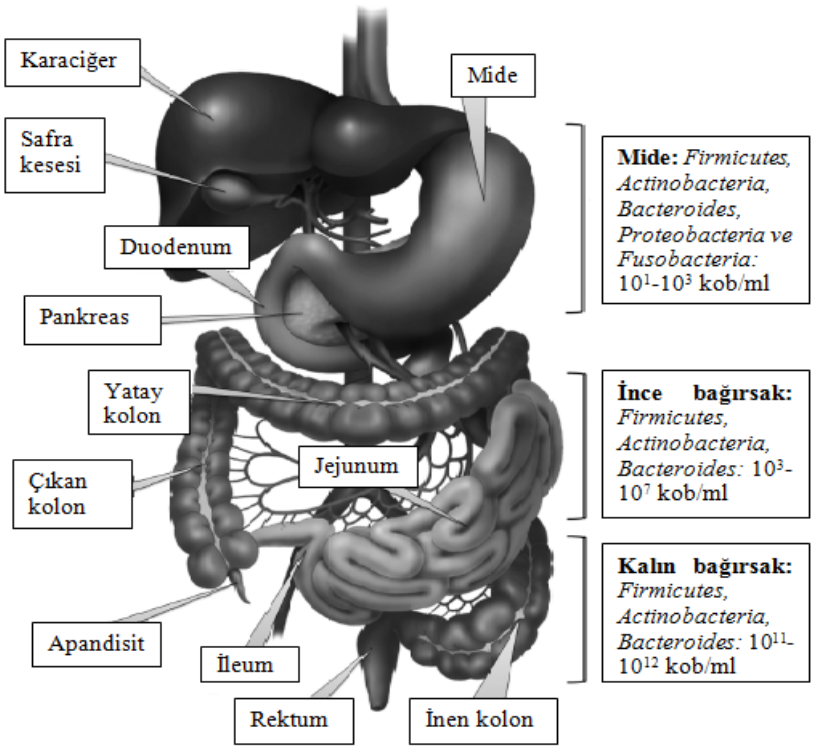
Gastrointestinal alan besinlerin hazmını kolaylaştıran ve hastalıkları önleyen bakteriler ile konak canlı için olumsuz etkilere sahip bakterilerin dengesini ve immün sistem hücrelerini içerir. Bağırsaklarda bulunan total mikroorganizma kitlesi bağırsakta döşenmiş, dinamik bir bileşimdir. Bu bakteri kitlesi "mikrobiyota" veya "mikrobiyom" olarak adlandırılır (Ferrao vd., 2017). Bazı araştırıcılar mikrobiyom kavramını bağırsakta var olan kommuniteye ait total genler olarak da ele almaktadır. Bağırsak komunitesinde var olan denge değişirse konak canlının fizyolojik ve psikolojik sağlığı bu durumdan etkilenir. Bu nedenle kolonda bulunan mikrobiyal dinamik konak canlının sağlığı konusunda önemli işleve sahip olup, insan sağlığını koruyan bir bakteriyoterapi niteliği taşır.

İnsan vücudunda yaşayan bakteriler konak canlıya ait genler, yaş, diyet ve yaşam tarzı gibi etkenlerden etkilenirler. Stres, zayıf beslenme, antibiyotik alımı ya da yorgunluk gibi nedenlerle bağırsak biyota dengesi bozulmaktadır. Bu gibi istenmeyen durumlarda en azından ishal, bağışıklık düşüşü, besin emiliminin azalması gibi bazı hastalıklara sebep olmaktadır (Ferrao vd., 2017).

İnsan mikrobiyom projesi (İMP) (Human Microbiome Project, HMP) insan mikrobiyomunu ve mikrobiyotayı oluşturan mikroorganizmaların dağılımını, çeşitliliğini ve mikroevrimini etkileyen faktörleri, mikroorganizmaların sağlık ve hastalıktaki rollerini belirlemek amacıyla ABD Ulusal Sağlık Enstitüsü tarafından başlatılmış ve Avrupa'dan Asya'ya kadar ilerlemiş interdisipliner bir çalışmadır (Turnbaugh vd., 2007). İnsan mikrobiyomunun özü konak yaşam tarzı, genotip, yaşı, beslenmesi, psikolojisi, patobiyolojisi, çevresi ve bağışıklık sistemi ile ilişkilidir. Bu faktörlere göre mikrobiyota kişiden kişiye farklılık ve çeşitlilik göstermektedir. İMP'de amaç bu gibi faktörlere ilişkin kişiye özgü hastalıkların tedavisini geliştirmektir (Turnbaugh vd., 2007; Gevers vd., 2012).

İnsan bağırsak mikrobiyotası mantarları, bakterileri, virüsleri ve diğer ökaryotik türleri de içeren 100 trilyon hücreden oluşmaktadır (Marchesi, 2011). Memelilerin bağırsak mikrobiyotasında baskın olarak olmak üzere dört bakteri filumu vardır: *Firmucutes, Bacteroidetes, Actinobacteria* ve *Proteobacteria* (Kinross vd., 2011). Stearnes vd. (2011) de baskın olarak *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* ve *Spirochaetes* grubu bakterilerin mikrobiyotada yer aldığını bildirmiştir. Villmones vd. (2017) mikrobiyotanın tipik olarak fakültatif anaerob bakterileri içerdiğini bildirmektedir. Bunlardan baskın olarak bulunan bakteri cinsleri; *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Gemella*, *Granulicatella*, *Rothia*, *Atopobium*, *Lachnoanaerobaculum*, *Oribacterium* ve *Solobacterium* olarak sayılabilir. Sayıca fazla olan türler ise; *Atopobium parvulum*, *Oribacterium asaccharolyticum*, *Oribacterium sinus*, *Solobacterium moorei*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *Parvimonas micra* ve *Bifidobacterium longum* olarak belirlenmiştir. *Bacteroides* ve *Clostridium* cinslerine de çok az miktarda rastlanmışıtır.

Şekil 2.1'de gastrointestinal sistemin anatomisi ve burada kolonize olmuş bakteri türleri ve miktarları gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Sindirim sistemi bölümlerinin anatomisi ile burada yer alan bakteri grupları ve miktarları (Marchesi, 2011).

Vücut enzimleri tarafından besinlerin sindiriminin artmasıyla bağırsak mikrobiyotası desteklenir. Dolayısıyla bağırsak habitatında yüzlerce bakteri türü oluşur ve mikrobiyal populasyon 10^{12} kob/g'a kadar ulaşabilir (Tuohy vd., 2002). İnsan bağırsak mikrobiyotası 10^{12}-10^{14} kadar mikroorganizma içermektedir. Konukçuda yararlı bir probiyotik etkiye sahip olabilmesi için laktik asit bakterilerinin sayısının 10^{6}-10^{8} kob/ml aralığında olması gerekmektedir (Chou vd., 2013). Yapılan bir çalışmada iki sağlıklı yetişkin insanın dışkısından 78 milyon DNA dizisi ve 2062 polimeraz zincir reaksiyonu ile güçlendirilmiş 16S ribozomal DNA dizisi elde edilmiştir (Gill vd., 2013). Bu çalışmada önceki çalışmalarda belirlenen ortalama değerde insan genomu ile mikrobiyal genom dizisi karşılaştırılmıştır. Bu metagenomik analiz sağlıklı insanların bağırsak mikrobiyotasındaki gen içeriğini ve şifrenin fonksiyonel niteliğini tanımlamak için kullanılabilir. Mikrobiyom, farklı çevrelerde yaşayan insanlarda yaş, diyet, patolojik duruma (obezite, kanser vb.) göre etkilidir. Ayrıca çevre koşullarına göre değişkenlik gösterebilir. Bu mikroevrim sağlığımızı tanımlamak için yeni biyoişaretler, kişisel beslenmemizdeki yeni yolların belirlenmesi, kişisel ve sosyal eğilimlerimizi ve davranış bozukluklarımızı tahmin etmekte yeni alternatif yol olabilir (Gill vd., 2013).

2.2. Mikrobiyotanın Konak Canlıya Yararlı Etkinlikleri

Sindirim sistemimiz direkt olarak beynimiz ile bağlantılıdır. Aslında sindirimimiz sürekli bizim ruh halimizi, psikolojimizi, stres ve endişelerimizi etkileyen "ikinci beynimiz" olarak kabul edilmektedir (Shreiner vd., 2015; Ferrao vd., 2017). Son yıllarda mikrobiyotayı bir organ olarak kabul eden yaklaşımlar da oldukça kabul görmektedir. Bu "ikinci beyin" ya da "organ" ın konak canlı vücudunda gerçekleşen birçok fizyolojik ve psikolojik sürece direkt ya da dolaylı olarak olumlu ya da olumsuz yönde etki ettiği bilim çevrelerinde geniş kabul görmüş bir öngörüdür. Bu durumun birkaç örneği şu biçimde sıralanabilir.

1. Probiyotik bakteriler karaciğerde makrofajların sayısını arttırarak ve intestinal mukozada patojenlerin tutunumunu azaltarak bağışıklık sistemini onarırlar (Jayachandran vd., 2017).

2. Probiyotik bakteriler bağırsakta bazı vitaminlerin (B ve K) sentezini gerçekleştirir. Dengeli ve sağlıklı beslenen insanların bağırsak mikrobiyotası bu vitaminleri düzenli olarak sentezlemekte ve hastalıklara yakalanma riskinin azaldığını göstermektedir (Jayachandran vd., 2017).

3. Konukçu, intestinal epitelyum hücrelerinde besleyici etkinin arttırılması ve vitaminlerin sentezi intestinal mikrobiyotanın yardımı ile gerçekleşmektedir (Ezeonu vd., 2012).

4. Bifidobakteriler ve laktobasiller kolon pH'sını düşüren kısa zincirli yağ asitleri (SCFA) üretirler. Bu bakteriyel metabolitler kolayca absorbe edilirler ve bağırsak mukozası, karaciğer, kaslar ve beyin dokuları için bir enerji kaynağı olarak kullanılırlar (Tuohy vd., 2002).

5. Birçok probiyotik suşu mide ve kolon kanserinde kanser hücrelerinin çoğalarak yayılmasını önlemektedir. Çoğu araştırmacı bu önlemenin kısa zincirli yağ asitlerine bağlı olduğunu söylemektedir. Kısa zincirli yağ asitleri tümör nekrozis faktörünü azaltmaktadır. *Lactobacillus rhamnosus'*un sıçanlara 25 hafta verilmesi sonucunda tümör etkisini, apoptozisi, iltihaplı sitokinleri ve anjiyogenik faktörlerin seviyesini azalttığı tespit edilmiştir. *Lactobacillus plantarum* ile yapılan 12 haftalık diyet uygulaması sonucunda ise tümör etkisinin azaldığı, siklooksijenaz protein ifadesinin ve total siyalik asit seviyesinin düştüğü görülmüştür. *Lactobacillus plantarum* ile yapılan *in vitro* bir çalışmada ise bu bakterinin Caco-2 ve HT-29 diye adlandırılan kanser hücrelerinin 48. saatte önemli ölçüde çoğalmalarını önlediği belirlenmiştir. Probiyotiklerin göğüs kanseri, karaciğer kanseri, melanom (cilt tümörü) ve lösemi (kan kanseri) gibi bir çok kanser üzerinde tümör hücrelerinin çoğalmasını önleyici etkisi olduğu görülmüştür. Vücutta antitümör aktiviteden, bağışıklık sistemindeki doğal katil hücreler, dentritik (dallantılı) hücreler, makrofajlar ve T-lenfositler sorumludur. Probiyotikler bağışıklık sistemindeki bu hücreleri düzenlemektedirler (So vd., 2016).

6. Bağırsak mikrobiyotası diyabette (şeker hastalığı) anahtar rolü oynamaktadır. Tip 2 diyabet obezite ile ilişkilidir. Tip 1 diyabet ise insülin üretim yetersizliğinden kaynaklanmaktadır. Bilimsel kanıtlar göstermiştir ki obez olmayan diyabet farelerde doğuştan olan mikrobiyal tanıyıcı bağışıklık sistemi reseptörü olan MyD88 tip 1

diyabetlere dirençlidir. Eğer MyD88 farelerde normal bağırsak florasında tükenirse yararlı bakteri florası (Schaedler flora) kolonizasyonu gerçekleşir ve diyabet azalmış olur. Bağırsak mikrobiyotasına ait kısa zincirli yağ asitleri, safra asidi ve biyoaktif lipitler insülin hormonu sekresyonunun düzenlenmesine katkıda bulunur (Holmes vd., 2011). Probiyotikler arttıkça üretilen organik yağ asidi sentezi de artar. Bu kısa zincirli yağ asitlerinden propiyonik asit, hepatik yağ asidi sentezini inhibe ederek LDL kolesterol (kötü kolesterol) ve trigliserit düzeylerini düşürür. HDL kolesterolü (iyi kolesterol) ise arttırır. Laktobasiller laktik asit (2-hidroksipropanoik asit), Bifidobakteriler ise asetik asit ve laktik asit üretir (Sadeghi vd., 2011).

7. Mikrobiyotanın obezite ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bağırsak mikrobiyotası ile ilişkisi şunları içermektedir; bağırsak geçirgenliği, yağ dokunun vücuttaki miktarı ve vücut ağırlığı. Fazla yağlı besinlerin tüketimi total bağırsak mikrobiyatısının azalmasına ve Gram negatif bakterilerin artmasına neden olmaktadır. Bu bakterilerin dış zarından sentezlenen ve endotoksin özellikte olan lipopolisakkarit (LPS) yağlanmayı arttrır, insülin direncini etkiler ve bağışıklık sistemini baskılar (Holmes vd., 2011). Obezlerde egzersiz yapmanın mikrobiyota üzerindeki etkisi ile ilgili bir çalışmada, düzenli egzersiz yapan kişilerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anti-obezite bakterisi olan *Akkermansia muciniphila* yoğunluğunun daha fazla olduğu gözlenmiştir (Clarke vd., 2015).

8. Mikrobiyota kalp ve damar hastalıkları ile ilişkilidir. Antibiyotik kullanımı ile hayvansal yağların sindirimi sırasında yan ürün olarak meydana gelen ve damar tıkanıklığına neden olan trimetilamin N_oksit (TMAO) maddesinin kan plazmasında azaldığı görülmüştür (Shreiner vd., 2015). Bir başka çalışmada ise kırmızı et yiyen kişilerin vegan beslenenlere göre diyet sonunda TMAO seviyesinin artarak fosfotidilkolinin mikrobiyota tarafından metabolize olmasına neden olmuştur (Shreiner vd., 2015). Fosfotidilkolin kolesterol taşınımını azaltarak makrofaj köpük hücre oluşumu dolayısıyla ateromun (atardamarda makrofaj birikmesi) köpük hücrelerinde kolesterol birikimine neden olmaktadır (Varım vd., 2017).

9. Mikrobiyota sinirsel bağırsak sendromu hastalığında rol oynamaktadır. Bağırsaktaki değişiklikler merkezi sinir sisteminde semptom algısına bağlı bir mikrobiyota-bağırsak-beyin ekseni boyuncadır. Mikrobiyotanın merkezi sinir sistemine etkisi mikrobiyal içerik değişiklikleri, bakteriyel metabolitler, nöral yollar, immun uyarılma ve bağırsak hormonal cevabıdır. Bir çalışmada Avustralyalı hastalar üzerinde mayalanabilir oligosakkaritler, disakkaritler, monosakkaritler ile yapılan diyet uygulamasının bu sendromu ve bütirat üreten *Clostridium* spp. kümelenmesini azalttığı görülmüştür. Birçok *Clostridium* türünün nörotoksin ürettiği bilinmektedir. Safra asidi çeşitli nörolojik farklılıklar göstermektedir. Örneğin glikokolat, glikodeoksikolat ve glikokenodeoksikolat Alzheimer hastalarında plazma profillerinde değişiklik göstermiştir (Holmes vd., 2011).

10. Son zamanlarda yapılan ilginç bir çalışma, probiyotikler bakımından zengin fermente süt ürününün alınmasının fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme ile ölçülen görsel duygusal uyarıcılara yanıt olarak beyin aktivitesinde değişikliklere neden olduğunu göstermiştir (Shreiner vd., 2015).

11. Kısa zincirli yağ asitlerinin ayrışmamış formları yağda çözünür. Hem pasif hem de taşıyıcı aracılı aktarım sistemiyle rahatlıkla bakteri hücresine girerler. Asit hücreye girdiğinde alkali ortamda proton (H+) salar ve bu şekilde hücre içi pH'yı düşürmüş olur. Bu durumda bazı önemli mikrobiyal enzimlerin faaliyetleri engellenir, mikrobiyal metabolizma etkilenir. Bakteri hücresi bu fazla protonları dışarı atmak için enerji kullanmaya çalışır. Ancak beslenme yetersizliği nedeniyle ölür. Bu protonlar bakterinin aside duyarlı proteinlerini ve DNA'sını denatüre eder. Laktik asit bakterileri, sahip oldukları yüksek konsantrasyondaki hücre içi potasyum ile asit anyonları etkisiz hale getirir (Evrensel vd. 2009).

12. Mikrobiyotanın probiyotik, prebiyotik ve simbiyotikler ile terapisi mümkündür. Bir çalışmada *Lactobacillus paracasei* ve *Lactobacillus rhamnosus* galaktooligosakkarit prebiyotikleri ile birlikte germ-free farelerin bağırsak florasına inoküle edilmiştir. Burada *Bifidobacterium longum* ve *Bifidobacterium breve* populasyonunda artış, *Clostridium perfringens* populasyonunda ise azalış görülmüştür (Kinross vd., 2011). Probiyotik içerikli içeceklerin bilişsel yetenekler üzerine yararlı etkileri olduğu ve hem

Alzheimer hastalığı hem de multipl skleroz üzerine olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir (Hoyles vd., 2018). Mikrobiyal etki konakçı metanolik yolu lipit profilin değişmesi, glukoneojenezde ve amino asit ve metilamin metabolizmasında ve farklı bakteri suşlarında karbonhidratların fermentasyonu ile ilişkilidir. Bu nedenle insan bağırsak mikrobiyotasının metabolik hastalıklara karşı tedavi anlamında büyük bir katkısı olduğu düşünülmektedir (Kinross vd., 2011).

Mikrobiyotadaki mikrobiyal disbiyozis (faydalı bakterilerin azalıp zararlı bakterilerin artması) burada patojenlerin artmasına sebep olmakta ve hastalık oluşumuna yol açmaktadır. Kötü beslenme ve antibiyotik gibi olumsuz faktörler mikrobiyotada değişime yol açmakta ve bağırsak hastalıkları, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, nöropsikolojik bozukluklar, obezite, diyabet, lupus, multiple skleroz, çölyak hastalığı, alerji ve Parkinson hastalığı gibi hastalıklar ortaya çıkmaktadır (Shreiner vd., 2015; Varım vd., 2017). Altuntaş ve Batman (2017) mikrobiyal biyoloji ve ortaya çıkan disbiyozisini şu şekilde belirtmiştir: Vitamin ve kısa zincirli yağ asidi üretilememesi; alerji, amino asit sentezi bozukluğu; enflamatuar bağırsak hastalığı, safra asidi biyotransformasyonu bozukluğu; kanser, sindirilmeyen besinlerin fermentasyonu ve hidrolizinin olamaması; obezite, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar, konjuge linoleik asit üretilememesi; lupus (eklem ağrıları), immün sistemin değişmesi; astım, amonyak üre dönüşümü aksaklığı; Multipl skleroz, detoksifikasyon gerçekleşememesi; çölyak (glutenli yiyeceklerin emilememesi).

İnflamatuar bağırsak hastalıkları da bağırsak mikrobiyotasındaki değişiklikler ile ilişkilidir. Bir çalışmada 447 Crohn hastasından rektal örnekler alınıp mikrobiyomunun 16S dizi analizi yapılarak mikrobiyal taksonları tanımlamıştır. Burada *Enterobacteriaceae, Pasteurellaceae, Fusobacteriaceae, Neisseriaceae, Veillonellaceae ve Gemellaceae* arttığı ve *Bifidobacteriaceae, Erysipelotrichaceae, Clostridiales* ve *Bacteroidales* azaldığı görülmüştür (Shreiner vd., 2015).

Literatürde, probiyotiklerin balık ve kanatlı hayvanlar gibi diğer konak canlılara etkisini irdeleyen çalışmalar da göze çarpmaktadır. Bu bakış açısı ile probiyotiklerden sucul canlıların üretiminde (akvakültür) yararlanılmaktadır. *Lactobacillus delbruecki, Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus helveticus* su ürünlerinin performansının arttırılmasında büyük bir katkı sağlar (Fyzul vd., 2014). *Lactobacillus acidophilus* tatlısu nil çipurasının gelişimini arttırmada, immun sisteminde nötrofil adhezyonunun sağlanmasında, lizozim enziminin arttırılmasında ve *P. fluorescens* ve *S. iniae*'ye karşı direnç kazanmasında yarar sağlar. Gökkuşağı alabalığının 51 gün boyunca 10^9 CFU g^{-1} dozunda *Lactobacillus rhamnosus* ile beslendiğinde vücudunda *A. salmonicida*'nın %19-53 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Dahası bu doz 10^{12} CFU g^{-1} e çıkarıldığında daha fazla koruma sağlamıştır. Aynı zamanda *Lactobacillus rhamnosus* tatlısu nil çipurasında da enfeksiyona karşı mücadele etmektedir. *Lactobacillus fructivorans ve Lactobacillus plantarum*'u kullanmak deniz mercan balıklarında ölüm oranını azaltmıştır. Ayrıca *Lactobacillus plantarum* ile 30 gün boyunca 10^7 CFU g^{-1} dozunda beslenen gökkuşağı alabalıklarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *Lactococcus garvieae*'ye karşı direncin daha fazla olduğu görülmüştür (Fyzul vd., 2014).

Lactobacillus plantarum, Lactobacillus salivaris ve Lactobacillus rhamnosus karışımı aynı anda balıklara verildiğinde larvalarda hayatta kalma oranını arttırdığı tespit edilmiştir. *Lactobacillus*'ların ticari olarak hazırlanmışları Artemia ve rotiferler gibi canlıların beslenmesine katkı sağlar. Ayrıca *S. aurata*' nın (çipura) larvalarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yaşama oranının ve sindirim enzimleri miktarının arttığı görülmüştür. *Lactobacillus* sp. kullanımı incili istiridye olan *P. mazatlanica*'nın gelişimini ve hayatta kalma oranını arttırmıştır (Fyzul vd., 2014).

Giannenas vd. (2010) *Agaricus bisporus*'un hindilerin bağırsak mikrobiyotası ve morfolojisi üzerine etkisini araştırmıştır. Üç farklı dozda (0, 10, 20 g/kg) gerçekleştirilen 9 günlük diyet uygulaması sonucunda ince ve kalın bağırsakta total aerob, total anaerob, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *E. coli*, *Bacteroides* spp. ve *Enterococcus* spp. sayımı yapılmıştır. Ayrıca bağırsağın morfolojik incelemeleri yapılmıştır. Ancak morfolojik incelemeler sonucunda makrofungus takviyesinin önemli bir etkisi olduğu saptanmamıştır. İnce bağırsakta 20 g/kg dozda gerçekleştirilen diyet uygulamasında *Lactobacillus* spp. üremesinde kontrol grubuna göre artış olduğu belirlenmiştir. Diğer

bakteri gruplarında her üç dozda da benzer sonuçlar görülmüştür. Kalın bağırsakta ise *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. de kontrol grubuna göre üreme artışı olduğu saptanmıştır.

Toghyani vd. (2012) *Pleurotus ostreatus*'un 42 günlük diyet yapılması sonucunda piliçlerde büyüme performansı, humoral bağışıklık ve kan parametreleri üzerine etkisini araştırmışlardır. Vücut ağırlığında istatistiki bir fark bulamamıştır. Aynı şekilde yemden yararlanma açısından da istatistiki bir fark tespit edilememiştir. Kan parametrelerinde albumin, globulin, total kolesterol, akyuvar, alyuvar, HDL, LDL oranları ölçülmüş ve bu değerlerde anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

Evrensel (2009) tarafından broyler rasyonlarında organik asit ve prebiyotik kullanılmasının besi performansı ve bazı kan parametreleri üzerine etkisini araştırılmıştır. Araştırma sonunda canlı ağırlık, yem tüketimi, yemden yararlanma oranı, ince bağırsak uzunluğu, ağırlığı ve pH'sı, karkas randımanı, organ ağırlıkları ile incelenen kan parametrelerinin istatistik önem taşıyacak düzeyde etkilenmediği saptanmıştır.

2.3. Prebiyotik besin maddeleri

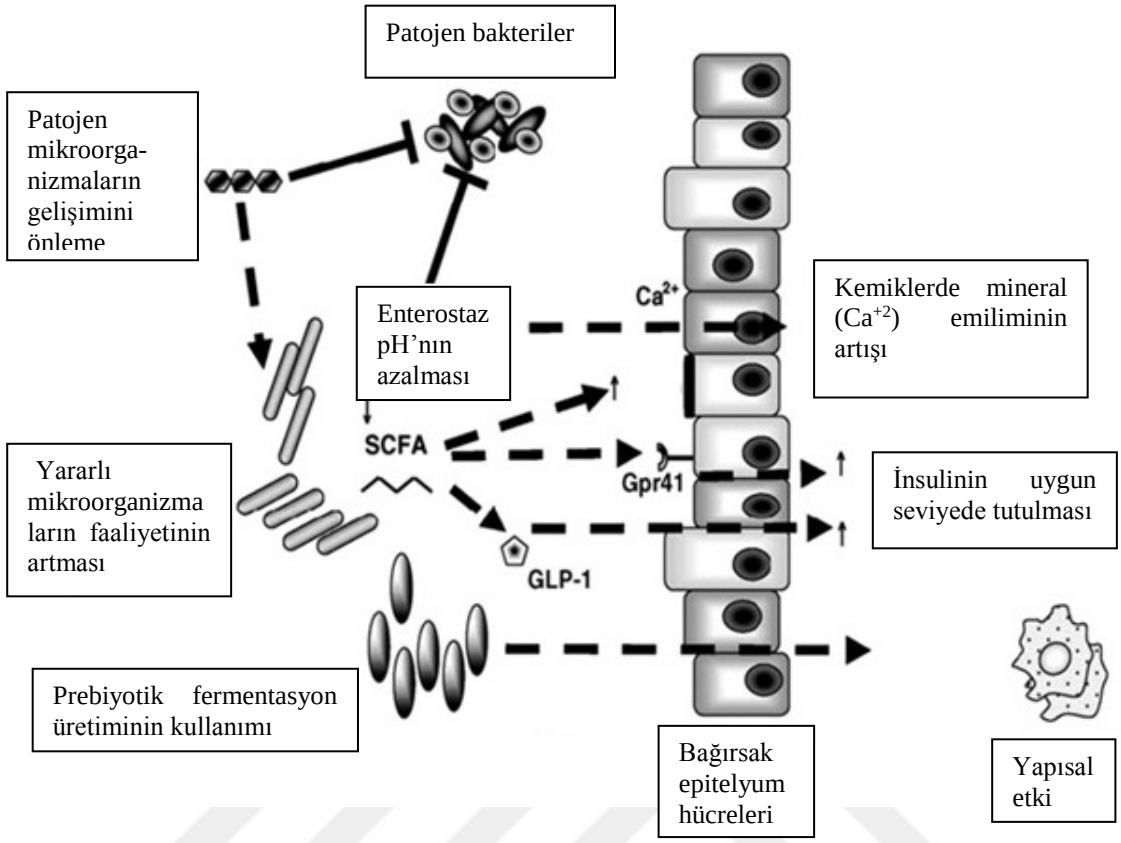
"Prebiyotik" besin maddeleri insan sindirim kanalını sindirilmeden geçerek sadece bağırsakta bulunan probiyotik bakterilerin seçici olarak artırılmasını sağlayan polisakkaritlerdir (Ferrao vd., 2017). Prebiyotikler, laktik asit ve asetik asit gibi organik asitleri üreten bakterileri ve sindirim sisteminde pH' nın düşmesine neden olan kısa zincirli yağ asitlerini artırırlar.

Prebiyotiklerin konukçu için yararlı etkinlikleri arasında;

a. Yararlı bakterilerin gelişimini destekleyip patojenik bakterilerin gelişimini engelleme,
b. Glukoz absorpsiyonunu yavaşlatma ve insulini düşürerek kan şekeri direncini geliştirme,
c. Kısa zincirli yağ asitlerinin (short chain fatty acids (SCFA)) arttırma,
d. Yağ profilini geliştirme, koroner kalp hastalığı riskini düşüren HDL kolesterolü arttırma, LDL kolesterol ve trigliseridi düşürme,
e. İntestinal duvarda iltihaplanmayı ve sızıntılı bağırsak sendromunu önleme,

f. Enfeksiyonlardan koruyarak bağışıklık sistemini düzene sokma ve alerji, egzama, astım ve ciddi otoimmün hastalıklardan korunmaya yardımcı olma,
g. Gastrointestinal bölgenin mukozal alanına yararlı olan ve besin sağlayan propiyonat ve bütirat gibi kısa zincirli yağ asitlerindeki çözünebilir liflerin intestinal fermentasyonunu uyarma,
h. Kalsiyum ve diğer minerallerin emilimini arttırma,
i. Kolon pH'sını düşürme,
j. Kolorektal kanser riskinin azaltma,
k. İltihaplı bağırsak düzensizliği ve intestinal düzensizlikte olumlu etkilere sahip olma, gibi özellikleri sayılabilir (Evrensel, 2009; Bhakta ve Kumar, 2013; Singdevsachan vd., 2016).

Şekil 2.2 prebiyotiklerin konak bağırsağındaki yararlı etkinliklerinden bir kısmını vurgulamaktadır.



Şekil 2.2. Prebiyotiklerin konak canlı bağırsağındaki bazı etkileri (Singdevsachan vd., 2016)

Prebiyotikler, mide asiditesine karşı direnç, gastrointestinal absorpsiyon ve gastrointestinal alandaki yararlı bakterilerin gelişiminin seçici olarak arttırılması gibi kriterlere sahiptir. Prebiyotik özellik taşıyan belli başlı bileşikler; inulin, fruktooligosakkarit (FOS), ksiloz (XOS), laktuloz, galaktooligosakkarit (GOS), polidekstroz (PDX) ile örneklenebilir (Sousa vd., 2011). İnulin, frukto-oligosakkarit, galakto-oligosakkarit, laktuloz, polidekstroz gibi diğer prebiyotikler marketlerde bulunabilir. İzomalto-oligosakkarit, ksilo- oligosakkarit ve laktilol gibi prebiyotikler ise yeni geliştirilen prebiyotik çeşitleridir (Bhakta ve Kumar, 2013).

Günümüze kadar geleneksel ve yeni besin maddelerinin prebiyotik aktivitesinin belirlenmesine yönelik çok sayıda *in vivo* araştırma gerçekleştirilmiştir.

Liu vd. (2014) 6 hafta boyunca badem ile beslenen kişilerin fekal örneklerini incelemiş ve bir prebiyotik olan fruktooligosakkarit (fos) ile beslenen insanların fekal örnekleri ile kıyasladığında badem ile beslenenlerin yararlı bakteri populasyonunda daha çok artış olduğunu belirlemişlerdir. Araştırıcılar badem ile beslenenlerin fekal örneklerinde fos ile beslenenlerinkine göre *Bifidobacterium* spp. ve *Lactobacillus* spp. populasyonunda daha fazla artış olduğunu ve bir patojen olan *Clostridium perfringens*'in bu yararlı bakterilerce baskılandığını tespit etmişlerdir.

Yousaf (2007) muz suyunun sıçanların bağırsak sistemine *in vivo* prebiyotik etkisini araştırmıştır. Muz suyu ile 8 hafta boyunca beslenen sıçanların inulin ve oligofruktoz ile beslenen sıçanlara göre bağırsak sisteminde *Lactobacillus* spp. ve *Bifidobacterium* spp. populasyonunda daha fazla artış olduğunu belirlemiştir. Ayrıca muz suyu ile beslenen bu sıçanların bağırsaklarında kısa zincirli yağ asidi oranında bir artış meydana geldiğini ve kanlarında LDL seviyesinin azaldığını tespit etmiştir.

Ezeonu vd. (2012) kurutulmuş fesleğen yapraklarının tavşanların bağırsak sistemine *in vivo* prebiyotik etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada 8 hafta boyunca tavşanlara her gün 0,1 g/gün dozunda kurutulmuş yaprak vermiş ve bağırsak florasında *Corynebacterium, Enterococcus, Bacteroides, Lactobacillus* ve *Actinomyces* türlerinin gelişimi incelenmiştir. *Enterococcus* ve *Actinomyces* populasyonlarında artış, *Bacteroides* populasyonunda ise azalış olduğu tespit edilmiştir. *E. coli* ve *Staphylacoccus aureus* kolonizasyonunda ise düşüş meydana geldiği belirlenmiştir. Böylece yaprakların prebiyotik etkiye sahip olduğu söylenmiştir.

Pandiyan vd. (2012) dondurmaya bal, fruktooligosakkarit, inulin ve *Lactobacillus* acidophilus'tan oluşan sinbiyotik eklemişler ve bu karışımdan 21 gün boyunca takviye alan insanların fekal örneklerini mikrobiyolojik olarak incelemişlerdir. Deney sonunda sinbiyotik içeren dondurmayla beslenen kişilerin kontrol grubuna göre bağırsak florasında *Lactobacillus acidophilus* miktarının arttığını ve pH değerinin düştüğünü tespit etmişlerdir.

Çizelge 2.1'de bazı farklı tip prebiyotikler ve elde edildikleri besin kaynakları gösterilmiştir.

Çizelge. 2.1. Çeşitli prebiyotik tipleri ve kaynakları

Prebiyotik tipi	Prebiyotik kaynağı	Referans
Fruktooligosakkarit	Kuşkonmaz, bal, muz, domates	Al-Sheraji vd., 2013
İzomaltuloz	Şeker kamışı, bal, meyve suyu	
Ksilooligosakkarit	Süt, bambu, buğday kepeği, sebzeler	
Galaktooligosakkarit	İnsan sütü, inek sütü	
Siklodekstrin	Suda çözünen glukanlar	
Raffinoz oligosakkarit	Baklagil tohumları, bezelye, mercimek	
Soya oligosakkariti	Soya	
Laktuloz	Laktoz (süt)	
Laktosukroz	Laktoz	
İzomaltuloz	Sükroz	
Palatinoz	Sükroz	
Maltooligosakkarit (MOS)	Nişasta	
İzomaltooligosakkarit	Nişasta	
Arabinoksilooligosakkarit	Buğday kepeği	
Enzim-resistan dekstrin	Patates nişastası	
İnulin	Pırasa, soğan, sarımsak, hindiba, enginar, yerelması, arpa, muz, çavdar	Singh ve Singh, 2010

En bilinen prebiyotiklerden inulin, d-fruktozdan elde edilmiş 2-1 β-glikozidik bağlı polimer bir bileşiktir. Farklı yaşlarda yapılan çalışmalarda inulinin prebiyotik kaynağı olarak güvenli bir sonuç verdiği tespit edilmiştir (Sousa vd., 2011).

İnulin çeşitli bitkilerde bulunan bir karbonhidrat kaynağıdır. Avrupa'da bireyler günde ortalama 2-12 g arasında inulin tüketmektedir. Örneğin bu oran Belçika'da günde ortalama 5-8 g, İspanya'da 7-12 g civarındadır (Sousa vd., 2011).

2.4. Makrofungusların prebiyotik olarak önemi

Makrofunguslar düşük kalori, sodyum, yağ ve kolesterol içeriğine sahiptirler. Ayrıca yüksek oranda protein, lif, vitamin ve mineral içerirler. Örneğin bazı makrofungusların protein ve yağ içerikleri sırasıyla şu şekilde tespit edilmiştir; *Agaricus*

bisporus (beyaz) % 2,09, % 0,33; *Agaricus bisporus* (kestane) % 2,07, % 0,31; *Pleurotus ostreatus* %1,97, % 0,35 (Rosello-soto vd., 2015). Makrofunguslar B grubu vitaminleri (B1, B2, B6, pentotenik asit) , C vitamini ve yağda çözünen A ve K vitaminlerini içerir. Örneğin *Cantharellus cibarius* bazidiokarpları A, B, C D ve E vitaminleri açısından da zengindir. *A. bisporus* ve *B. edulis* türleri yüksek oranda D2 vitamini içermektedir (Bederska-Lojewska vd., 2017). Ayrıca antioksidan içerikleri, fenolik bileşenler, tokoferoller, karotenoidler ve antibiyotik bileşenlerinden dolayı sağlığı arttırıcı yararlı etkilere sahiptir (Toghyani vd., 2012). Bu besin özellikleri makrofungusların, dengeli bir besin formülasyonuna sahip olmasından dolayı çok iyi bir diyet gıdası ve özellikle vegan/vejeteryanlar için ideal bir besin kaynağı olduklarını gösterir (Aida vd., 2009).

Makrofungus kökenli polisakkaritlerin antitumor, immunomodülatör, antidiyabetik, hipokolesterolemik, antioksidan, antimikrobiyal ve prebiyotik aktivitelerine ilişkin çok sayıda araştırma göze çarpmaktadır (Bederska-Lojewska vd., 2017).

Makrofungus polisakkaritleri içerdiği kitin, hemiselüloz, pektinaz, alfa-b-glukan, mannan, ksilan ve galaktoz ile potansiyel bir prebiyotik kaynağıdır. Makrofungusların prebiyotik aktivitesinden β-glukanlar, homoglukanlar ve heteroglukanlar ile β(1→3), β(1→4) ve β(1→6) glukozidik bağları sorumludur (Chou vd., 2013). Glikozidik bağlar sindirim enzimleri tarafından hidrolize edilemez. β-glukanların immun fonksiyonunu makrofajları aktive ederek artırdığı ve ağızdan alındığında bağırsakların peyer plaklarındaki makrofajları aktive ederek farelerin sindirim sisteminde dolaylı olarak immuniteyi uyardıkları bildirilmiştir (Hozova vd., 2004; Evrensel vd., 2009). Polisakkaritler ayrıca kalın bağırsakta probiyotik bakterilerin gelişimini arttırarak viral enfeksiyonları da önler. (Oyetayo vd., 2005; Mohd Din vd., 2012; Cheung vd., 2013).

Farklı mantar türleri farklı polisakkarit üretebilmek için farklı aktivitelere sahiptir. Örneğin *Agaricus bisporus*'un polisakkaritleri heteropolisakkarit yapıdadır ve musilajdan oluşmuş glukoz ve galaktozdan meydana gelmiştir. Makrofajları aktive edici etkisi vardır. *Ganoderma lucidum*'un da polisakkaritleri heteropolisakkarit yapıdadır ve β-(1→3)-bağlı D-glukandan oluşmuştur. Programlı hücre ölümüne (apoptosiz) neden olmaktadır. *Pleurotus ostreatus* homopolisakkarit yapıdaki polisakkaritlere sahiptir ve β-

(1→3),(1→6)-D-polisakkarit yapısındadırlar. Bu polisakkaritler ise gastrointestinal hareketliliği arttırırlar (Bhakta ve Kumar, 2013).

Çeşitli makrofungus türlerinden elde edilen prebiyotik aktiviteye sahip metabolitler ve bu metabolitlerin konukçu açısından olumlu etkileri çizelge 2.2'de özetlenmiştir.

Çizelge. 2.2. Bazı makrofungus polisakkaritleri ve önemi (Bhakta ve Kumar, 2013)

Makrofungus türü	**Prebiyotikler**	**Önemi**
Agaricus bisporus	Glikoz ve galaktozun musilaj bileşimi	Makrofaj aktivasyonu
Agaricus bitorquis	β-(1→3)-bağlı glukan	Natural killer hücre aktivasyonu
Agaricus blazei	α, β-glukan	T- lenfositlerinin aktivasyonu
Armillaria mellea	(1/6)-bağlı-a-d-galaktopiranosil, (1/6)-linked-a-d-glukopiranosil	Probiyotiklerin aktivasyonu
Auricularia auricula-judae	(1→6) dallanmış β-(1→3)-D-glukan	Antiviral aktivitesi
Boletus edulis	Kitin	Probiyotiklerin aktivasyonu
Boletus erythropus	O-6 dallanmış (1→3)-bağlı glukoz	Antimikrobiyal aktivitesi
Calocybe indica	α-β-(1→4),(1→6)-glukan	Yağ oluşumu genlerini azaltarak düzenleme
Ganoderma lucidum	β-(1→3)-bağlı D-glukan	Apoptozisi tetikleme
Geastrum saccatum	β-bağlı glukan	Mide kanseri tedavisi
Grifola frondosa	Grifiloyan	Antitümör aktivite
Lentinula edodes	Lentinan	Antitümör aktivite
Phellinus linteus	β-(1→3)-bağlı D-glukan	İnterlökin üretimini arttırma
Pleurotus eryngii	α-(1→3)-bağlı D-glukan	Antiproliferatif etki
Pleurotus florida	O-3 dallanmış α-(1→3)-D-glukan ve O-6 dallanmış β-D-glukoz, β-(1→3),(1→6)-D-glukan	Hücreye bağlanan tümörle ilgili hücreleri engellemek
Pleurotus ostreatus	(1→3),(1→6)-D-polisakkarit, (1→3),(1→6)-D- polisakkarit	Bağırsak hareketliliğini arttırma
Schizophyllum commune	Şizofilan	Antitumor aktivite
Sparassis crispa	β-(1→3)-D-glukan	Lipid peroksidaz inhibisyonu
Termitomyces eurhizus	β-(1→3)-D-glukan	Yaşlanma karşıtı etki
Termitomyces microcapus	β-D-glukan	Karaciğer koruyucu aktivite
Trametes versicolor biyomasının kültüre edilmiş miseli	Krestin	Probiyotiklerin aktivasyonu

Makrofungus polisakkaritlerinin prebiyotik aktiviteleri ile ilgili olarak günümüze kadar yapılan bazı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Hozova vd. (2004) yapmış olduğu bir çalışmada *Pleurotus ostreatus* ve *Lentinula edodes*'ten elde edilen polisakkaritleri (pleuran ve lentinan) yoğurda ekleyerek 30 gün boyunca 5 ˚C'de saklamıştır. Değişik zaman aralıklarında (1., 15. ve 30. günler) yapılan örneklemelerde yoğurtta yararlı bakterilerin fermentasyon kapasitesinin arttığı tespit edilmiştir. Saklama süresi boyunca koliform bakteri, maya ve küf görülmemiştir (< 1 cfu/g). Yoğurtta pH değerleri ve duyusal özellikler de normal seviyede bulunmuştur. Böylece pleuran ve lentinan'ın yoğurt kalitesini arttırdığı ve zararlı mikroorganizmaların üremesini engellediği belirlenmiştir.

Pleurotus sajor-caju ve *Lactobacillus fermentum* OVL bileşimi diyet takviyesi ile ratların gelişimine *in vivo* etkisi Oyetayo ve Oyetayo (2005) tarafından araştırılmıştır. Günlük ağırlık artışı, yemden yararlanma oranı ve protein yeterlilik oranında kontrol grubuna göre daha iyi sonuç elde edilmiştir. Rat dışkılarındaki *Lactobacillus* sayısında ise istatistiksel olarak anlamlı derecede artış gözlenmiştir.

Pleurotus ostreatus β-glukan fraksiyonları ile 9 probiyotik suşunda *in vitro* olarak çalışılmış ve probiyotiklerin seçici olarak arttığı gözlenmiştir (Synytsya vd., 2009).

*Pleurotus ostreatus'*un kanda biyokimyasal parametrelere etkisi de araştırılmıştır. Khatun vd. (2007) tarafından yapılan bu çalışmada *P. ostreatus* mantarı ile yapılan prebiyotik takviyesinde kanda kolesterol seviyesi düşük bulunmuştur.

Nevel vd. (2010) *Lentinula edodes* β-1,3 ve β-1,6 glukanlarının domuzların bağırsaklarında bakteriyolojik, morfolojik ve biyokimyasal etkisini araştırmışlardır. Bir kontrol grubu, bir pozitif kontrol ve 2 deney grubuna 4 hafta boyunca deneme yapmışlardır. Pozitif kontrol grubuna avilamisin (50 mg/kg), bir deney grubuna %0,1 lentinan, diğer bir deney grubuna %5 kurutulmuş *L. edodes* miseli verilmiştir. İlk grup 11 gün sonunda sakrifiye edilmiştir. Mide, ince bağırsak ve kalın bağırsaktan örnekler alınmıştır. Bakteri sayımı dışkı ve mukozal örnekler ile yapılmıştır. Toplam bakteri, *E. coli*, laktik asit bakterileri ve *Streptococcus* spp. sayımı yapılmıştır. Ayrıca laktik asit oranı

da tespit edilmiştir. Histolojik parametre olarak goblet hücresi sayımı yapılmıştır. Bakteriyel sayım sonucu *L. edodes* miseli ile beslenen grupta tüm bakteri gruplarında azalma görülmüştür. Avilamisin ve lentinan takviyesi alan gruplarda bakteri populasyonunda kayda değer bir değişme gözlenmemiştir. Goblet hücre miktarında ise 4 grupta da farklılık görülmemiştir.

Chou vd. (2013) *Lentinula edodes*, *Flammulina velutipes* ve *Pleurotus eryngii* türü mantarlardan polisakkarit ekstraksiyonu yapmışlardır. Elde edilen polisakkaritler *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* bakteri türleri ile birlikte yoğurdun içine eklenerek bakterilerin canlı kalma oranı hesaplanmıştır. Probiyotik bakteri populasyonu 10^7 cfu/g'a ulaşarak polisakkaritler tarafından stimule edilmiştir. Ayrıca yoğurtta zararlı bakteri üremesine karşı koruyucu etki yaratmıştır.

Pallav vd. (2014) insan mikrobiyotası üzerinde patojenlere karşı *Trametes versicolor*'dan ekstrakte edilmiş polisakkaritler ile antibiyotiklerin etkisini karşılaştırmışlardır. *Trametes versicolor* polisakkaridi yararlı bakteri sayısını 42. gün sonunda arttırarak patojen bakteri sayısını baskılamıştır. Böylece zararlı bakterilere karşı antibiyotikler kadar etki etmiştir. Bu nedenle *Trametes versicolor* polisakkaritlerinin prebiyotik olarak etkin bir rol oynadığı düşünülmüştür.

Boletus edulis'in kuru materyalinde 68-102 mg/g civarında kitin olduğu bildirilmiştir. Kitin mantarların hücre duvarında bulunan ve sindirilemeyen bir polisakkarit olup bağırsak bakteri florası için bir lif kaynağıdır. Probiyotiklerce sindirilmesi nedeni ile kitinin bir prebiyotik kaynağı olduğu vurgulanmaktadır (Aida vd., 2009).

*Ganoderma lucidum'*dan izole edilen, ganoderan ve ganopoli olarak bilinen polisakkaritler β_d glukan içermektedir. Bu polisakkaritler bağırsaklarda probiyotiklerce prebiyotik kaynağı olarak kullanılmaktadır. Prebiyotik etki nedeni ile immun sistemin arttırılması, antitümör etki, kanser hücrelerinin apoptozisi ve antimetastazik etki ile vücutta hastalıklara karşı koruyucu etki yaratmaktadır (Villares vd., 2012).

Eldeki veriler ışığında şimdiye kadar *Lentinula edodes, Flammulina velutipes, Pleurotus eryngii, Trametes versicolor, Ganoderma lucidum, Pleurotus ostreatus, Agaricus bisporus, Pleurotus sajor-caju, Boletus edulis* makrofungus türlerinin prebiyotik aktivitesinin araştırıldığı görülmektedir. Bu çalışmada ise *Agaricus bisporus, Boletus edulis, Ganoderma lucidum, Pleurotus ostreatus, Trametes versicolor* suşlarının yanı sıra, literatürde prebiyotik aktivitesine ilişkin bir veri bulunmayan *Agaricus bisporus* (kestane formu) ve *Cantharellus cibarius* türlerinin aktivitesi *in vitro* ve *in vivo* koşullarda sorgulanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Makrofungus polisakkaritlerinin *in vitro* prebiyotik aktivitesinin araştırılması

3.1.1.1. *In vitro* prebiyotik aktivite belirlemede kullanılan bakteriler

Makrofungus polisakkaritlerinin *in vitro* prebiyotik aktivitesinin belirlenmesi amacı ile test organizması olarak iki tane probiyotik bakteri suşu (*Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus acidophilus*) kullanılmıştır. Ayrıca makrofungus polisakkaritlerinin bağırsak mikrobiotası üyelerinden *Escherichia coli* üzerine etkisi de araştırılmıştır. Kullanılan bakteri suşlarının temin edildiği kaynaklar Çizelge 3.1. de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Makrofungus polisakkaritlerinin *in vitro* etkisi araştırılan bakteriler ve kaynakları

Şus adı	**Şus no**	**Kaynak**
Lactobacillus plantarum	B 227	Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL,Amerika)
Lactobacillus acidophilus	B 4495	
Escherichia coli	ATCC 25922	American Type Culture Collection (Amerika)

3.1.1.2. *In vitro* prebiyotik aktivitesi araştırılan makrofungus türleri

Çalışmada 6 farklı makrofungus türüne ait 7 suşun bazidiokarp örnekleri temin edilmiş, bu bazidiokarplardan elde edilen fungal polisakkaritlerin *in vitro* prebiyotik etkisi araştırılmıştır. Bu türlerden *Agaricus bisporus* (beyaz form) bazidiokarpları kültür formu piyasadan temin edilerek 60 °C'de tüm nem içeriği kaybedilene dek kurutulmuştur. *Agaricus bisporus* (kestane formu), *Pleurotus ostreatus* ve *Trametes versicolor* türlerine ait kültür formundaki kuru haldeki basidiokarplar, AGROMA Gıda Tarım Hayvancılık San. Tic. Ltd. Şti. (Denizli)'den temin edilmiştir. *Boletus edulis, Cantharellus cibarius* ve *Ganoderma lucidum* türlerine ait olan doğadan toplanmış basidiokarplar ise Prof. Dr. Aysun Pekşen (Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi) tarafından sağlanmıştır.

3.1.1.3. Kullanılan besiyerleri ve çözeltiler

A. Besiyerleri

Çalışmada kullanılan besi ortamları, besiyeri içeriğinin distile suda çözüldükten sonra otoklavda 121 °C'de 15 dakika işlem görmesi ile steril edilmiştir.

MRS broth

Kazein Pepton	10,0	g
Meat ekstrakt	10,0	g
Yeast ekstrakt	4,0	g
Glukoz	20,0	g
Tween 80	1,0	g
Di potasyum hidrojen fosfat	2,0	g
Sodyum asetat	5,0	g
Di amonyum hidrojen sitrat	2,0	g
Magnezyum sülfat	0,2	g
Mangan sülfat	0,04	g
Distile su	1000	ml

MRS broth besiyeri *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus acidophilus*'un üretilmesi için kullanılmıştır.

Luria Bertani Broth

Tripton	10,0	g
Yeast ekstrakt	5,0	g
Sodyum klorür	10,0	g
Distile su	1000	ml

Luria Bertani Broth besiyeri *Escherichia coli*'nin üretilmesi için kullanılmıştır.

B. Çözeltiler

TCA

0,8 M trikloroasetik asit (TCA) distile su ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Bu çözelti protein çöktürülmesi amacı ile kullanılmıştır.

3.1.2. Seçilen makrofungus polisakkaritinin *in vivo* prebiyotik aktivitesinin araştırılması

3.1.2.1. Deney hayvanları

Çalışmanın "*in vivo* prebiyotik aktivitenin araştırılması" kısmında kullanılan deney hayvanları Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıbbi ve Cerrahi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi (TICAM)'dan temin edilmiştir. Çalışmada yaklaşık 200-250 g ve 12- 14 haftalık erkek *Wistar albino* sıçanlar kullanılmıştır.

3.1.2.2. Kullanılan besiyerleri ve çözeltiler

A. Besiyerleri

MRS agar

MRS agar, MRS broth besiyerine 20.0 g /L oranında agar ilave edilmesi ile hazırlanmıştır. *Lactobacillus* spp. gelişimi için seçici besiyeri olarak kullanılmıştır.

Bifidobacterium Agar (Himedia M1396)

Ticari hazır besiyerinden 49,3 g tartılarak 1000 ml distile suda çözülmesi yolu ile hazırlanmıştır. *Bifidobacterium* spp. sayımında seçici besiyeri olarak kullanılmıştır.

Bacteroides Bile Esculin Agar (Himedia M805)

Ticari hazır besiyerinden 61,52 g tartılarak 1000 ml distile suda çözülmesi yolu ile hazırlanmıştır. *Bacteroides* spp. sayımında seçici besiyeri olarak kullanılmıştır.

Reinforced Clostridial Agar (Merck 1.05410)

Ticari hazır besiyerinden 50 g tartılarak 1000 ml distile suda çözülmesi yolu ile hazırlanmıştır. Steril besiyerine filtrasyon ile steril edilen 8 mg/L oranında novobiosin ve kolistin sülfat eklenmiştir. *Clostridium* spp. sayımında seçici besiyeri olarak kullanılmıştır.

B. Çözeltiler

Ringer çözeltisi

Ringer çözeltisi 500 ml distile suda 1 ringer tablet çözdürülerek hazırlanmıştır. Bakteri suşları için izotonik ortam olarak kullanılmıştır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Makrofungus polisakkaritlerinin *in vitro* prebiyotik aktivitesinin araştırılması

3.2.1.1. Makrofungus polisakkarit fraksiyonlarının hazırlanması

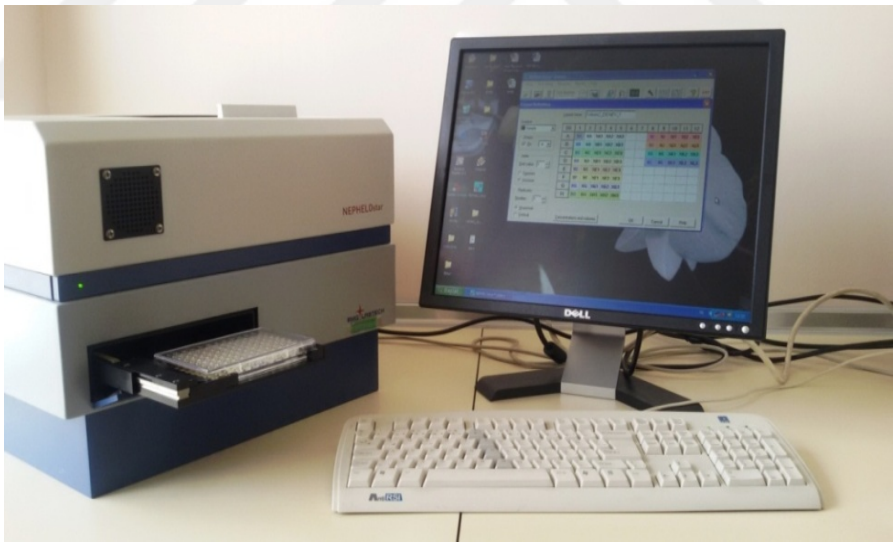
Makrofungus bazidiokarplarından polisakkarit fraksiyonunun elde edilmesi için Chou vd. (2013) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Bu amaçla ilk olarak *Agaricus bisporus* (beyaz form), *Agaricus bisporus* (kestane formu), *Boletus edulis, Cantharellus cibarius, Ganoderma lucidum, Pleurotus ostreatus, Trametes versicolor* türlerine ait kuru bazidiokarp örnekleri laboratuvar tip öğütücü ile (Ika-Werke, M 20) toz haline getirilmiştir. Öğütülen bazidiokarp, distile suya 1:10 (a/h) oranında ilave edilerek 1 saat kaynatılmıştır. Elde edilen distile su ekstraktı, içinde var olabilecek protein fraksiyonunun giderilmesi amacı ile eşit hacimde 0.8 M trikloroasetik asit ile +4˚C'de 3 saat muamele edilmiştir. Protein fraksiyonu, tüm karışımın 5000 g'de 10 dakika santrifüjlenmesi yolu ile çöktürülmüş ve ayrılmıştır. Makrofungus basidiokarplarından polisakkarit fraksiyonunun elde edilmesi için, santrifüj tüplerinde bulunan sıvı kısmı 1:4 (h/h) oranında etanol ile çöktürülmüş, elde edilen çökelti Alpha 2-4 LO Plus marka cihaz ile liyofilize edilmiştir.

Çalışmada kullanılan makrofungus bazidiokarplarından elde edilen polisakkarit fraksiyon veriminin hesaplanması için aşağıdaki formül kullanılmıştır (Chou vd., 2013).

$$\text{Verim (\%)} = (\text{Polisakkarit ağırlığı (g)} / \text{Bazidiokarp kuru ağırlığı (g)}) \times 100$$

3.2.1.2. Makrofungus polisakkaritlerinin *in vitro* prebiyotik aktivitesinin belirlenmesi

Çalışmanın deney grubu olarak makrofungus polisakkaritleri *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus acidophilus*'un üretileceği MRS broth besiyerine ve *E. coli*'nin üretileceği Luria Bertani broth besiyerine % 0,25, % 0,5, % 1,0 ve % 2,0 konsantrasyonlarda eklenerek ilgili mikroorganizma ile inoküle edilen besiyeri 37˚C'de 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Negatif ve pozitif kontrol grupları olarak ise bakteri türüne bağlı olarak değişmek üzere MRS broth ya da Luria Bertani besiyerine makrofungus polisakkaritleri yerine aynı konsantrasyonlarda eklenen glukoz ya da inulin kullanılmıştır. Deney ve kontrol gruplarında, bakterilerin başlangıçtaki sayıları McFarland 0,5 yoğunluğuna göre ayarlanmıştır. Bakterilerin üremesi nefalometrede (Nephalometre BMG Labtech, Germany; Şekil 3.1.) izlenerek inkübasyon süresi boyunca saatlik aralıklarla RNU (relative nephelometric unit) cinsinden belirlenmiştir (Finger vd., 2012).



Şekil 3.1. Nefalometre

Nefalometrik cihazın ayarladığı fonksiyon değerleri ise Çizelge 3.2'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. Nefalometrede kullanılan değişkenler ve değerleri

Değişken	**Değer**
Döngü sayısı	49
Her kuyunun ölçüm süresi (s)	1.0
Kuyu değiştirme süresi (s)	0.5
Lazer ölçüm derinliği (mm)	2
Çalkalama süresi (s)	10
Orbital çalkalama genişliği (mm)	3
Lazer yoğunluğu (%)	25

Elde edilen sonuçlar üç etmenli faktöriyel tasarıma ilişkin varyans analizi ile değerlendirilmiştir.

In vitro prebiyotik aktivitesi araştırılan 6 makrofungus türünden, diğerleri arasında *Lactobacillus* türleri için daha yüksek, *E. coli* için daha düşük RNU değerleri sunan bir örnek seçilerek *in vivo* prebiyotik etkisi araştırılmıştır.

3.2.2. Seçilen makrofungus polisakkaritinin *in vivo* prebiyotik aktivitesinin araştırılması

Seçilen makrofungus polisakkaritinin *in vivo* prebiyotik aktivitesinin araştırılmasına yönelik çalışmalar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 20.11.2015 tarih ve 488-1 numaralı kararı ve izni ile gerçekleştirilmiştir. Deneysel çalışmamızın tamamı Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıbbi ve Cerrahi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi (TICAM)'da tamamlanmıştır.

Uygulamalar süresince deney hayvanları, 12/12 saat aydınlık/karanlık uygulaması olan, ısı (22 ± 2°C) ve nemi (% 45- 50) otomatik olarak ayarlanmış odalarda yaşatılmıştır. Kontrol grubunda yer alan sıçanlar polikarbonat şeffaf kafeslerde standart sıçan pellet yemi ile beslenmiş ve su *ad libitum* olarak sunulmuştur. Deney grubunda yer alan sıçanlara farklı olarak 15 gün boyunca gavaj yolu ile *Cantharellus cibarius* polisakkaridi (CCP), pozitif kontrol grubundaki sıçanlara ise inulin verilmiştir.

Deneysel çalışma grupları şu biçimde özetlenebilir;

I. Grup (Kontrol): Standart pellet yem ile beslenen kontrol grubu

II. Grup (Deney): Standart pellet yem + günlük yem tüketiminin % 0,25'i miktarında *Cantharellus cibarius* polisakkaridi (CCP) ile beslenen deney grubu

III. Grup (Pozitif kontrol): Standart pellet yem + günlük yem tüketiminin % 0,25'i miktarında inulin ile beslenen deney grubu

Deneysel uygulamaların bitiminde, tüm gruplardaki sıçanlara intramüsküler olarak 10 mg/kg ksilazin ve 70 mg/kg ketamin anestezisi sonrasında hedef organları diseksiyonu ve kardiyak/periferal kan örneklerinin alınması sağlanmıştır.

Deneysel çalışma verileri; genel, mikrobiyolojik, biyokimyasal ve histolojik inceleme parametreleri dikkate alınarak değerlendirilmiştir.

3.2.2.1. Hayvanlara ait genel inceleme parametreleri

A. Büyüme performansı

Deney hayvanların 0, 3, 6, 9, 12 ve 15. günlerde tek tek tartımı ile tartımlar arasındaki farktan canlı ağırlık artışları belirtilen formül ile belirlenmiştir (Evrensel vd., 2009).

Kilo artışı (KA) = A_2 (son ağırlık(g)) - A_1 (ilk ağırlık (g))

Spesifik büyüme oranı Mohd Din vd. (2012) tarafından önerilen formül ile hesaplanmıştır;

Spesifik Büyüme Oranı = (($\ln A_2$ - $\ln A_1$) / t) x 100

A_1 : İlk ağırlık (g)

A_2 : Son ağırlık (g)

t : Gün

B. Yem-Su Tüketim Oranı

Araştırmanın her gününde yemliklerde kalan yem ve su miktarı, bir önceki gün her gruba verilen toplam yem ve su miktarından çıkartılarak her grubun gün içerisinde tükettiği yem ve su miktarı bulunmuştur. Bu miktar mevcut hayvan sayısına bölünerek yem ve su tüketimleri, grupların ortalamaları olarak hesaplanmıştır.

3.2.2.2. Mikrobiyolojik inceleme parametreleri

A. Barsağın ileum-çekum kısmında bakteri sayımı

Sıçanların bağırsağının ileum-çekum kısmı, 15. günün sonunda steril bistüri bıçağı ile alınarak steril petri kaplarına aktarılmıştır. Steril bir pens yardımı ile alınan örnek üzerine 1:9 (a/h) oranında olacak şekilde Ringer çözeltisi eklenip homojenize edilmiştir. Bu homojenizattan uygun dilüsyonlar hazırlanarak sayımı yapılacak her mikroorganizma için seçici besiyerleri ile dökme plaka yöntemi uygulanmıştır. Bakterilerin inkübasyonu anaerobik ortamda % 5 oranında karbondioksit verilerek gerçekleştirilmiştir.

Mikrobiyolojik inceleme parametresi olarak sayımı yapılan bakteri cinsleri ve sayım koşulları Çizelge 3.3'de sunulmuştur.

Çizelge 3.3. Sayımı yapılan bakteri cinsleri ve sayım koşulları

Bakteri cinsi	**Kullanılan dilüsyon**	**Seçici besiyeri**	**İnkübasyon süresi/sıcaklığı**	**Referans**
Lactobacillus spp.	10^{-2} - 10^{-7}	Mannitol Rogosa Agar	48 saat / 37°C	Marotti I. vd., 2011
Bifidobacterium spp.	10^{-2} - 10^{-7}	Bifidobacterium Agar	48 saat / 37°C	Liu Z. vd., 2014
Bacteroides spp.	10^{-2} - 10^{-5}	Bacteroides Bile Esculin Agar (Gentamisin (100 mg/l) ilaveli)	48 saat / 37°C	Tuohy K. M. vd., 2002
Clostridium spp.	10^{-2} - 10^{-5}	Reinforced Clostridial Agar (Novobiyosin (8 mg/l) ve kolistin (8 mg/l) ilaveli)	48 saat / 37°C	Tuohy K. M. vd., 2002

B. Prebiyotik indeksin hesaplanması

Prebiyotik indeks, Aida vd. (2009) tarafından önerilen formülden yararlanılarak belirlenmiştir.

Prebiyotik indeks = (Lac+Bif)-(Bac+Clos)
Lac: *Lactobacillus* sp. sayısı (kob/ml)
Bif: *Bifidobacterium* sp. sayısı (kob/ml)
Bac: *Bacteroides* sp. sayısı (kob/ml)
Clos: *Clostridium* sp. sayısı (kob/ml)

Bu formüle göre *Bifidobacteria* sp. ve *Lactobacilli* sp. populasyonundaki artış pozitif etki, *Clostridia* sp. ve *Bacteroides* sp.'lerdeki artış ise negatif etki olarak değerlendirilmektedir.

3.2.2.3. Biyokimyasal inceleme parametreleri

Deney hayvanlarından alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serum elde edilmiş ve serum analizleri yapılana kadar +4°C'de saklanmıştır. Her bir grupta yer alan sıçanlara ait serum örneklerinde total kolesterol, HDL (yüksek yoğunlukta lipoprotein), LDL (düşük yoğunlukta lipoprotein) ve trigliserit miktarları hizmet alımı yolu ile (MST Tıbbi Ürünler Plan Proje İnşaat Sanayi ve Ticaret Ltd. Şti.) belirlenmiştir. Total kolesterol, HDL, LDL ve trigliserit miktarları Roche marka biyokimya kitleriyle (sırası ile 03039773, 04399803, 03038866 ve 20767107 kod numaralı kitler) Roche-Cobas Integra 400 Plus cihazında çalışılmıştır.

Ayrıca deney hayvanlarının bağırsak pH değerlerinin belirlenmesi için, sıçanların diseksiyonu sonrası alınan bağırsağın ileum-çekum kısmı küçük parçalar haline getirilmiştir. Alınan örnekler 1:10 (a:h) oranında saf su içinde 1 dakika homojenize edildikten sonra pH metre ile pH değerleri ölçülmüştür.

3.2.2.4. Histolojik inceleme parametreleri

Her bir deney hayvanından alınan mesenşimal mezenter doku örnekleri, %10'luk nötral formaldehit ile kimyasal fiksasyona tabi tutulmuş ve distile su ile karıştırılmıştır. Toluidin mavisi ile 2-3 dakika muamele edilerek boyanmaları sağlanmış ve ardından 3 kez daha distile su ile yıkanarak boyası akıtılmıştır. Daha sonra % 95 alkol ile muamele edilmiş ve ardından 3 dakika boyunca ksilende bekletilmiştir. Bu aşamalardan sonra hazırlanmış mesenşimal mezenter dokusu lamele entellan ile yapıştırılarak sabitlenmiştir. Preparatlardaki mast hücrelerinin 10 farklı alandaki sayım sonuçları skorlanarak (1; yok, 2; var ve 3; çok var) ve istatistiksel olarak yorumlanmıştır (Bancroft ve Stevens, 1990; Uyanoğlu vd., 2010).

3.2.3. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın *in vitro* ve *in vivo* prebiyotik aktivitenin araştırılması aşamalarında elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS 12.0 programı kullanılarak iki ve üç yönlü varyans analizi ile gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Makrofungus polisakkarit fraksiyonlarının hazırlanması

Araştırma kapsamında prebiyotik aktivitesi sorgulanacak olan makrofungus türlerinden elde edilen polisakkarit verimi Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Makrofungus türleri ve polisakkarit verimleri

Makrofungus türü	**Verim (%)**
Agaricus bisporus (beyaz form)	0,81
Agaricus bisporus (kestane formu)	3,17
Boletus edulis	2,40
Cantharellus cibarius	1,39
Ganoderma lucidum	0,31
Pleurotus ostreatus	1,41
Trametes versicolor	5,59

Elde edilen polisakkarit verimleri arasında bazı farklılıklar bulunmuştur. En yüksek polisakkarit verimi *Trametes versicolor*, en düşük verim ise *Ganoderma lucidum* türünde elde edilmiştir. Diğer makrofunguslar arasında değişen oranlarda polisakkarit fraksiyonu elde edilmiştir.

Nyman vd. (2016) *Cantharellus cibarius* türünden % 1,90 verim ile polisakkarit ektraksiyonu gerçekleştirerek sonuçlarımıza göre daha fazla verim elde etmişlerdir. Ayrıca polisakkarit içeriğinde ksiloz, galaktoz, fruktoz, mannitol, trehaloz, glikoz ve manan belirlemişlerdir. Bu içeriklerden bazılarının miktarı; mannitol % 8,56, trehaloz % 6,68, mannan % 8,56 ve glukoz % 7,98 olarak bulunmuştur. Mannitol mantarlarda, deniz alglerinde, meyve ve sebzelerde doğal olarak bulunur. Sağlık alanında güçlü bir idrar söktürücü olarak kullanılır ve idrar azlığını önler. Kafatası basıncını azaltır, yaşamı tehdit eden hastalıkların tedavisinde kan-beyin bariyeri boyunca ilaçların geçişini geçici bir süre de olsa arttırır (Muszynska vd., 2016).

Zhou vd. (2013) ve Rosello Soto vd. (2015) tarafından *Pleurotus ostreatus*'tan elde edilen polisakkarit verim yüzdesi sırası ile % 21,17 ve % 5,00 olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda *Pleurotus ostreatus*'tan elde edilen polisakkarit verimi bu verilere oranla daha az bulunmuştur. Bir başka çalışmada *Agaricus bisporus* (beyaz form) polisakkarit verimi % 4,50, *Agaricus bisporus* (kestane formu) polisakkarit verimi ise % 4,60 olarak tespit edilmiştir (Rosello soto vd., 2015). Bu verim miktarları çalışmamızdaki sonuçlara göre daha fazladır.

Chen vd. (2017) yaptığı bir çalışmada *Cantharellus cibarius*'tan polisakkarit elde etmiştir. Ekstraksiyon yönteminde bizim çalışmamızdaki gibi 60˚C'de mantar bazidiokarplarını kurutmuştur. Ancak çalışmamızdakinin aksine suda kaynatma oranı 1:20 (a/h) ve süre 2 saat ve santrifüj işlemi 3500 rpm'de 15 dakikadır. Bu aşamadan sonra çalışmamızdaki metot süpernatantı protein fraksiyonunun giderilmesi için 0.8 M trikloroasetik asit ile +4˚C'de 3 saat muamele etmek olmuştur. Ancak bu yöntemde 200 ml süpernatant, kloroform-protein jel yok olana kadar 30 defa 55˚C vakumlu dönmeli buharlaştırıcıda tutmak tercih edilmiştir. Ardından elde edilen solusyon çalışmamızda yararlandığımız % 96'lık etil alkolün aksine, bu çalışmada % 75 konsantrasyonda etil alkol ile +4˚C'de 24 saat muamele edilmiştir. Bu muamele sonrası kurutma işlemi çalışmamızda liyofilizasyon ile gerçekleştirilmiş olup bu çalışmada elektrotermal hava kurutucusunda 40˚C'de 2 saat gerçekleştirilmiştir. Daha sonra dondurma öncesi bu solusyon -80˚C'de 2 gün bekletilmiş ve akabinde -50˚C'de 48 saat bekletilerek polisakkarit eldesi gerçekleştirilmiştir.

Han vd. (2013) tarafından *Cantharellus cibarius*'tan polisakkarit eldesinin yapıldığı çalışmada ise 1,0 kg *Cantharellus cibarius* bazidiokarpı önce kurutulmuştur. Ardından 3 kez 2 litre distile suda 1,5 saat kaynatılmıştır. 300'er ml alınarak 3000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant %95'lik etanol ile bir gece +4˚C'de bekletilmiştir. Sonrasında suyunun uzaklaştırılması için 2 gün diyaliz edilmiştir. Protein uzaklaştırması için 7 defa triklorometan:bütanol ($CHCL_3$:BuOH) ile 4:1 (h/h) oranında 15 dakika muamele edilmiştir. Sonrasında vakum ile solusyon kurutularak polisakkarit elde edilmiştir. Bu yöntem ile bizim kullandığımız yöntem işlem sırası ve etanol konsantrasyonu açısından benzerlik göstermektedir. Bu araştırıcılar *Cantharellus cibarius* polisakkaritinin moleküler ağırlığını $4{,}8\times10^5$ Da olarak bulmuştur (Han vd., 2013). Bu

polisakkaritin molekül büyüklüğünün yüksek olması, mideden çözünmeden bağırsağa kadar ulaşabilmesi açısından çok önemli bir özelliktir.

Bunlar ve bunlara benzer yöntemler ile *C. cibarius*'tan farklı özelliklerde polisakkaritler izole edilmiştir. Han'ın vd. (2013) yaptığı polisakkarit eldesi yönteminde karbonhidrat kaynağı olarak yalnızca glikoz tespit edilmiştir. Bunun yanında protein içeriği olarak % 1,62 oranında farklı amino çeşitlerine rastlanmıştır. Farklı bir literatürde *C. cibarius* sporokarplarında % 3,6 oranında yağ asitlerinin olduğu belirtilmiştir (Bozena vd., 2013). Bu nedenle bu polisakkarit homopolisakkarit değil, heteropolisakkarit olabilir.

Mantar bazidiyokarplarının polisakkarit verimlerinin arasındaki farklılıklar polisakkarit çözünürlüğü farklılığından kaynaklanabilir. Polisakkarit eldesi aşamasında standart bir yöntem kullanılmış olduğu için bu verim farklılıklarının metottan kaynaklanan sapmalardan daha çok mantar türlerinin içerdiği kendilerine özgü polisakkarit oranının farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

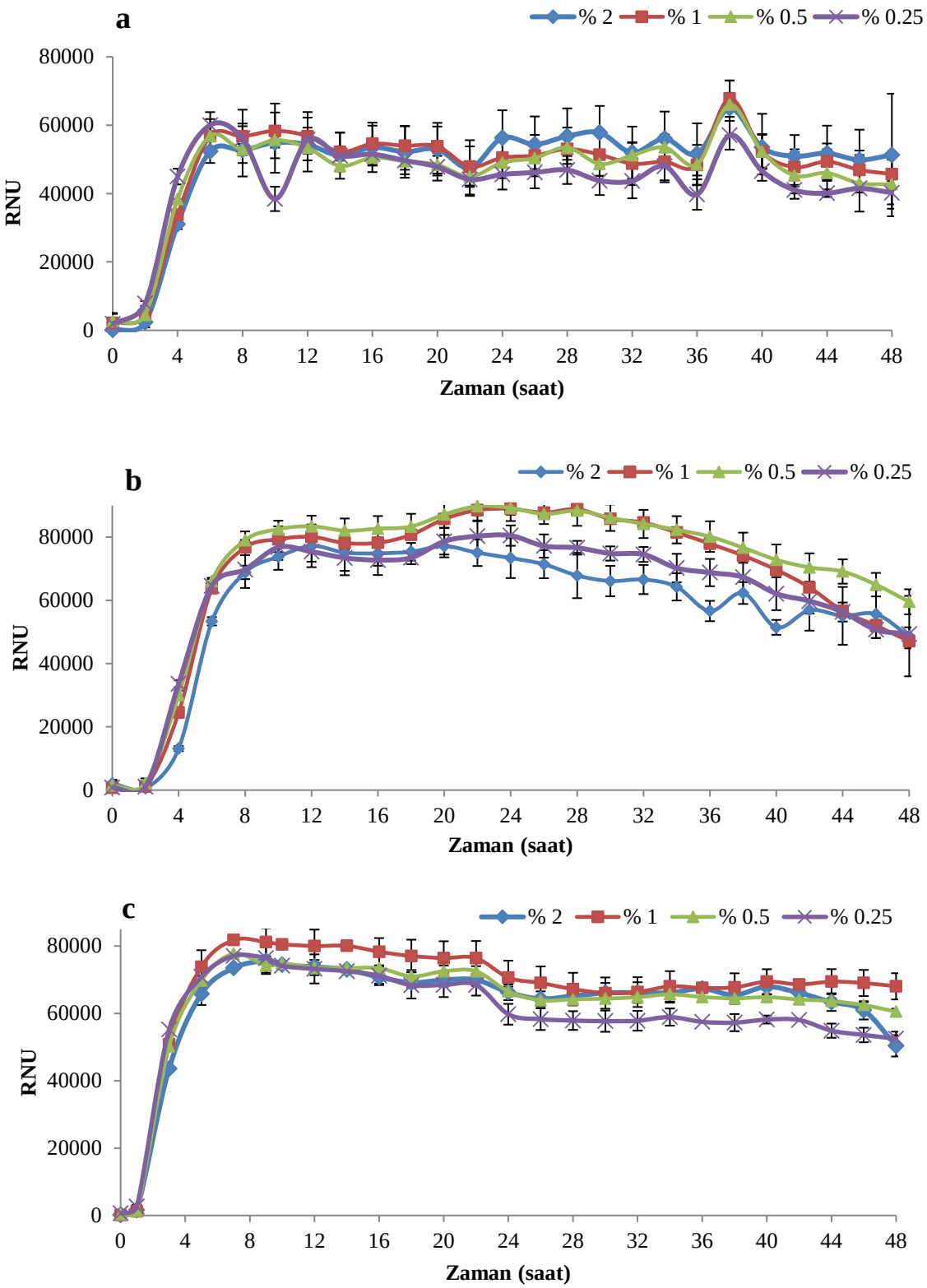
Clitocybe maxima türü makrofungusta kaynar su ile yapılan ekstraksiyonda polisakkarit verimi % 5,86 oranında elde edilmiştir (Chen vd., 2013). Bir başka çalışmada *Tricholoma giganteum* makrofungusundan % 12,92 oranında verim elde edilmiştir (Mo vd., 2013). *Russula griseocarnosa* ile yapılan polisakkarit ektraksiyonunda verim % 4,15 elde edilmiştir (Yuan vd., 2017). Zang Yu-Hong'un (2013) yaptığı bir çalışmada *Pholiota nameko* mantarından % 6,23 oranında polisakkarit verimi elde etmiştir.

4.2. Makrofungus polisakkaritlerinin *in vitro* prebiyotik aktivitesinin araştırılması

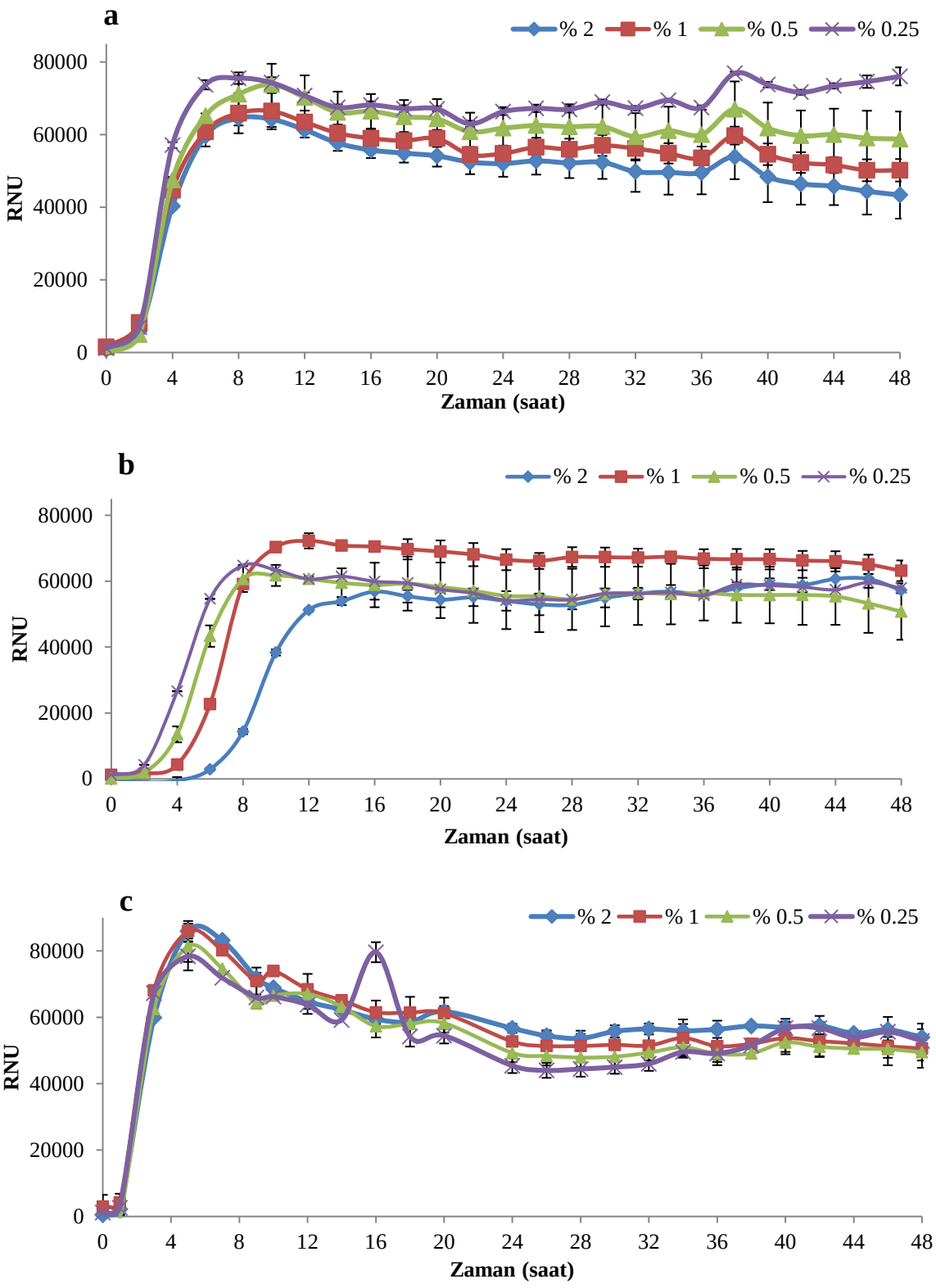
Bu çalışmada 6 makrofungus türüne ait 7 suşun bazidiokarp örneklerinden elde edilen polisakkarit fraksiyonlarının *in vitro* prebiyotik aktivitesinin araştırılması için 3 bakteri türünün üremesi üzerine etkisi nefalometrik olarak sorgulanmıştır. Bakterilerin üremesi RNU (Relative Nefalometric Unit) birimi ile ifade edilmiştir (Finger vd., 2012). McFarland 0,5 e göre ayarlanmış yoğunluk başlangıçtaki RNU'da 0 (sıfır) kabul edilmiştir. Kontrol grupları ve makrofungus polisakkaritlerinin test mikroorganizmaları üzerine etkisi Çizelge 4.2 – 4.13 ve Şekil 4.1– 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.2. İnulinin test mikroorganizmalarının üremesi üzerine etkisi (Ortalama (RNU / 1000) ± Standart Sapma)

Test M.o.sı	İnkübasyon süresi (saat)	Doz (%)			
		2	1	0,5	0,25
L. plantarum	8	68,82 ± 3,90	76,67 ± 1,34	78,99 ± 4,00	69,71 ± 4,74
	24	80,50 ± 2,95	88,92 ± 2,24	89,21 ± 3,96	80,46 ± 2,12
	48	55,46 ± 5,83	59,51 ± 1,81	59,53 ± 2,20	49,36 ± 3,90
L. acidophilus	8	48,62 ± 1,16	56,74 ± 5,30	52,85 ± 2,12	56,14 ± 3,31
	24	46,02 ± 2,29	50,52 ± 4,93	52,70 ± 3,46	45,59 ± 3,40
	48	51,29 ± 3,74	45,67 ± 7,28	36,84 ± 3,82	37,50 ± 1,45
E. coli	8	73,48 ± 0,84	81,78 ± 4,88	77,72 ± 2,26	77,05 ± 4,32
	24	66,26 ± 2,71	70,62 ± 3,89	66,52 ± 0,90	59,75 ± 2,16
	48	50,38 ± 1,31	68,03 ± 2,82	60,51 ± 1,54	52,49 ± 2,17



Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlardaki inulinin *Lactobacillus acidophilus* (a), *Lactobacillus plantarum* (b) ve *Escherichia coli* (c) 'nin üremesine etkisi



Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlardaki glukozun *Lactobacillus acidophilus* (a), *Lactobacillus plantarum* (b) ve *Escherichia coli* (c) 'nin üremesine etkisi

Çizelge 4.3. Glukozun test mikroorganizmalarının üremesi üzerine etkisi (Ortalama (RNU / 1000) ± Standart Sapma)

Test M.o.sı	İnkübasyon süresi (saat)	Doz (%)			
		2	1	0,5	0,25
L. plantarum	8	15,76 ± 3,80	59,10 ± 9,20	56,80 ± 5,30	59,93 ± 3,21
	24	54,02 ± 9,47	66,54 ± 3,13	50,60 ± 4,22	54,16 ± 1,11
	48	57,29 ± 5,12	63,17 ± 1,92	44,05 ± 3,86	61,93 ± 3,67
L. acidophilus	8	64,53 ± 2,20	65,88 ± 2,11	71,12 ± 4,76	75,54 ± 1,01
	24	48,31 ± 0,92	54,80 ± 3,09	57,72 ± 2,90	75,54 ± 1,02
	48	43,40 ± 2,20	50,19 ± 0,50	58,77 ± 7,18	69,03 ± 1,34
E. coli	8	83,17 ± 2,23	80,19 ± 4,65	74,69 ± 2,22	71,85 ± 2,78
	24	56,67 ± 4,14	52,7 ± 5,82	49,26 ± 2,48	45,41 ± 1,49
	48	53,98 ± 5,76	46,56 ± 0,06	49,46 ± 2,63	52,91 ± 1,14

Şekil 4.1 - 4.2'de sunulan verilere göre *Lactobacillus acidophilus*'un % 0,25, % 0,5 ve % 1,0 glukoz varlığında inuline göre daha fazla üreme gösterdiği belirlenmiştir. konsantrasyon % 2 olduğunda ise bu durumun tam tersi olarak inulin varlığında daha çok gelişmiştir. *Lactobacillus plantarum*'un üremesi ise 0,5 mg/ml, 1 mg/ml ve % 2 inulin varlığında glukoza oranla daha çok artış göstermiştir. Bu bakterinin % 0,25 glukoz varlığında inuline göre daha çok ürediği tespit edilmiştir. Bu durumun tam tersi olarak *Escherichia coli*'nin gelişimi inulinin % 1, % 0,5 ve % 0,25 konsantrasyonlarında glukoza göre daha fazla, % 2 konsantrasyonda ise glukozdan azdır.

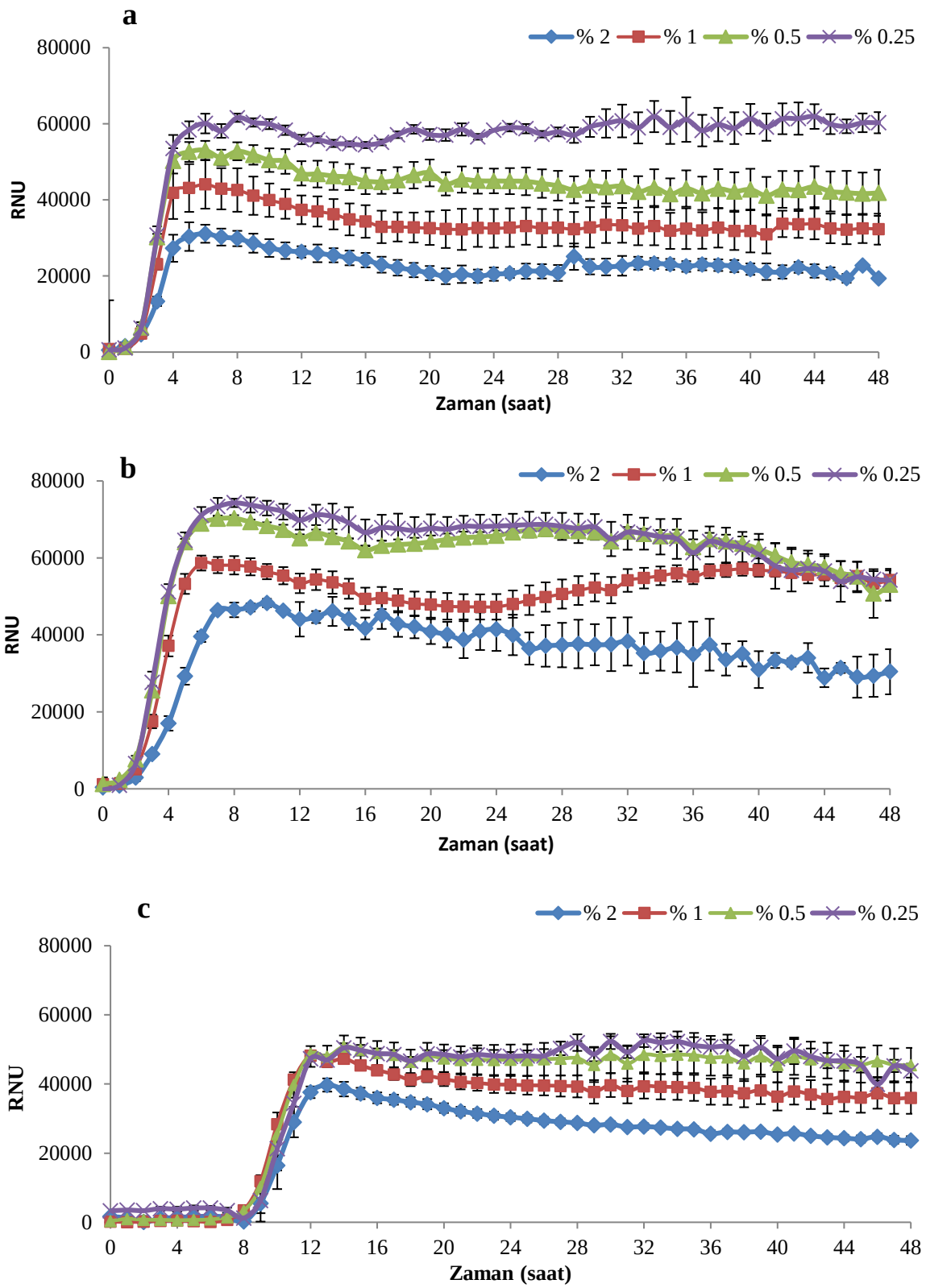
İnulin ticari olarak prebiyotik kaynağı olarak kullanılan bir karbonhidrattır. İçerdiği asetik asit, propiyonik asit ve bütirik asit gibi kısa zincirli yağ asitleri sayesinde prebiyotik kaynağı olarak kullanılmaktadır (Al-Sheraji vd., 2013). Bu durumun bir örneği olarak inulinin yoğurt (Aryana vd., 2007) ve kremaya (Kip vd., 2006) eklendiğinde bu ortamlardaki yararlı bakteri popülasyonunu arttırdığı tespit edilmiştir. Bunun dışında günde 40 g inulin alan insanların bağırsak mikrobiyotasındaki bakterilerdeki artışa bağlı olarak kalsiyum emiliminin arttığı görülmüştür (Roberfroid vd., 2002). Caleffi vd. (2015) tarafından *in vitro* olarak yapılan bir çalışmada inulinin *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L.*

casei ve *Bifidobacterium bifidum* gibi probiyotik bakterilerin gelişimini arttırdığı belirlenmiştir. Yapılan başka bir *in vitro* çalışmada ise *L. acidophilus*'un üremesini inulinin % 41,72 glukozun ise % 2,91 oranında arttırdığı görülmüştür (Moongngarm vd., 2011).

Çalışmamızın sonuçlarına göre inulinde probiyotik bakterilerin daha fazla üreme gösterdiği belirlenmiştir. *Escherichia coli* düşük konsantrasyonlarında ise patojen bir bakteri olan glukoz varlığında gelişimini arttırmış, inulinin yüksek konsantrasyonlarında ise azaltmıştır. Eldeki verilerin birlikte değerlendirilmesi ile inulinin yüksek dozlarında bağırsak mikrobiotasında yer alan probiyotik bakteri türlerinin arttığı görülmüştür.

Çizelge 4.4. *Agaricus bisporus* (beyaz form) polisakkaridinin (ABP) test mikroorganizmalarının üremesi üzerine etkisi (Ortalama (RNU / 1000) ± Standart Sapma)

Test M.o.sı	İnkübasyon süresi (saat)	Doz (%)			
		2	1	0,5	0,25
L. plantarum	8	46,50 ± 1,90	58,08 ± 2,39	70,31 ± 0,79	74,30 ± 1,09
	24	44,60 ± 0,13	47,30 ± 3,31	65,75 ± 1,37	68,30 ± 2,95
	48	33,70 ± 1,50	54,30 ± 1,37	53,03 ± 4,13	54,20 ± 2,50
L. acidophilus	8	29,85 ± 2,01	39,37 ± 1,19	52,70 ± 2,37	61,6 ± 1,10
	24	20,48 ± 1,70	29,60 ± 0,50	44,98 ± 3,24	58,30 ± 0,17
	48	19,34 ± 0,60	29,96 ± 0,13	45,28 ± 1,25	60,30 ± 2,80
E. coli	8	1,50 ± 0,47	2,70 ± 0,40	3,83 ± 0,30	-0,40 ± 0,12
	24	30,40 ± 1,12	39,80 ± 2,50	47,06 ± 4,30	48,01 ± 1,20
	48	23,70 ± 1,23	38,62 ± 0,70	45,48 ± 4,97	43,90 ± 2,01

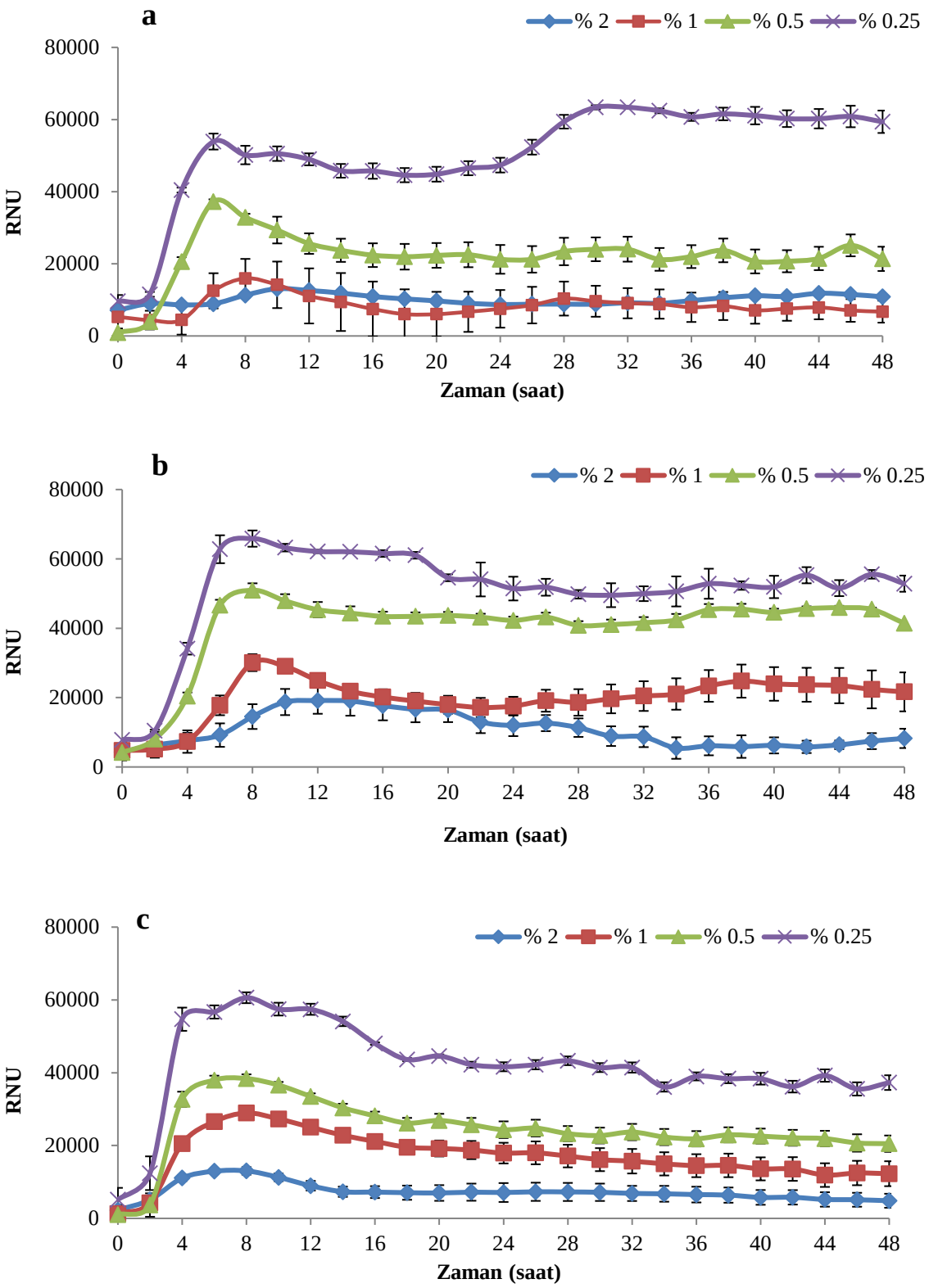


Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlardaki *Agaricus bisporus* (beyaz form) polisakkaritlerinin (ABP) *Lactobacillus acidophilus* (a), *Lactobacillus plantarum* (b) ve *Escherichia coli*'nin (c) üremesine etkisi

Şekil 4.3'de sunulan verilerin detaylı incelenmesi sonucunda, *Agaricus bisporus* (beyaz form) polisakkaritinin (ABP) *L. acidophilus* üremesini % 0,25 ve % 0,5 konsantrasyonlarda daha fazla arttırdığı belirlenmiştir. Elde edilen veriler *L. acidophilus'*un 48. saat sonundaki üreme değerlerinin glukoz ile çok yakın olmasına karşın, pozitif kontrol olarak kullanılan inulinden çok daha yüksek olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan % 0,25 oranında ABP, *L. plantarum* üremesini inuline göre arttırmasına karşın % 0,5 oranında inuline daha yakın değerler sunmaktadır. Önemli bir bulgu olarak ABP varlığında *E. coli* üremesinin, kontrol gruplarına göre daha az gerçekleştiği belirlenmiştir.

Agaricus bisporus (beyaz form) dünya genelinde kültürü yapılan bir mantar türüdür. Yüksek polisakkarit ve lif içeriğine sahiptir. Ayrıca protein, vitamin ve mineral oranı da yüksektir (Giannenas vd., 2010). Bu makrofungus polisakkaritinin, içerdiği heteropolisakkarit, D-galaktoz, D-mannoz, D-ksiloz, L-fruktoz, L-(ya da D)-arabinoz, ksiloz, fruktoz, glukoz, sükroz ve trehaloz nedeni ile prebiyotik aktiviteye sahip olduğu vurgulanmaktadır (Aida vd., 2009).

Çalışmamızın sonuçlarına göre ABP varlığında probiyotik bakteri suşlarının stimule olması, ABP'nin prebiyotik özelliğe sahip olduğunu destekler niteliktedir. Patojen bir bakteri türü olan *E. coli*'nin üremesini ise daha az teşvik etmiş olması nedeni ile de ABP'nin prebiyotik olarak kullanımına uygunluğu güvenlidir. Giannenas vd.'in (2010) *in vivo* yapmış oldukları bir çalışmada *Agaricus bisporus* (beyaz form) ile beslenen hindilerin bağırsak mikrobiyotasında bulunan *Lactobacillus* spp. sayısında artış olduğunu tespit etmişlerdir. Bu nedenle *Agaricus bisporus*'un probiyotik bakterilerde pozitif kontrol grubuna göre daha fazla artış sağlayabilmesi nedeni ile prebiyotik özelliğe sahip olduğu ileri sürülmektedir. Tüm bu özellikler ve verilerden anlaşılacağı üzere *Agaricus bisporus* (beyaz form) tüketimi ile bağırsak mikrobiyotasının iyileştirilmesinin sağlanabileceği söylenebilir.

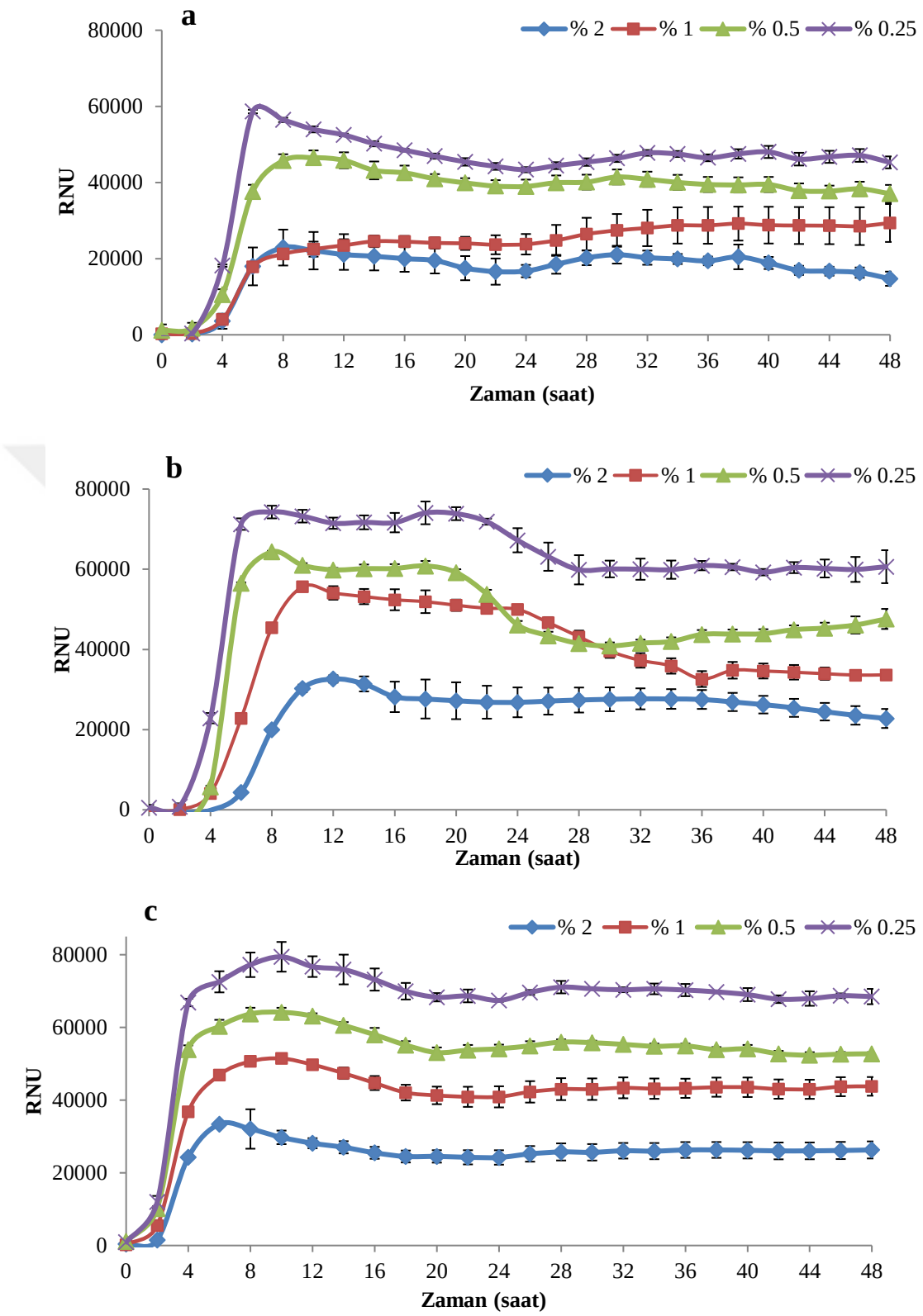


Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlardaki *Agaricus bisporus* (kestane formu) polisakkaritlerinin (ABKP) *Lactobacillus acidophilus* (a), *Lactobacillus plantarum* (b) ve *Escherichia coli*'nin (c) üremesine etkisi

Çizelge 4.5. *Agaricus bisporus* (kestane formu) polisakkaridinin (ABKP) test mikroorganizmalarının üremesi üzerine etkisi (Ortalama (RNU / 1000) ± Standart Sapma)

Test M.o.sı	İnkübasyon süresi (saat)	Doz (%)			
		2	1	0,5	0,25
L. plantarum	8	6,40 ± 2,63	18,90 ± 1,05	40,97 ± 1,40	55,9 ± 2,40
	24	3,60 ± 0,60	10,60 ± 1,80	32,25 ± 0,70	36,30 ± 2,90
	48	2,25 ± 6,70	14,30 ± 0,70	33,90 ± 1,20	42,90 ± 2,90
L. acidophilus	8	1,70 ± 0,20	9,80 ± 3,50	24,50 ± 1,50	40,20 ± 2,10
	24	0,60 ± 0,70	4,20 ± 0,30	12,90 ± 1,70	37,40 ± 3,10
	48	0,40 ± 0,30	5,60 ± 1,20	8,40 ± 1,30	49,40 ± 0,50
E. coli	8	8,90 ± 0,30	23,95 ± 1,06	33,40 ± 1,17	55,60 ± 0,30
	24	3,20 ± 0,40	10,10 ± 0,30	20,60 ± 0,40	36,60 ± 2,01
	48	0,06 ± 1,30	4,80 ± 0,50	17,80 ± 0,31	32,30 ± 1,60

Agaricus bisporus (kestane formu) polisakkaridinin (ABKP) tüm konsantrasyonlarında üç bakteri türünün üremesi, inulin ve glukozda gelişen bakterilere göre daha az miktarda olmuştur (Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.). *Agaricus bisporus*'un farklı bir suşu olan bu mantar türümüzde yine ABP ile probiyotik bakterileri stimule edici benzer özellikler görülmesi beklense de tam tersi bir sonuç elde edilmiştir. Bu durum tür içi genetik çeşitliliğin bir örneği olarak değerlendirilebilir.

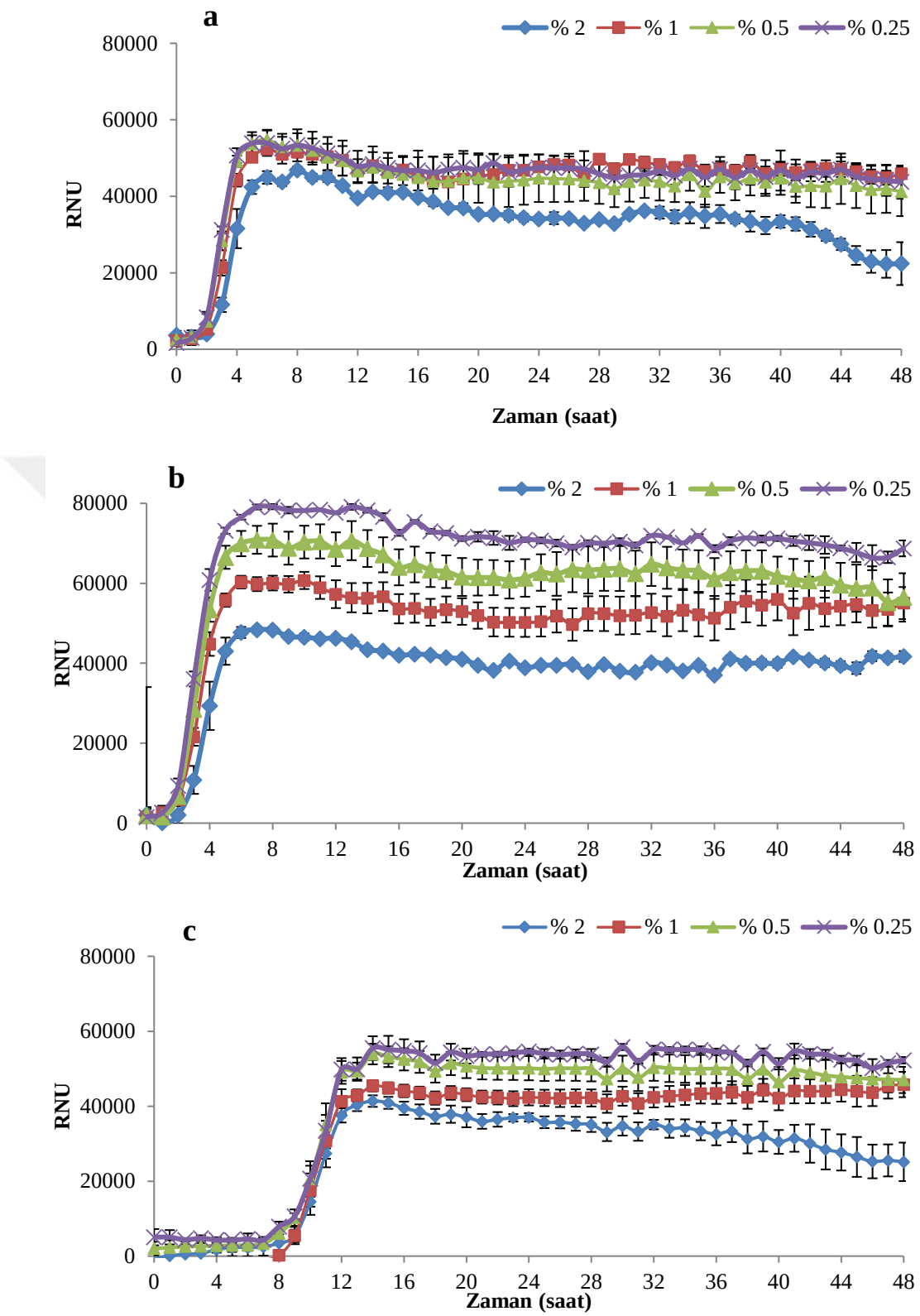


Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlardaki *Boletus edulis* polisakkaritlerinin *Lactobacillus acidophilus* (a), *Lactobacillus plantarum* (b) ve *Escherichia coli*'nin (c) üremesine etkisi

Çizelge 4.6**.** *Boletus edulis* polisakkaridinin (BEP) test mikroorganizmalarının üremesi üzerine etkisi (Ortalama (RNU / 1000) ± Standart Sapma)

Test M.o.sı	İnkübasyon süresi (saat)	Doz (%)			
		2	1	0,5	0,25
L. plantarum	8	17,80 ± 0,20	45,40 ± 2,60	64,40 ± 1,07	74,30 ± 1,60
	24	26,80 ± 2,40	49,90 ± 0,40	46,10 ± 2,50	67,20 ± 3,01
	48	22,70 ± 1,90	33,60 ± 2,50	47,60 ± 0,70	60,60 ± 4,10
L. acidophilus	8	25,30 ± 2,10	21,20 ± 1,40	45,70 ± 3,50	51,90 ± 0,70
	24	16,70 ± 1,60	26,20 ± 2,50	36,30 ± 0,14	36,70 ± 0,30
	48	15,80 ± 0,40	27,10 ± 1,30	32,80 ± 0,08	40,15 ± 2,10
E. coli	8	32,05 ± 1,60	50,60 ± 1,90	63,70 ± 1,80	77,20 ± 3,04
	24	24,20 ± 2,34	40,90 ± 2,50	54,10 ± 0,40	67,40 ± 2,10
	48	26,30 ± 1,02	43,80 ± 2,40	52,74 ± 2,60	68,50 ± 2,90

Boletus edulis polisakkaridinde (BEP) 48. saat sonunda *Lactobacillus acidophilus* ‘un üremesi % 0,25 oranında inulinden fazla, glukozdan az; *Lactobacillus plantarum* un üremesi % 0,25 oranında inulinden fazla, glukozla yakın miktarda; *Escherichia coli* ise tüm konsantrasyonlarda kontrol gruplarına göre daha az gelişim göstermiştir. Bu sonuca göre BEP' in probiyotikleri aktive edici özelliği olduğu anlaşılmakta ve bu durumu içerdiği kitin sayesinde gerçekleştirdiği öngörülmektedir (Aida vd., 2009).



Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlardaki *Cantharellus cibarius* polisakkaritlerinin *Lactobacillus acidophilus* (a), *Lactobacillus plantarum* (b) ve *Escherichia coli*'nin (c) üremesine etkisi

Çizelge 4.7. *Cantharellus cibarius* polisakkaridinin (CCP) test mikroorganizmalarının üremesi üzerine etkisi (Ortalama (RNU / 1000) ± Standart Sapma)

Test M.o.sı	İnkübasyon süresi (saat)	Doz (%)			
		2	1	0,5	0,25
L. plantarum	8	48,30 ± 0,70	60,05 ± 1,80	70,80 ± 4,10	79,20 ± 0,60
	24	38,80 ± 0,10	50,20 ± 3,60	61,30 ± 4,70	70,90 ± 0,50
	48	41,70 ± 1,30	55,05 ± 4,01	56,50 ± 6,05	68,70 ± 1,90
L. acidophilus	8	46,80 ± 0,90	51,50 ± 0,50	53,30 ± 3,10	53,30 ± 4,18
	24	34,05 ± 0,60	47,70 ± 1,10	41,30 ± 1,80	25,50 ± 1,30
	48	25,50 ± 1,30	45,80 ± 1,70	37,80 ± 2,50	43,70 ± 4,30
E. coli	8	4,80 ± 0,60	-0,40 ± 0,30	6,06 ± 1,20	7,09 ± 0,10
	24	37,02 ± 1,12	42,37 ± 2,15	50,13 ± 3,20	54,60 ± 0,70
	48	28,03 ± 1,20	45,80 ± 3,40	47,01 ± 3,50	52,30 ± 0,90

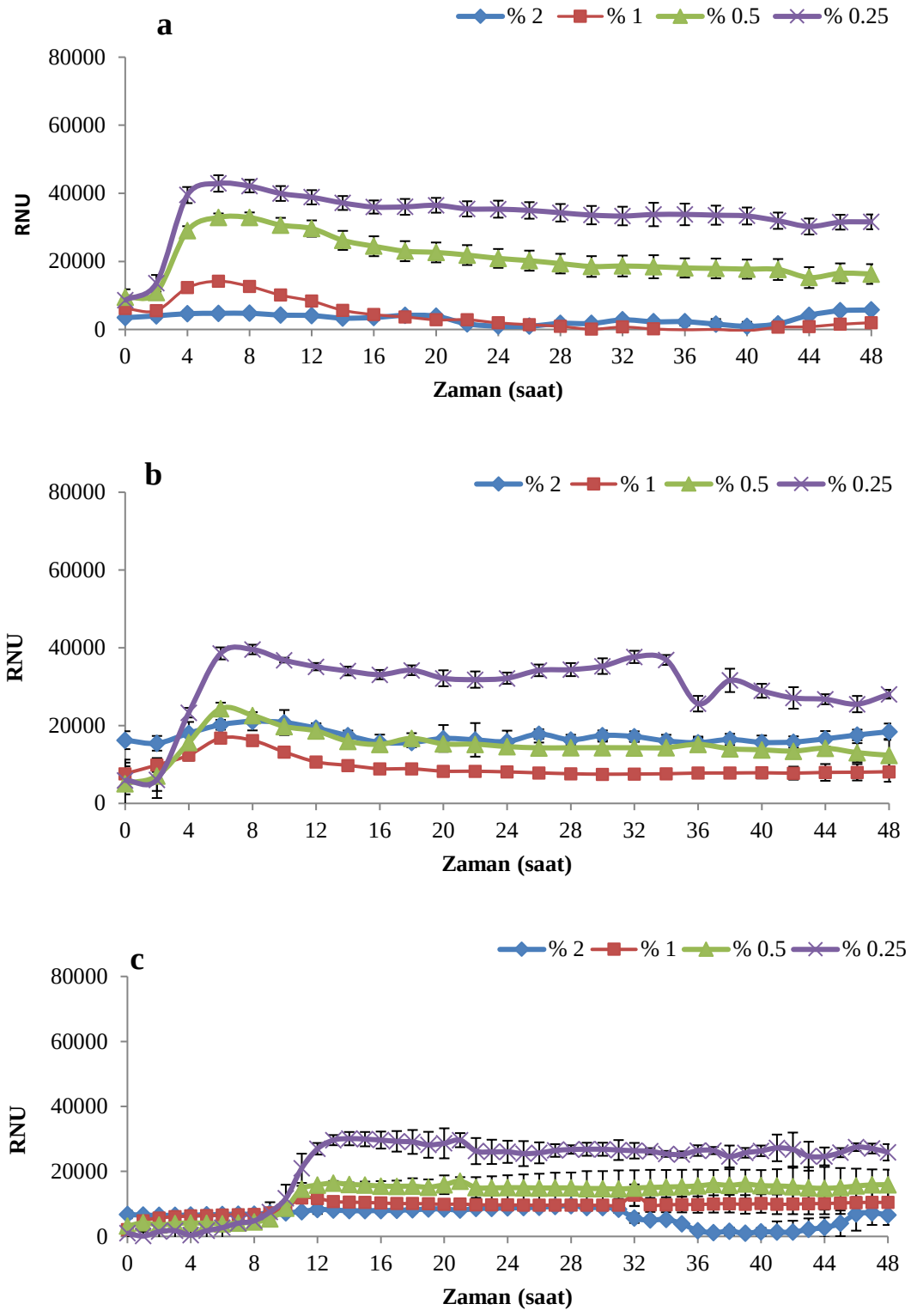
Cantharellus cibarius polisakkaridi (CCP) 48. saat sonunda *Lactobacillus acidophilus* üremesini % 0,25 ve % 0,5 oranında inulinden fazla ve glukozdan az, % 1 oranında inulin ve glukozla yakın miktarda etkilemiştir. *Lactobacillus plantarum* üremesini ise % 0,25 oranında inulinden fazla, glukozla yakın, % 0,5 oranında glukozdan fazla, inulinle yakın, % 1 oranında ise inulinden az, glukozla yakın olarak gelişimini sağlamıştır. CCP, *Escherichia coli* üremesini ise % 0,25 oranında inulin ve glukozdan fazla % 1 oranında inulinden az, glukozla aynı oranda etkilemiştir.

Çizelge 4.8. *Ganoderma lucidum* polisakkaridinin (GLP) test mikroorganizmalarının üremesi üzerine etkisi (Ortalama (RNU / 1000) ± Standart Sapma)

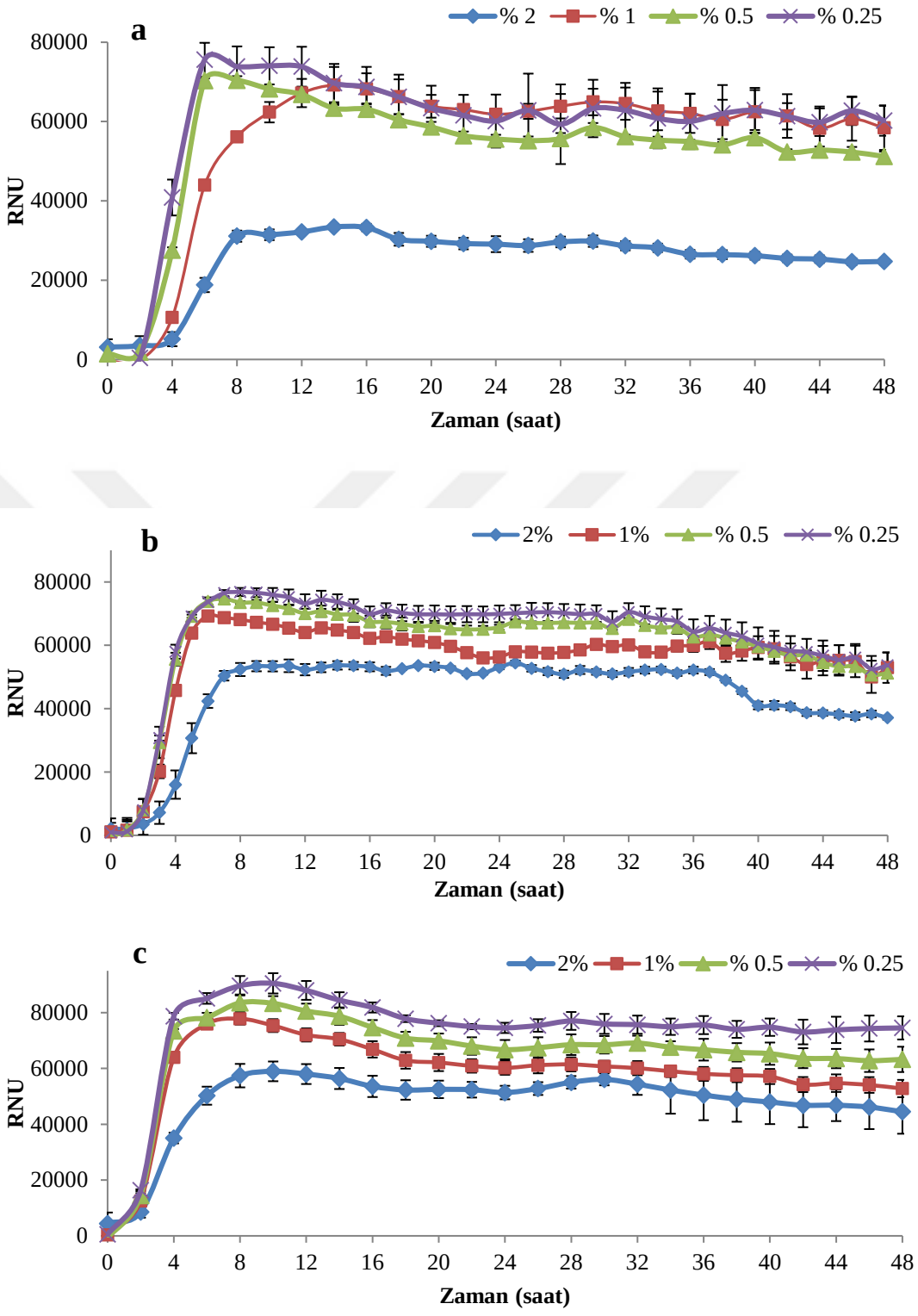
Test M.o.sı	İnkübasyon süresi (saat)	Doz (%)			
		2	1	0,5	0,25
L. plantarum	8	8,60 ± 0,70	10,20 ± 0,60	16,60 ± 0,80	33,60 ± 1,60
	24	4,70 ± 0,40	2,40 ± 0,30	8,60 ± 1,10	26,10 ± 2,60
	48	6,90 ± 1,30	3,60 ± 0,40	8,70 ± 1,20	22,07 ± 1,10
L. acidophilus	8	0,80 ± 0,60	6,02 ± 0,02	26,90 ± 2,90	36,10 ± 1,90
	24	5,03 ± 0,20	4,07 ± 1,20	16,50 ± 0,02	29,30 ± 2,20
	48	2,30 ± 0,03	2,50 ± 1,20	12,40 ± 0,20	25,60 ± 1,90
E. coli	8	1,30 ± 0,60	0,40 ± 0,30	-1,08 ± 0,50	0,30 ± 1,50
	24	2,70 ± 0,30	3,05 ± 0,40	11,06 ± 1,30	18,30 ± 1,60
	48	2,10 ± 1,60	6,30 ± 0,80	12,30 ± 1,90	21,30 ± 0,80

Ganoderma lucidum polisakkaridlerinin (GLP) tüm konsantrasyonlarında 3 bakteri türü için de gelişim inulin ve glukozdakinden daha az miktarda olmuştur.

Ganoderma lucidum'un biyoaktif bileşenleri güçlü bir antioksidan etkiye sahiptir. Bu özelliği sayesinde prebiyotik kaynak olan polisakkaritleri bağırsaklarda koruyucu bir etkiye sahiptir (Zhuo vd., 2016). *Ganoderma lucidum*'un içerdiği β-(1→3)-bağlı D-glukan, programlı hücre ölümüne (apoptozis) neden olmaktadır (Selvi vd., 2011). Ayrıca *Ganoderma lucidum* kaynaklı polisakkaritlerin güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu da bilinmektedir. Tür içi genetik farklılıklar nedeni ile farklı suşlarda prebiyotik, antimikrobiyal aktivitelerin derecesi de değişkenlik gösterebilmektedir. Sonuçlarımızda kontrol grubuna göre bakteri üremesini daha az teşvik etmesi tür içi genetik çeşitlilikten kaynaklanıyor olabilir.



Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlardaki *Ganoderma lucidum* polisakkaritlerinin *Lactobacillus acidophilus* (a), *Lactobacillus plantarum* (b) ve *Escherichia coli*'nin (c) üremesine etkisi



Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlardaki *Pleurotus ostreatus* polisakkaritlerinin *Lactobacillus acidophilus* (a), *Lactobacillus plantarum* (b) ve *Escherichia coli*'nin (c) üremesine etkisini

Çizelge 4.9. *Pleurotus ostreatus* polisakkaridinin (POP) test mikroorganizmalarının üremesi üzerine etkisi (Ortalama (RNU / 1000) ± Standart Sapma)

Test M.o.sı	İnkübasyon süresi (saat)	Doz (%)			
		2	1	0,5	0,25
L. plantarum	8	52,40 ± 2,06	68,10 ± 1,00	73,50 ± 0,40	76,80 ± 1,30
	24	53,07 ± 0,60	56,30 ± 0,10	65,70 ± 0,80	69,90 ± 2,60
	48	37,10 ± 0,60	52,90 ± 4,80	51,20 ± 0,80	53,70 ± 3,90
L. acidophilus	8	31,10 ± 0,90	56,10 ± 3,90	70,40 ± 1,40	73,80 ± 5,10
	24	29,08 ± 0,80	61,80 ± 5,50	66,70 ± 4,50	60,10 ± 6,60
	48	24,70 ± 0,60	63,02 ± 2,10	51,20 ± 1,70	60,20 ± 3,80
E. coli	8	57,40 ± 4,20	77,80 ± 2,90	83,50 ± 2,60	89,60 ± 1,80
	24	51,40 ± 2,40	60,20 ± 3,10	69,90 ± 2,60	74,50 ± 4,10
	48	55,63 ± 0,80	52,80 ± 5,40	63,20 ± 6,01	74,50 ± 3,50

Pleurotus ostreatus polisakkaridi (POP) 48. saat sonunda *Lactobacillus acidophilus* üremesini % 0,25 ve % 0,5 oranında inulinden çok daha fazla, glukozla yakın ve % 1 oranında ise inulin ve glukozdan daha fazla arttırmıştır. POP, *Lactobacillus plantarum* gelişimini ise % 0,25 oranında inulinden fazla, glukozdan az, % 0,5 oranında inulinden az, glukozdan fazla sağlamıştır. % 1 oranında ise inulinden az, glukozla yakın bir üreme görülmüştür. POP, *Escherichia coli* gelişimini ise % 0,25 ve % 0,5 oranında inulin ve glukozdan fazla, % 1 oranında inulinden az, glukozdan fazla etkilemiştir.

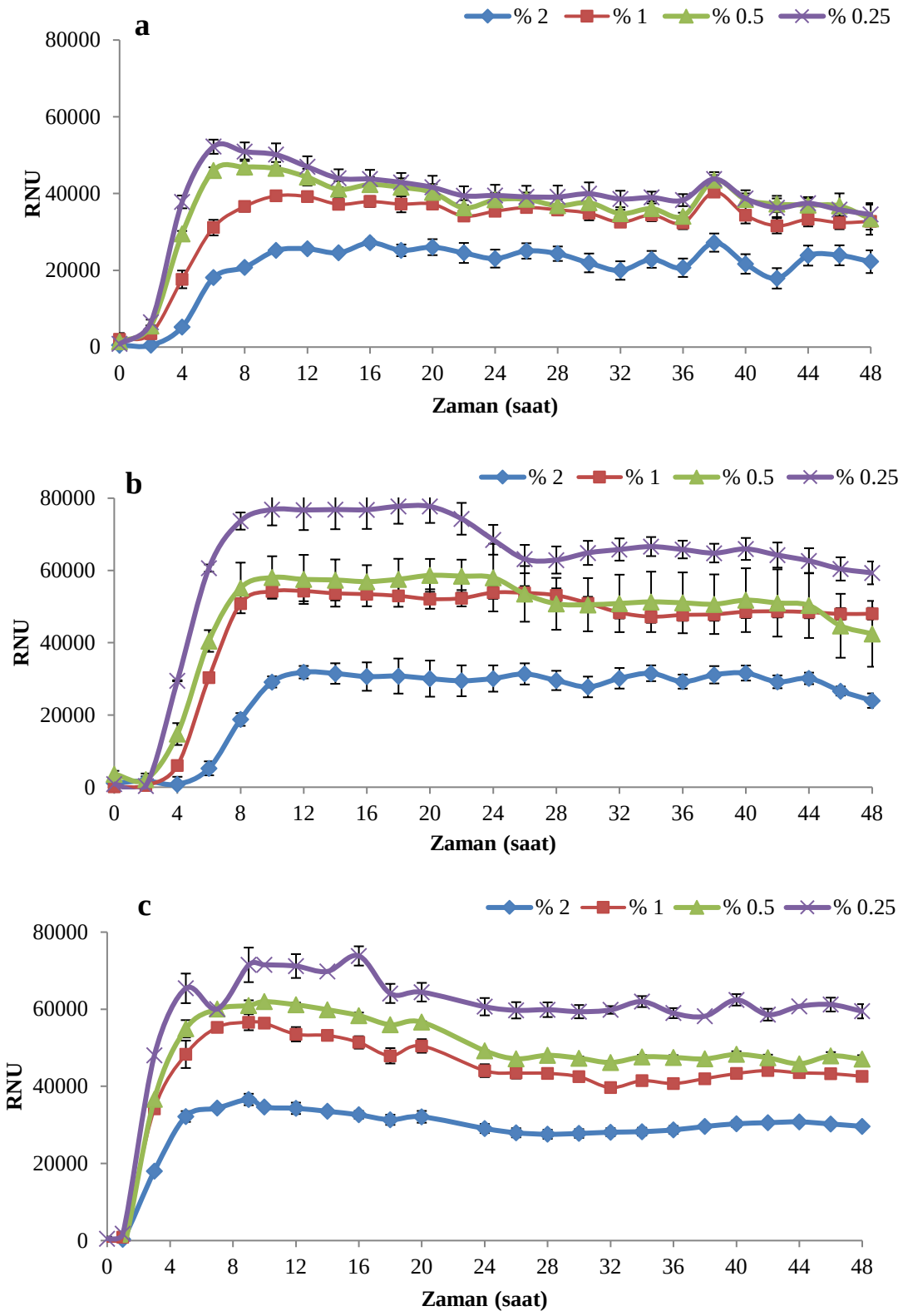
Pleurotus ostreatus içerdiği (1→3),(1→6)-D-polisakkarit sayesinde bağırsak hareketlerini arttırmaktadır (Selvi vd., 2011). Synytsya vd. (2009) *Pleurotus ostreatus*'tan β-glukan ekstraksiyonu elde ederek dokuz probiyotik bakteri suşunda *in vitro* prebiyotik aktivite çalışmış ve probiyotik suşlarının seçici olarak artış gösterdiğini tespit etmiştir. Bu nedenle *Pleurotus ostreatus* β-glukanının (pleuran) bağırsak bakteri mikrobiyotasını canlandırdığını belirtmiştir. Bu özelliği sayesinde çalışmamızda da inulin ve glukoza göre probiyotik bakterilerin üremesini daha fazla teşvik edebilmiştir.

Hozova vd., (2004) *Pleurotus ostreatus*'tan elde ettiği polisakkaritleri (pleuran) yoğurda katarak 30 gün boyunca 5 ˚C 'de saklamıştır. Belli zaman aralıklarından sonra (1., 15. ve 30. günler) aldığı yoğurt örneklerinde yararlı bakterilerin fermentasyon kapasitesinin artığını, saklama süresince maya, küf ve koliform bakteri görülmediğini ve pleuranın yoğurt kalitesini arttırdığını kaydetmiştir. Çalışmamızla benzer olarak pleuranın yararlı bakteri populasyonunu arttırması ve zararlı bakterilerin gelişimini baskılaması nedeniyle prebiyotik özelliğe sahip olduğu desteklenir niteliktedir.

Çizelge 4.10. *Trametes versicolor* polisakkaridinin (TVP) test mikroorganizmalarının üremesi üzerine etkisi (Ortalama (RNU / 1000) ± Standart Sapma)

Test M.o.sı	İnkübasyon süresi (saat)	Doz (%)			
		2	1	0,5	0,25
L. plantarum	8	21,02 ± 0,01	50,85 ± 3,40	60,40 ± 0,20	73,60 ± 5,30
	24	30,08 ± 1,90	53,80 ± 1,60	63,40 ± 0,70	68,40 ± 3,10
	48	28,20 ± 0,90	48,01 ± 1,40	47,50 ± 2,70	59,30 ± 4,60
L. acidophilus	8	20,80 ± 0,80	36,60 ± 1,40	46,90 ± 1,90	50,90 ± 2,40
	24	24,70 ± 0,90	35,40 ± 2,14	38,30 ± 4,12	39,50 ± 2,60
	48	22,25 ± 1,60	32,70 ± 2,20	33,40 ± 1,10	34,50 ± 1,02
E. coli	8	34,30 ± 1,40	55,30 ± 1,80	60,05 ± 0,50	71,30 ± 3,09
	24	29,06 ± 0,40	44,06 ± 1,08	49,20 ± 1,01	60,60 ± 1,80
	48	29,60 ± 0,40	42,60 ± 1,01	47,07 ± 1,70	59,50 ± 2,30

Trametes versicolor polisakkaridi (TVP) *Lactobacillus acidophilus* gelişimini 48. saat sonunda % 0,25 oranında inulinden fazla, glukozdan az miktarda; *Lactobacillus plantarum* gelişimini % 0,25 oranında inulinden fazla, glukozdan az % 0,5 oranında inulinden az, glukozdan fazla etkilemiştir. *Escherichia coli* gelişimini ise tüm kontrol gruplarından az oranda teşvik etmiştir.



Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlardaki *Trametes versicolor* polisakkaritlerinin *Lactobacillus acidophilus* (a), *Lactobacillus plantarum* (b) ve *Escherichia coli*'nin (c) üremesine etkisi

Trametes versicolor dan ekstrakte edilmiş olan ve "Krestin" olarak adlandırılan polisakkaritler probiyotikleri aktive edici etkiye sahiptir (Aida vd., 2009). Pallav vd., (2014) insan mikrobiyotası üzerinde patojenlere karşı mücadelede 42. gün sonunda *Trametes versicolor*'dan ekstrakte edilmiş polisakkaritler ile antibiyotiklerin etkisini karşılaştırdığında yararlı bakteri sayısını arttırarak patojen bakteriyel mikrobiyotayı baskıladığı ve böylece zararlı bakterilere karşı antibiyotikler kadar etki ettiğini tespit etmiştir. Bu nedenle *Trametes versicolor* polisakkaritlerinin prebiyotik olarak etkin bir rol oynadığı düşünülebilir.

In vitro prebiyotik aktivite aşamasında elde edilen tüm verilerin birlikte değerlendirilmesinin bir sonucu olarak *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* ve *E. coli* glukoz ve inulin varlığında etkin biçimde üremiş, % 0,25 oranında kullanılan *Cantharellus cibarius* polisakkaridi *Lactobacillus plantarum* üremesini inulin kadar arttırmış, *Lactobacillus acidophilus* üremesini inulinden daha fazla arttırmıştır. *E. coli*'de ise *Cantharellus cibarius* polisakkaridi varlığında tüm oranlarda glukoz ve inulinden daha az büyüme gerçekleşmiştir. *Lactobacillus plantarum* üremesini % 0,25 oranında *Boletus edulis*, *Pleurotus ostreatus* ve *Trametes versicolor*'dan elde edilen polisakkaritler de glukoz ve inulinden daha fazla veya inulinle yakın miktarda arttırmıştır, ancak *Cantharellus cibarius* polisakkaridi kadar etkin olamamışlardır. *Lactobacillus acidophilus*'un üretilmesinde en başarılı makrofungus polisakkaridi yine % 0,25 oranında *Pleurotus ostreatus* ve ikinci başarılı polisakkarit olarak *Agaricus bisporus* olmuştur. *Cantharellus cibarius* polisakkaridi üçüncü olarak bunları takip etmiştir. Ancak *Pleurotus ostreatus* ve *Agaricus bisporus* polisakkaritleri varlığında bir patojen olan *E. coli*'de etkin biçimde ürediği için *Cantharellus cibarius* prebiyotik olarak kullanım potansiyeli açısından daha başarılı bulunmuştur.

Chen vd., (2017) yaptığı bir çalışmada *Cantharellus cibarius*'tan (% 19,31 L arabinoz, % 20,45 D mannoz, % 37,67 D glikoz ve % 22,54 D galaktoz verim ile) polisakkarit elde etmiştir. Ayrıca *Cantharellus cibarius* polisakkaritleri diğer Basidiomycota türleri gibi β-glukan içerir. Bu β-glukanın antioksidan ve antikanser etkisinin olduğu, DNA hasarını önlediği, karsinojenlerin konsantrasyonunu düşürdüğü ve apoptozisi azalttığı ifade edilmektedir (Muszynska vd., 2016). Buna karşın Vazouez vd. (2017) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada *C. cibairus*'tan β-glukan izolasyonu gerçekleştirilemediği ifade edilmektedir.

Elde edilen verilerin genel değerlendirmesi ile *C. cibarius* türü tarafından üretilen polisakkarit fraksiyonunun *in vivo* aşamada kullanılmasına karar verilmiştir.

Çalışmada kullanılan makrofungus ve kontrol gruplarının test mikroorganizması olarak kullanılan bakteri türlerinin (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Escherichia coli*' nin *in vitro* üremesi üzerine etkisine ilişkin veriler sırası ile Çizelge 4.11, 4.12 ve 4.13'de sunulmuştur. Verilerin istatistiksel analizinde üç-yönlü varyans analizinden yararlanılmıştır. Bu yaklaşım kullanılarak, deney grupları arasındaki anlamlı farklılıkların belirlenmesinde, kullanılan dozlar (% 2,1,0.5 ve 0.25) ve inkübasyon sürelerinden (8, 24,48 saat) kaynaklanan farklılıklar kontrol altına alınmıştır. Böylece her bakterinin üremesini arttıran ya da azaltan makrofungusların belirlenmesi ve kontrol grupları ile istatistiksel olarak karşılaştırılması hedeflenmiştir.

Çizelge 4.11. Deney ve kontrol gruplarının *Lactobacillus plantarum* bakterisinin üremesi üzerine etkisi (Ortalama (RNU / 1000) ± Standart Sapma)

Deney Grubu	**RNU**
Agaricus bisporus (B)	55,86 ± 11,85 ad
Agaricus bisporus (K)	24,48 ± 17,92 b
Boletus edulis	46,39 ± 17,84 c
Cantharellus cibarius	58,47 ± 12,36 d
Ganoderma lucidum	12,70 ± 9,59 e
Pleurotus ostreatus	59,24 ± 11,38 d
Trametes versicolor	50,41 ± 16,23 ac
Glukoz (Negatif kontrol)	53,61 ± 13,10 ad
Inulin (Pozitif kontrol)	71,43 ± 13,11 f

* Aynı harflerin kullanımı, istatistiksel anlamda benzerliği ifade etmektedir.

Çizelge 4.12. Deney ve kontrol gruplarının *Lactobacillus acidophilus* bakterisinin üremesi üzerine etkisi (Ortalama (RNU / 1000) ± Standart Sapma)

Deney Grubu	**RNU**
Agaricus bisporus (B)	40,99 ± 14,82 a
Agaricus bisporus (K)	14,52 ± 18,36 b
Boletus edulis	31,34 ± 11,05 c
Cantharellus cibarius	44,04 ± 8,30 ad
Ganoderma lucidum	11,52 ± 14,60 b
Pleurotus ostreatus	53,11 ± 16,01 e
Trametes versicolor	34,67 ± 8,98 c
Glukoz (Negatif kontrol)	60,47 ± 9,97 f
Inulin (Pozitif kontrol)	48,37 ± 7,02 de

* Aynı harflerin kullanımı, istatistiksel anlamda benzerliği ifade etmektedir.

Çizelge 4.13. Deney ve kontrol gruplarının *Escherichia coli* bakterisinin üremesi üzerine etkisi (Ortalama (RNU / 1000) ± Standart Sapma)

Deney Grubu	**RNU**
Agaricus bisporus (B)	26,80 ± 19,69 ac
Agaricus bisporus (K)	20,68 ± 16.09 a
Boletus edulis	50,14 ± 16,84 bd
Cantharellus cibarius	31,17 ± 20,61 c
Ganoderma lucidum	6,47 ± 7,38 e
Pleurotus ostreatus	67,29 ± 12,61 f
Trametes versicolor	48,57 ± 13,03 b
Glukoz (Negatif kontrol)	59,74 ± 13,62 df
Inulin (Pozitif kontrol)	67,05 ± 9,86 f

* Aynı harflerin kullanımı, istatistiksel anlamda benzerliği ifade etmektedir.

Lactobacillus plantarum bakterisinin verileri incelendiğinde, bakterinin üremesini pozitif kontrol olarak kullanılan inulin kadar arttıran bir mantar belirlenememiştir. Hiçbir makrofungus polisakkariti ile elde edilen RNU değeri, inulin ile istatistiksel bir benzerlik göstermemiştir. Ancak *Agaricus bisporus* (Beyaz form), *Cantharellus cibarius* ve *Pleurotus ostreatus* türlerinden elde edilen polisakkaritlerin negatif kontrol olarak kullanılan glukozdan daha yüksek bir üreme değeri sunması dikkat çekici ve ümit verici bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. *Lactobacillus acidophilus* bakterisinin üremesi ise *Cantharellus cibarius* ve *Pleurotus ostreatus* polisakkaritleri tarafından inulin kadar arttırılabilmiştir. Diğer taraftan üremesinin azaltılması beklenen bir bakteri olan *Escherichia coli* bakterisinin en düşük üreme değerleri sırası ile *Ganoderma lucidum*, *Agaricus bisporus* (Kestane formu), *Agaricus bisporus* (Beyaz form), ve *Cantharellus cibarius* türlerinden elde edilen polisakkaritler ile elde edilmiştir.

Elde edilen tüm verilerin birlikte değerlendirilmesi ile *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus acidophilus* bakterilerinin üremesini arttıran ve *Escherichia coli* bakterisinin üremesini azaltan bir mantar olarak *Cantharellus cibarius* türü dikkat çekmektedir. Ayrıca bu mantarın prebiyotik aktivitesine ilişkin herhangi bir çalışma göze çarpmamaktadır. Bu nedenlerle *in vivo* prebiyotik aktivite aşamasında araştırma materyali olarak *Cantharellus cibarius* türü seçilmiştir.

4.3. Seçilen makrofungus polisakkaridinin *in vivo* prebiyotik aktivitesinin araştırılması

4.3.1. Hayvanlara ait genel inceleme parametreleri

4.3.1.1. Büyüme performansları

Çalışma boyunca tüm deney hayvanlarında kullanılan sıçanlarda herhangi bir ölüm görülmemiştir. Mohd Din vd. (2012) tarafından önerilen formül ile hesaplanan spesifik büyüme oranları (SBO) Çizelge 4.14'de gösterilmiştir. Bu formülde sıçanların son ağırlıklarından ilk ağırlıkları çıkarılarak spresifik büyüme oranı hesaplanmıştır. Çalışmada kullanılan *C. cibarius* polisakkaritlerinin (CCP) sıçanların spesifik büyüme oranlarını olumlu etkilediği görülmüştür.

Çizelge 4.14. Spesifik büyüme oranları

Deney Grupları	Spesifik Büyüme Oranları (SBO) (%)
Kontrol	2,95
Deney	3,42
Pozitif kontrol	2,52

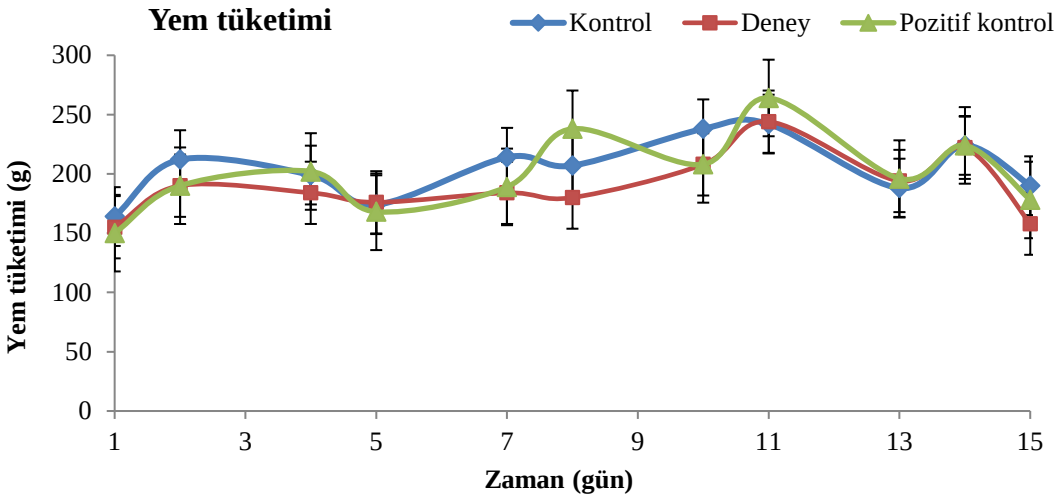
Mohd Din vd. (2012) tatlısu çipuralarını belirli dozda bazı makrofunguslar ile beslemişler ve spesifik büyüme oranını araştırmışlardır. Deney gruplarında % 1,0, 1.5 ve 2,0 oranında mantar ile beslenen balıklarda spesifik büyüme oranı (SBO) sırası ile % 1,74, % 1,65 ve % 1,63 olarak belirlenmiştir.

Mansur-ud-Din Ahmad'ın (2016) yaptığı bir çalışmada 28 gün boyunca galaktooligosakkarit ile diyet uygulaması yapılmış ve kontrol ile deney grubundaki sıçanların vücut ağırlığında istatistiksel bir fark bulunmamıştır. Başka bir çalışmada ise *Agaricus bisporus* ile hindilere yapılan diyet uygulaması sonucunda, hindilerin büyüme performansında olumlu artış görülmüştür (Giannenes vd. 2010). Buna benzer çalışmalar fare, sıçan, tavşan ve insanda yapılmış ve benzer sonuçlara rastlanılmıştır. Diğer taraftan domuzlara uygulanan *Ganoderma lucidim* diyetinde 4. hafta sonunda büyüme

performansında pozitif etki bulunmuştur (Chen vd. 2008). Başka bir çalışmada mayalardan ekstrakte edilen β-glukanın 250 mg/kg takviyesi ile domuzların büyüme performansında olumlu sonuç elde edilmiştir (Nevel vd., 2012).

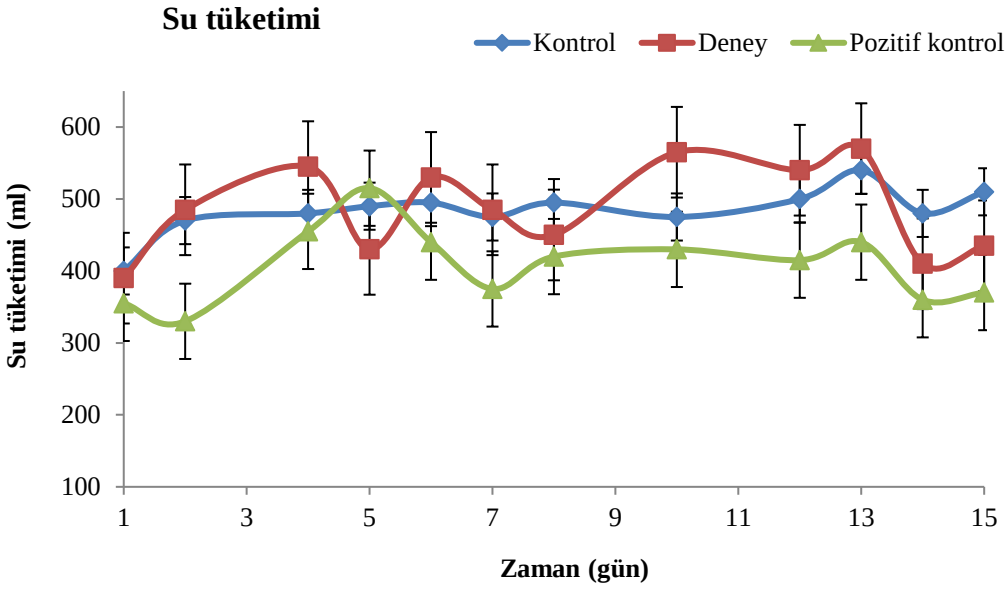
4.3.1.2. Yem ve su tüketim oranı

Çalışmamızda 15 gün süresince sıçanların yediği yem miktarı terazi ile tartılarak ölçülmüştür. Her üç grupta da 1. günden 15. güne kadar yakın miktarda yem tüketimi olmuştur. Sıçanların yem tüketimi Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Sıçanların yem tüketim miktarı

Sıçanların yem tüketiminin yanı sıra su tüketim oranı da takip edilmiştir. Yem tüketimi ile benzer bir sonuç olarak su tüketiminde de her üç grup için 1. ve 15. günler arasında çok fazla bir oranda değişim olduğu görülmemiştir. Su tüketim miktarları Şekil 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Sıçanların su tüketim miktarı

Toghyani vd. (2012) *Pleurotus ostreatus*'un 42 gün diyet sonucunda piliçlerde büyüme performansı, humoral bağışıklık ve kan parametreleri üzerine etkisini araştırmıştır. Çalışmada vücut ağırlığında istatistiki bir fark bulanamamıştır. Aynı şekilde yemden yararlanma açısından da istatistiki bir fark tespit edilememiştir.

Evrensel (2009) tarafından broyler rasyonlarında organik asit ve prebiyotik kullanılmasının yem tüketimi ve besi performansı üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada yem tüketimi ve yemden yararlanma oranında istatistiki fark bulunmamıştır.

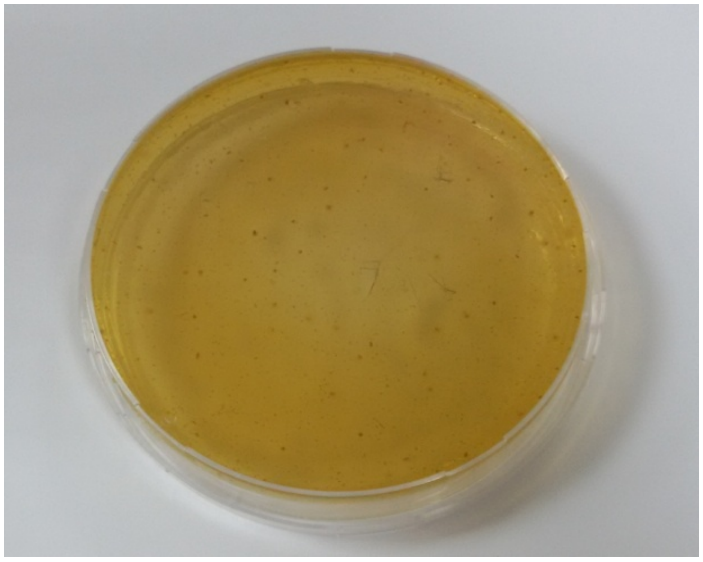
Bayırbağ (2007) yaptığı bir çalışmada piliçlerin yemine maya kültürü (*Saccharomyces cerevisiae*) ve prebiyotik (maltooligosakkarit) eklemiş ve yem tüketim miktarına bakmıştır. Ayrıca canlıların tükettiği ortalama yem miktarı ortalama canlı ağırlıklarına bölünerek yemden yararlanma oranı tespit edilmiştir. Bulgularında istatistiki anlamda bir farklılık görülmemiştir.

Tüm bu sonuçlar çalışmamız ile benzer bulgular içermektedir. İlave edilen prebiyotik takviyesi yem ve su tüketiminde herhangi bir belirgin fark yaratmamıştır.

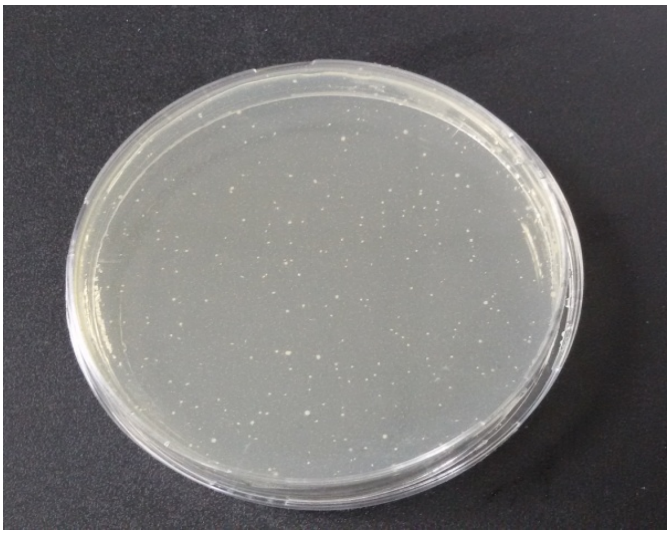
4.3.2. Mikrobiyolojik inceleme parametreleri

4.3.2.1. Barsağın ileum-çekum kısmında bakteri sayımı

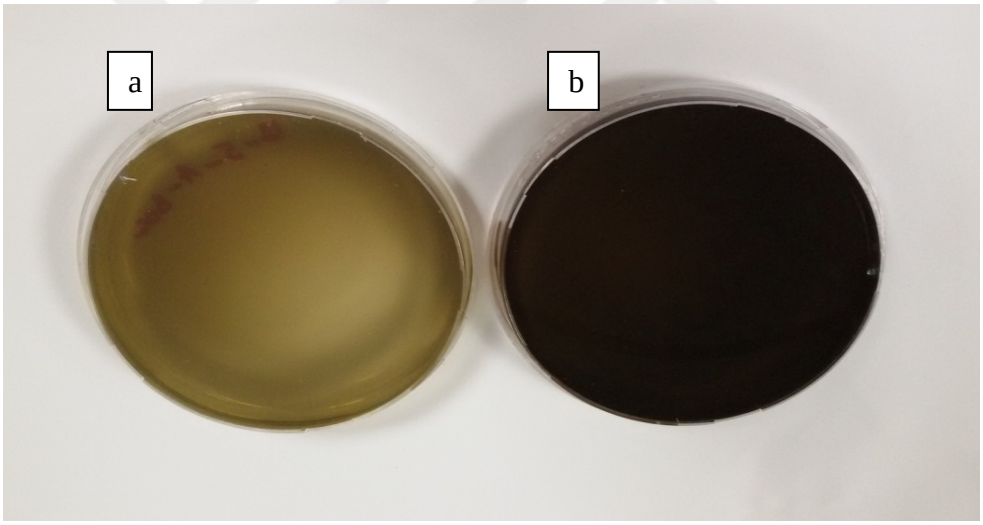
Farklı dozlarda *Cantharellus cibarius* polisakkaridi (CCP) ile beslenen sıçanların bağırsak örneklerinde saptanan bakteri populasyonu sayımı Çizelge 4.12'de sunulmuştur. *In vitro* yapılan çalışma ile aynı şekilde pozitif kontrol grubu olarak inulin kullanılmıştır. Çalışmamızda CCP ile beslenen sıçanların bağırsak mikrobiyotasındaki yararlı bakteri gruplarının sayısının (*Lactobacillus* sp. ve *Bifidobacterium* sp.) pozitif ve negatif kontrol gruplarına göre farklı olduğu görülmüştür. Yararlı bakterilerin CCP takviyesi ile daha fazla artış sağlamış olması mikrobiyal biyota üzerinde CCP'nin prebiyotik bir etkisi olduğunu ifade etmektedir. Aynı zamanda CCP varlığında patojen bakteri grubu olan *Clostridium* sp.'de en az artış görülmesi de bu sonucu destekler niteliktedir. Bu nedenle CCP'nin 15 gün sürede prebiyotik aktivitede önemli düzeyde etkili olduğu söylenebilir. *Bacteroides* sp.'de CCP takviyesi ile kontrol gruplarına göre üreme azalması sağlanamamış, fakat yararlı bakterilere oranla her grupta daha az miktarda gerçekleşmiştir. Bu nedenle *Bacteroides* spp. üremesinde üç deney grubunda da fark olmamıştır. Şekil 4.12 - 4.15'de seçici besiyerlerinde bahsedilen bakteri cinslerinin koloni özellikleri sunulmuştur.



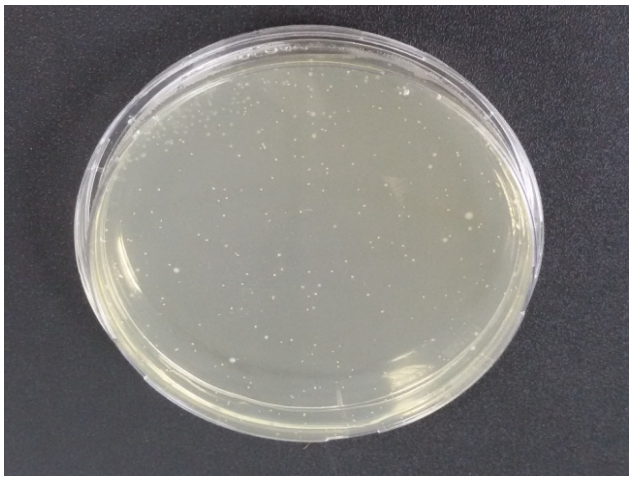
Şekil. 4.12. *Lactobacillus* sp.'nin MRS besiyerinde koloni morfolojisi



Şekil. 4.13. *Bifidobacterium* sp.'nin Bifidobacterium Agar besiyerinde koloni morfolojisi



Şekil. 4.14. *Bacteroides* sp.'nin Bacteroides Bile Esculin Agar besiyerinde koloni morfolojisi: a) Steril Bacteroides Bile Esculin Agar besiyeri, b) *Bacteroides* sp. varlığında Bacteroides Bile Esculin Agar besiyeri



Şekil. 4.15. *Clostridium* sp.'nin Reinforced Clostridial Agar besiyerinde koloni morfolojisi

Oyetayo ve Oyetayo (2005) *Rattus norvegicus* deney hayvanlarında 28 gün boyunca *Pleurotus sajor-caju* ve *Lactobacillus fermentum* OVL ile diyet uygulaması yaparak bağırsak florasında prebiyotik etkisini araştırmışlardır. Kontrol grubundaki *Lactobacillus sp.* kob/g olarak deney grubuna göre daha az gelişim göstermiştir. Kontrol grubunda 0. günde 6,87 kob/g, 28. günde ise 6,81 kob/g iken; deney grubunda 0. günde 6,90 kob/g olan bakteri florası 28. günde 7,32 kob/g olmuştur. Ancak sonuçlar farklı olsa da istatistiksel bir fark görülmemiştir. Çalışmamızda 15. gün sonunda negatif kontrolde 1,60 kob/ml ve pozitif kontrolde 1,58 kob/ml olan bakteri gelişimi deney grubumuzda 1,84 olarak bulunmuştur. Yani çalışmamızda da bu sonuca benzer olarak *Lactobacillus* spp. sayısında kontrol ve pozitif kontrol grubuna göre artış olmuş ancak istatistiksel fark oluşmamıştır (Çizelge 4.15). *Bifidobacterium* spp. ve *Bacteroides* spp. sayısında da benzer bir durum söz konusudur. İstatistiksel olarak farkın oluştuğu tek inceleme parametresi *Clostridium* spp. sayısıdır. CCP, bu cinse ait bakterilerin sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olmuştur.

Çizelge 4.15. Deney ve kontrol gruplarında bakteri koloni sayısı (Ortalama (kob/ml) ± Standart Sapma)

Deney Grupları	***Lactobacillus* sp. (Kob/ml×10^9±std)**	***Bifidobacterium* sp. (Kob/ml×10^9±std)**	***Bacteroides* sp. (Kob/ml×10^9±std)**	***Clostridium* sp. (Kob/ml×10^9±std)**
Kontrol	1,60 ± 0,41 a	5,53 ± 1,01 a	0,02 ± 0,00 a	0,09 ± 0,00 a
Deney	1,84 ± 0,46 a	7,58 ± 1,70 a	0,03 ± 0,00 a	0,03 ± 0,00 b
Pozitif kontrol	1,58 ± 0,69 a	6,19 ± 3,60 a	0,03 ± 0,00 a	0,06 ± 0,00 c

* Aynı harflerin kullanımı, istatistiksel anlamda benzerliği ifade etmektedir.

Oyetayo ve Oyetayo (2005) yaptıkları çalışmada zararlı bakteri türü olarak *E. coli*'yi seçmişlerdir. Kontrol grubunda bakteri sayısı 0. günde 6,87 kob/g, 28. günde 6,78 kob/g, deney grubunda ise 0. günde 6,93 kob/g ve 28. günde 6,44 kob/g olarak bulunmuştur. Az da olsa *E. coli*'nin azalışı olumlu bir prebiyotik etki yaratmıştır. Bu sonuç çalışmamız ile benzer durumda olup deneysel verilerimizi destekler niteliktedir. Çalışmamızda da Çizelge 4.12'de görüldüğü gibi *Bacteroides sp.* ve *Clostridium sp.'*de kob/ml cinsinden deney grubunda daha az bakteri gelişimi olduğu görülmektedir.

Diğer birçok makrofungus türü (*Agaricus bisporus, Trametes versicolor, Ganoderma lucidium, Pleurotus ostreatus-OVL*) ile yapılan *in vivo* prebiyotik aktivite çalışmaları mevcuttur. Morishita vd. (2002) 7 hafta boyunca farelere prebiyotik kaynağı olarak % 5 GOS (galaktooligosakkarit) ve *Bifidobacterium* vermiştir. Deney sonucunda farelerin bağırsak florasındaki bakteri gelişimi sırasıyla kontrol ve deney grubunda *E. coli* 9,4 kob/g; 10,2 kob/g, *Clostridium perfringens* 8,9 kob/g; 5,3 kob/g, *Bacteroides vulgatus* 10,3 kob/g; 10,5 kob/g *Lactobacillus salivarius* 6,5 kob/g; 7,7 kob/g, *Bifidobacterium breve* 7,5 kob/g; 10,2 kob/g olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre çalışmamızla benzer olarak zararlı bir bakteri olan *Clostridium perfringens*'te sayısal azalış ve yararlı probiyotik bakteriler olan *Lactobacillus salivarius* ile *Bifidobacterium breve*'de ise artış meydana gelmiştir.

Literatürde *Cantharellus cibarius* polisakkaridinin prebiyotik aktivitesi ile ilgili yapılan *in vitro* ve *in vivo* bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Çalışmamız bu anlamda ilk olması nedeni ile de önem taşımaktadır. Ancak bazı çalışmalarda etil asetat, aseton,

kloroform, ve etanol ekstraktı test edilmiş ve bu ekstraktın bazı Gram (-) ve Gram (+) bakterilere, mayalara ve aktinomisetlere karşı antimikrobiyal aktivitesi olduğu bulunmuştur (Muszynska vd., 2016). *Cantharellus cibarius'*un su ile ekstraktına karşı *Staphylococcus aureus, E. coli* ve *Candida albicans*'ın duyarlı olduğu bulunmuştur. Ayrıca bu literatürde *C. cibarius* sporokarplarının ekstraktlarının insan tip A eritrositlerine yapışan lektin (karbonhidratlara bağlanan bir protein) içerdiği bildirilmiştir (Muszynska vd., 2016).

Kozarski vd. (2015) *Cantharellus cibarius'*un metanolik ekstraktının disk difüzyon metodunu kullanarak antibakteriyal etkisini araştırmışlardır. Elde edilen metanol ekstraktının içeriğinde glikozitler, fenoller, flavanoyitler, steroller, taninler ve terpenoyitler gibi fitokimyasallara rastlanılmıştır. Ayrıca 30,4 mg g^{-1} karbonhidrat, 9,3 mg g^{-1} protein, 49,8 mg g^{-1} fenol, 42,9 mg g^{-1} flavonoyit, 1,0 mg g^{-1} askorbik asit, 194,5 mg g^{-1} β-karoten ve 112,2 mg g^{-1} likopen içeriği tespit edilmiştir. Bu bileşenlere sahip ekstrakt ile antibakteriyel etki Gram pozitiflerden *Staphylacoccus aureus, Enterococcus faecalis, Bacillus cereus* ve *Listeria monocytogenes* bakterilerine karşı, Gram negatiflerden ise *Escherichia coli, Salmonella enteritidus Shigella sonnei* ve *Yersinia enterocolitica*'ya karşı test edilmiştir. En fazla antimikrobiyal etki *Enterococcus faecalis*'e karşı olmuştur. Çalışmamız ile benzer olarak kullanılan *Escherichia coli* (ATCC 25922) suşuna karşı ise kontrol gruplarına göre çok az bir antimikrobiyal etki tespit edilmiştir. Bu da metanol ekstraktı içeriğinin elde ettiğimiz polisakkarit fraksiyonuna karşı daha az antibakteriyel etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Zavastin vd. (2016) *Cantharellus cibarius'*un etanolik ekstraktının antimikrobiyal ve antifungal etkisi araştırmışlardır. Gram pozitif bakterilerden *Sarcina lutea* ve *Staphylacoccus aureus*'a karşı, Gram negatiflerden ise *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* kullanılmıştır. En iyi antimikrobiyal etki Gr (+)'lerden *Sarcina lutea*'ya karşı olmuştur. Gr (-)'lerden ise en iyi antimikrobiyal etki çalışmamızda da kullanılan *Escherichia coli*'nin ATCC 25922 suşuna karşı gerçekleşmiştir. Bu sonuç çalışmamızın sonuçları ile benzer olup *Cantharellus cibarius'*un antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu destekler niteliktedir.

4.3.2.2. Prebiyotik indeksin hesaplanması

Prebiyotik indekste yararlı bakterilerin artışı olumlu, patojenlerin artışı ise olumsuz olarak değerlendirilmektedir. Yararlı bakteri sayısından patojenlerin sayısı çıkarılarak indeks hesaplaması yapılmıştır. Elde edilen veriler Çizelge 4.16'da sunulmuştur. Prebiyotik indeksin yüksek olması prebiyotik aktivitenin olumlu etkisi ile doğru orantılıdır. Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre en yüksek prebiyotik indeks deney grubunda görülmüştür. Bu sonuç da CCP'nin prebiyotik etkisinin olduğunu destekler niteliktedir.

Çizelge 4.16. Deney ve kontrol gruplarının prebiyotik indeks değerleri

Deney Grupları	Prebiyotik indeks
Kontrol	2,01
Deney	9,39
Pozitif kontrol	7,74

Mandalari vd. (2007) bergamot oligosakkaritleri (BOS) ve fruktooligosakkaritlerin (FOS) prebiyotik etkisini araştırmışlardır. Çalışmada BOS fraksiyonlarının en iyi prebiyotik indeksi 6,90 ve FOS'un ise 6,12 olduğu bulunmuştur. Bu sonuç çalışmamızdaki deney ve pozitif kontrol prebiyotik indeksine yakın değerdedir.

Mandalari vd. (2008) yapmış oldukları başka bir çalışmada bademin prebiyotik etkisini araştırmışlardır. Deney grubunda prebiyotik indeksi 6,36, pozitif kontrol grubu olan fruktooligosakkaritte ise 3,49 olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubunda ise bu değer çok düşük olup 2 civarında olduğu belirtilmiştir. Bu sonuç çalışmamızdaki kontrol grubunun prebiyotik indeks değeri ile hemen hemen aynıdır. Bademe göre CCP'nin daha fazla prebiyotik indeks değerine sahip olması prebiyotik etkisinin daha fazla olduğunu destekler niteliktedir.

4.3.3. Biyokimyasal inceleme

Çizelge 4.17'de sunulan verilere göre kan serumu parametreleri açısından gruplar arasında istatistiksel anlamda fark görülmemiştir.

Çizelge 4.17. Deney ve kontrol gruplarının biyokimyasal parametre değerleri (Ortalama ± Standart Sapma)

Deney grupları	Total kolesterol	HDL	LDL	Trigliserit	pH
Kontrol	53,50 ± 4,23 ab	54,07 ± 8,70 a	6,98 ± 0,79 a	54,07 ± 8,70 a	5,68 ± 0,09 a
Deney	56,50 ± 3,19 a	50,11 ± 14,27 a	7,43 ± 1,42 a	50,11 ± 14,27 a	5,52 ± 0,01 b
Pozitif kontrol	51,50 ± 3,57 b	43,43 ± 12,48 a	8,24 ± 1,64 a	43,43 ± 12,48 a	5,51 ± 0,02 b

* Aynı harflerin kullanımı, istatistiksel anlamda benzerliği ifade etmektedir.

Khatun vd. (2007) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada *P. ostreatus* mantarı ile yapılan prebiyotik takviyesinde kanda kolesterol seviyesi düşük bulunmuştur.

Bir başka çalışmada bir prebiyotik çeşidi olan maltooligosakkarit (MOS) takviyesinde yararlı bakteri grubu olan *Lactobacillus* spp. gelişiminde artış, trigliserit oranında ise düşüş görülmüştür (Van Loo vd., 2004). Bu bakteriler asetil koenzimA karboksilaz aktivitesini düşürerek lipid sentezini azaltırlar ve serumda trigliserit düşüşüne neden olurlar (Toghyani vd., 2007).

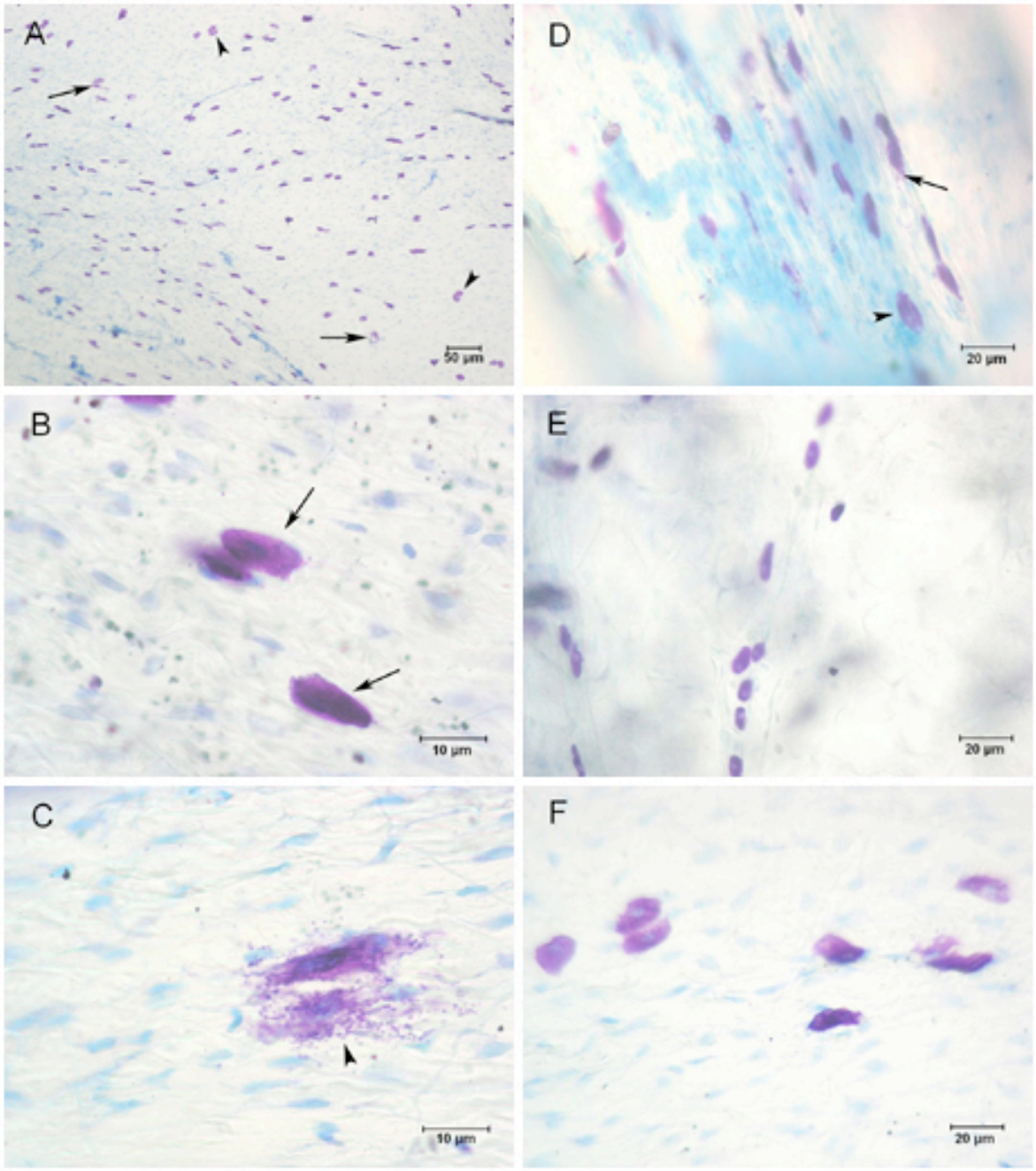
Bu verilerden farklı olarak kitooligosakkarit takviyesi ile beslenen piliçlerin serum örneklerinde total kolesterol ve LDL kolesterolde fazla bir değişiklik olmadığı görülmüştür (Zhou vd. 2009). Çalışmanın bulguları, bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir. Yani tüm bu verilere göre çalışmamızdaki total kolesterol, HDL, LDL, trigliserit ve pH değerlerinde sayısal anlamda farklar görülse de istatistiki olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. O nedenle CCP'nin bu parametrelere etkisi olduğu söylenemez.

4.3.4. Histolojik inceleme

Mast hücrelerinin granül türü dikkate alınmaksızın toluidin mavisi ile boyanarak hazırlanmış olan mesenter doku preparatlarında ışık mikroskobik incelemeler yapılarak

genel ve daha geniş görüntü alanlarında incelenmiştir (Şekil 4.16 A). Daha detaylı mikroskobik incelemeler sonucunda granüle mast hücreleri (Şekil 4.16 B) ve degranüle mast hücreleri (Şekil 4.16 C) ayırt edilebilmiştir. Sadece standart pellet yem ile beslenen negatif kontrol grubu hayvanlarının mesenter dokularında tespit edilmiş olan mast hücreleri (Şekil 4.16 D) ile inulin takviyesi yapılarak beslenen pozitif kontrol grubu hayvanlarda tespit edilen mast hücrelerinin (Şekil 4.16 F) görsel olarak büyüklükleri benzer bulunurken, *Cantharellus cibarius* polisakkaridi (CCP) takviyesi yapılarak beslenen deney grubuna ait hayvanların mesenterik mast hücreleri (Şekil 4.16 E) aynı büyütme oranlarında incelenmiş olmasına rağmen her iki kontrol grubuna göre daha küçük boyutlarda gözlenmiştir. Histolojik incelemelerde diğer mast hücre morfolojileri açısından gruplar arasında görsel farklılık tespit edilmemiştir.

Toplam mast hücre sayıları ile bunun içinde yer alan toplam degranüle mast hücre sayılarının ortalama±standart sapma değerleri Çizelge 4.18'de gösterilmiştir. Elde edilen bu verilere göre, toplam mast hücresi sayısı bakımından kontrol grupları rakamsal olarak benzer bulunurken deney grubunda bu sayının daha fazla olduğu bulunmuştur. Ancak bu rakamsal farklılık, istatistiksel anlamda her üç grubun da toplam mast hücre sayısı bakımından benzer olduğunu göstermiştir. Toplam degaranülize mast hücre sayısı bakımından her nekadar pozitif kontrol grubunda diğer gruplara göre rakamsal olarak artış gözlenmiş olsa da istatistik olarak bir fark bulunmamıştır.



Şekil 4.16. Mesenter dokuda yayılım gösteren granüle (→) ve degranüle (➤) mast hücrelerinin genel görünümü (A); granüle mast hücreleri (B); degranüle mast hücreleri (C); negatif kontrol grubu (D); CCP deney grubu (E) ve pozitif deney grubu (F) hayvanlarının mesenter dokularında tespit edilmiş olan mast hücreleri

Çizelge 4.18. Deney ve kontrol gruplarının histolojik parametre değerleri (Ortalama ± Standart Sapma)

Deney Grupları	Toplam mast hücre sayısı	Toplam degranüle mast hücre sayısı
Kontrol	14,10 ± 6,66 a	3,75 ± 2,12 a
Deney	21,36 ± 11,95 a	2,81 ± 2,65 a
Pozitif kontrol	15,02 ± 4,26 a	6,06 ± 4,16 a

* Aynı harflerin kullanımı, istatistiksel anlamda benzerliği ifade etmektedir.

Histolojik incelemelerden elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, 15 günlük deney süresince CCP takviyesi yapılarak gerçekleştirilen beslenme rejiminin, sıçanların mesenterik mast hücre sayıları ve bu hücrelerin degranüle olmaları üzerinde etkili olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu sonuç, yaptığımız deney süresi içinde CCP'nin mast hücreleri üzerinde herhangi bir patolojik olguya neden olmadığını göstermiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda 6 farklı makrofungus türüne ait 7 suştan polisakkarit eldesi gerçekleştirilmiş ve bu polisakkaritlerin prebiyotik olarak kullanım potansiyeli *in vitro* ve *in vivo* koşullarında araştırılmıştır. En yüksek polisakkarit ekstraksiyon verimliliğinin *Trametes versicolor* türüne ait olduğu tespit edilmiştir. Verim açısından bu makrofungus türünün zengin bir polisakkarit kaynağı olduğu anlaşılmıştır. En düşük verim ise *Ganoderma lucidum*'dan elde edilmiştir.

In vitro çalışmamızda *L. plantarum, L. acidophilus* ve *E. coli* glukoz ve inulin varlığında etkin biçimde üremiş, % 0.25 oranında kullanılan *Cantharellus cibarius* polisakkaridi *Lactobacillus plantarum* üremesini inulin kadar arttırmış, *Lactobacillus acidophilus* üremesini inulinden daha fazla arttırmıştır. *E. coli*'de ise *Cantharellus cibarius* polisakkaridi varlığında tüm oranlarda glukoz ve inulinden daha az büyüme gerçekleşmiştir. *Lactobacillus plantarum* üremesini % 0.25 oranında *Boletus edulis, Pleurotus ostreatus* ve *Trametes versicolor*'dan elde edilen polisakkaritler de glukoz ve inulinden daha fazla veya inulinle yakın miktarda arttırmış, ancak *Cantharellus cibarius* polisakkaridi kadar etkin olamamışlardır. *Lactobacillus acidophilus*'un üretilmesinde en başarılı mantar polisakkaridi yine % 0.25 oranında *Pleurotus ostreatus* ve ikinci başarılı polisakkarit olarak *Agaricus bisporus* olmuştur, *Cantharellus cibarius* polisakkaridi üçüncü olarak bunları takip etmiştir. Ancak *Pleurotus ostreatus* ve *Agaricus bisporus* polisakkaritleri varlığında bir patojen olan *E. coli* de etkin biçimde ürediği için *Cantharellus cibarius* daha başarılı bulunmuştur.

Gerçekleştirilen bu *in vitro* çalışma sonucunda *Cantharellus cibarius* polisakkaritlerinin prebiyotik aktivitesinin diğer mantar türlerinden elde edilen polisakkaritlere oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. En yüksek prebiyotik aktiviteye sahip olduğu bulunan bu makrofungus türü ile *in vivo* yapılan çalışmada da başarılı sonuç elde edilmiştir. Bu açıdan *Cantharellus cibarius* türünün önemli bir prebiyotik kaynağı olabileceği değerlendirilmiştir.

Yaygın olarak tüketilen *Agaricus bisporus, Pleurotus ostreatus, Cantharellus cibarius, Trametes vercicolor* gibi makrofungus türleri ile prebiyotik etkiden yararlanılarak bağışıklık sistemi güçlendirilebilir. Aynı zamanda antibiyotikler ile yararlı bakteri mikrobiyotasını öldürmek yerine prebiyotikler kullanılarak zararlı bakterilerin gelişimi sınırlandırılabilir.

"Unutulmuş organ" olarak tanımlanan mikrobiyotanın insan sağlığı ve hastalıkları üzerinde önemli etkileri vardır.

İnsanlarda yapılan çalışmalarda vücut ağırlığı, vücut kompozisyonu, kanser mekanizması, bağırsak mikrobiyotası ve immün fonksiyonu üzerindeki etkilerin anlaşılmasına ihtiyaç vardır.

Mantar tüketicileri sadece prebiyotik etkiden değil ayrıca makrofungusların antikanser, antioksidan, antitümör, antibakteriyel özelliklerinden de yararlanmış olacaktır. Protein ve vitamin açısından da zengin olan makrofunguslar verimli bir besinsel kaynak oluşturmaktadır. Ancak makrofungusların sağlık üzerindeki etkisini anlamak için ne kadar ve ne sıklıkla makrofungus tüketmek gerektiğinin derinlemesine araştırılması gerekmektedir. Sonraki araştırmaların bu çalışma ile prebiyotik aktivitesinin belirlediğimiz *Cantharellus cibarius* türüne odaklanacağını umuyoruz.

İmmun sistemi teşvik etmesi nedeniyle mantar polisakkaritleri bulaşıcı hastalıkların tedavisinde kullanılabilir. Dahası bu bileşenlerin antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri vardır. Polisakkaritler hiperglisemi ve hiperkolesterolemiyi düzene sokmak ve önlemek için kullanılır. Mantar polisakkaritlerinin bağışıklığı harekete geçirici özellikleri mitojenik aktivite, proliferasyonu (çoğalma) arttırma ve bağışıklık sistemi hücrelerinin maturayonunu (olgunlaşması) sağlama etkisi vardır (Muszynska vd., 2016). Mantar β-glukanları cilt sağlığının tedavisinde ve kremlerde UV radyasyonundan cildi korumak için de kullanılmaktadır (Muszynska vd., 2016). β-glukanın daha önce de bahsedildiği üzere prebiyotik özelliğinin olması diyabeti, hipertansiyonu, kan pıhtılaşmasını ve damar tıkanıklığını önleme etkisi mevcuttur (Muszynska vd., 2016).

Bu çalışma kapsamında elde edilen veriler ışığında gelecekte bağırsak mikrobiyotası üzerine yapılması umulan çalışmalar;

1) Yararlı bağırsak mikrobiyotasının fonksiyonel bileşenlerinin analizi
2) Bağırsak mikrobiyotasının genomik analizi
3) Mikrobiyal populasyonun patolojik içeriğinin gastrointestinal sisteme etkisinin nasıl olduğu
4) Konukçu mikrobiyotanın immün sistem üzerine etkisini detaylandırma
5) Makrofungusların mikrobiyota dengesi ve sağlık üzerine etkisini araştırma
6) Mikrobiyomların ilaç toksisitesi ve farmakokinetik üzerine etkisini araştırma
7) Farklı diyet uygulamalarının mikrobiyal komüniteyi nasıl etkilediği

olarak sıralanabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Aida F., Shuhaimi M., Yazid M., Maaruf A., 2009, Mushroom as a Potential Source of Prebiotics: A review, Food Science and Technology, 567-575.

Al-Sheraji S. H., İsmail A., Manap M.Y., Mustafa S., Yusof. R. M., vd., 2013, Prebiotics as Fonctional Foods: A review, Journal of Fonctional Foods, 5, 1542-1553.

Altuntaş ve Batman, 2017, Mikrobiyota ve Metabolik Sendrom, Turk Kardiyol Dern Ars, 45 (3), 286-296.

Aryana K. J., Plauche S., Rao R. M., McGrew P., Shah N. P., 2007, Fat-free plain yohurt manufactured with inulins of various chain lengths and Lactobacillus acidophilus, Journal of Food Science, 72, 79-84.

Bayırbağ D., 2007, Broyler rasyonlarında maya kültürü ve prebiyotik kullanılmasının besi performansı ve bazı kan parametreleri üzerine etkisi, Doktora tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 20 s.

Bederska D., Swiatkiewicz S., Muszynska B., 2017, The use of Basidiomycota Mushrooms in Poultry Nutrition-A review, Animal Feed Science and Technology, 59-69.

Bhakta M., Kumar P., 2013, Mushroom Polysaccharides as a Potential Prebiotics, International Journal of Health Sciences and Research, 2249-9571.

Bozena vd., 2013, Edible Mushrooms in Prophylaxis and Treatment of Human Diseases, Medicina Internacia Revuo, 25-a, 4 (101).

Caleffi E. R., Krausova G., Hryslova I., Parades L., Santos M., vd., 2015, Isolation and prebiotic activity of inulin type fructan extracted from *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen roots, International Journal of Biological Macromolecules, 80, 392-399.

Chen S. D., Hsieh M. G., Chiou M. T., Lai Y. S., Cheng Y. H., vd., 2008, Effects of fermentation products of *Ganoderma lucidum* on growth performance and immunocompetence in weanling pigs, Archives of Animal Nutritions, 62:1, 22-32.

Chen vd., 2017, Purification and Structural Characterization of a Novel Water –Soluble Neutral Polysaccharide from *Cantharellus cibarius* and Its Immunostimulating Activity in RAW264.7 Cells, International Journal of Polymer Science, 30744915.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Chen J., Lai P., Shen H., Zhen H., Fang R., 2013, Effect of Extraction Methods on Polysaccharide of *Clitocybe maxima* Stipe, Advance Journal of Food Science and Technology, 5(3), 370-373.

Cheung C. K., 2013, Mini-review on edible mushrooms as source of dietary fiber Preparation and health benefits, Food Science and Human Wellness, 2, 162-166.

Chou W., Sheih I., Fang J., 2013, The Applications of Polysaccharides from Various Mushroom Wastes as Prebiotics in Different Systems, Journel of Food Science, 78, 7.

Clarke SF, Murphy EF, O'Sullivan O, Lucey AJ, Humphreys M, Hogan A, 2014, Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. Gut, 63:1913–20.

Din A. R. J. M., Razak S. A., Sabaratnam V., 2012, Effect of Mushroom Supplementation as a Prebiotic Compound in Super Worm Based Diet on Growth Performance of Red Tilapia Fingerlings, Sains Malaysiana, 41 (10) 1197-1203.

Evrensel M.F., 2009, Broyler Rasyonlarında Organik Asit ve Prebiyotik Kullanılmasının Besi Performansı ve Bazı Kan Parametreleri Üzerine Etkisi, Doktora tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 10 s.

Ezeonu M. Akobueze E. U., Chah K.F., 2012, Prebiotics Effects of *Vernonia amygdalina* and *Ocimum gratissimum* aqueous leaf extract in rabbit, African Journal of Biotechnology, 11(10), 2537-2547.

Ferrao J., Calabrese V., Pimental L., Pintado M., Fernandes TH., 2017, Impact of Mushroom on Microbiota and Potential for Preventative Health, Journel of Food and Nutrition Research, 5, 226-233.

Finger S., Wiegand C., Buschmann H-J., Hipler U-C., 2012, Antimicrobial properties of cyclodextrin-antiseptics-complexes determined by microplate laser nephelometry and ATP bioluminescence assay, International Journal of Pharmaceutics, 439, 851-856.

Fyzul A., Harbi AH., Austin B., 2014, Review:Development in the use of probiotics for disease control in aquaculture, Aquaculture, 431, 1-11.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Gevers D., 2012, The Human Microbiome Project: A Community Resource for the Healthy Human Microbiome, PLOS/Biology, 10, 1-5.

Giannenas J., Tontis D., Tsalie E., Chronis E. F., Doukas D., vd., 2010, Influence of dietary mushroom *Agaricus bisporus* on intestinal morphology and microbiota composition in broiler chickens, Research in Veterinary Science, 89, 78-84.

Gill R. S., Pop M., Deboy T., Eckburg B., Turnbaugh J. P. vd., 2013, Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome, Science, 312.

Han vd., 2013, Structure characterization and immunocompetence of a glucan from the fruiting bodies of *Cantharellus cibarius*, Journal of Asian Natural Products Research, 1028-6020, 1204-1209.

Holmes vd., 2011, Understanding the role of gut microbiome–host metabolic signal disruption in health and disease, Trends in Microbiology, 19,349-359.

Hoyles vd., 2018, Microbiome–host systems interactions: protective effects of propionate upon the blood–brain barrier, Microbiome, 6:55, 1-13.

Hozova B., Kuniak L., Kelemenova B., 2004, Application of β-D-glucans ısolated from Mushrooms *Pleurotus ostreatus* (Pleuran) and *Lentinula edodes* (Lentinan) for increasing the Bioactivity of Yoghurts, Czech J. Food Sci., 22, 204-214.

Jayachandran M., Xiao J., Xu B., 2017, A Critical Review on Health Promoting Benefits of Edible Mushrooms through Gut Microbiota, International Journal of Molecular Science, 18, 1934.

Khatun K., Mahtab B., Khanam P. A., Sayeed M. A., Khan K. A., 2007, Oyster mushroom reduced blood glucose and cholesterol in diabetic subject, Mymensingh Medical Journal, 16 (1), 94-99.

Kinross J., Darzi A., Nicholson J., 2011, Gut microbiome-host interactions in health and_disease, Genome Medicine, 3:14, 1-12.

Kip P., Meyer D., Jellema R. H., 2006, Inulins improve sensoric and textural properties of law fat yoghurts, International Dairy Journal 16, 1098-1103.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Krzyczkowski W., Malinowska E., Suchocki P., Kleps J., Olejnik M., vd., 2009, Isolation and quantitative determination of ergosterol peroxide in various edible mushroom species, Food Chemistry, 113, 351-355.

Kozarski vd., 2015, Nutraceutical properties of the methanolic extract of edible mushroom *Cantharellus cibarius* primary mechanism,Royal Society of Chemistry, 6, 1875-1886.

Liu vd., 2014, Prebiotic effects of almonds and almond skins on intestinal microbiota in healthy adult humans, Anaerobe, 26, 1-6.

Marchesi J. R., 2011, Human distal gut microbiome, Environmental Microbiology, 13(12), 3088–3102.

Mandalari vd., 2007, *In vitro* evaluation of the prebiotic activity of a pectic oligosaccharide-rich extract enzymatically derived from bergamot peel, Appl Microbial Biotechnol, 73, 1173-1179.

Mandalari G., Palop C., Bisignano G., Wickham M. S. J., Narbad A., 2008, Potential Prebiotic Properties of Almond (*Amygdalus communis* L.) Seeds, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 74, 4264-4270.

Mansur-ud-Din Ahmad K., 2016, Production of impure prebiotic galacto-oligosaccharides and their effect on calcium, magnesium, iron and zinc absorbtion in Sprague-Dawley rats, Pharma Nutrition, 16, 2213-2216.

Morishita Y., Oowada T., Ozaki A., Mizutani T., 2002, Galactooligosaccharide in combination with *Bifidobacterium* and *Bacteroides* affects the population of *Clostridium perfringens* in the intestine of gnotobiotic mice, Nutrition Research, 22, 1333-1341.

Muszynska vd., 2016, *Cantharellus cibarius* culinary medicinal mushroom content and biological activity, Acta Poloniac Pharmacceutica-Drug Research, 73, 589-598.

Nevel C. J., Decuypere J. A., Dierick N., Molly K., 2012, The influence of *Lentinula edodes* (shiitake mushroom) preparations on bacteriological and morphological aspects of the small intestine in piglets, Archives of Animal Nutrition, 57(6), 399-412.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Nyman A. A. T., Aachmann F. L., Rise F., Ballance S., Samuelsen A. B. C., 2016, Structural characterization of a branched (1_6) _α_mannan and β_glucans isolated from the fruiting bodies of *Cantharellus cibarius* Carbohydrate Polymers, 146, 197-207.

Oyetayo V. O., Oyetayo F.L., 2005, Preliminary study of the Health promoting potentials of *Lactobacillus fermentum* OVL and *Plerotus sajor caju* Administered to Rats, Pakistan Journal of Nutrition, 4 (2), 73-77.

Pallav K., Dowd S., Villafuerte J., Ynag X., Kabbani T., vd., 2014, Effects of Polysaccharopeptide from *Trametes versicolor* and Amoxicillin on the gut microbiome of healthy volunteers, Gut Microbes, 5, 458-467.

Pandiyan C., Villi A., Kumaresan G., Murugan B., Gopalakrishnamurthy T.R., 2012, *In vivo* and *in vitro* effect of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic ice cream enriched with whey protein concentrate, International Food Research Journal 19(2): 441-446.

Roberfroid M., 2002, Functional food concept and its application to prebiotics, Digestive and Liver Disease, 34, 105-110.

Rosello-soto vd., 2015, Application of Non-conventional Extraction Methods: Toward a Sustainable and Green Production of Valuable Compounds from Mushrooms, Food Eng Rev, 10.1007/s12393-015-9131-1.

Sadeghi A., Karimi A., Vaziry A., 2011, Effect of Oyster Mushroom (Pleurotus Ostreatus) with and without Probiotic on Growth Performance And Same Blood Parameters of Male Broilers, Animal Feed Science and Technology, 91-96.

Santoyo S., Anguiano A., Garcia L., Reglero G., Rivas C., 2012, Antiviral activities of *Boletus edulis*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes* extracts and polysaccharide fractions againtst Herpes simplex virus type 1, Journal of Food and Nutrition Research, 51, 225-235.

Selvi S., Umadevi P., Murugan S., Senapathy G. J., 2011, Anticancer potential evoked by *Pleurotus florida* and *Calocybe indica* using T24 urinary bladder cancer cell line, African Journal of Biotechnology, 10, 7279-7285.

Shreiner A., Kao J., Young V., 2015, The gut microbiome in health and in disease, NATIONAL OF HEALTH INSTITUTES, 31(1), 69-75.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Sharifuzzaman Sm., Austin B., 2017, Probiotics for Disease Control in Aquaculture, Diagnosis and Control of Disease of Fish and Shelfish, 10, 1002.

Singh ve Singh, 2010, Production of Fructooligosaccharides from Inulin by Endoinulinases and Their Prebiotic Potential, *Food Technol. Biotechnol. 48* (4) 435–450.

Singdevsachan K. S., Auroshree P., Mishra J., Baliyarsingh B., Tayung K., 2016, Mushroom polysaccharides as potential prebiotics with their antitumor and immunomodulating properties: A review, Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 7, 1-14.

So S., Wan M., El-Nezami H., 2016, Probiotics-mediated suppression of cancer, Wolters Kluwer Health, 29, 00.

Sousa V. Santos E., Sgarbieri V., 2011, The Importance of Prebiotics in Functional Foods and Clinical Practice, Food and Nutrition Science 2, 133-144.

Stearns vd., 2011, Bacterial biogeography of the human digestive tract, SCIENTIFIC REPORT,1:170, 1-9.

Synytsya A., Mickova K., Synytsya A., Jablonsky I., Spevacek J., 2009, Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity, Carbohydrate Polymers, 76, 548-556.

Tuohy M., Ziemer J., Klinder A., Knöbel Y., Gibson G., vd., 2002, A Human Volunteer Study To Determine The Prebiotic Effects Of Lactolose Powder On Human Colonic Microbiota, Taylor&Francis Health Science, 14: 165-173.

Toghyani M., Tohidi M., Gheisari A., Tabeidian A., Toghyani M., 2012, 9-Evaluation of Oyster Mushroom (Pleurotus Ostreatus) as a Biological Growth Promoter on Performance, Humoral Immunity, and Blood Characteristics of Broiler Chicks, The Journal of Poultry Science, 10, 2141.

Turnbaugh P. J., 2007, The Human Microbiome Project, NATURE, 449, 804-810.

Uyanoğlu vd., 2010, Effects of Some Macrofungi Exopolysaccharides on Mesenchymal Mast Cells of Rats in Chronic Alcohol Consumption, Int J Health Nutr 1 (1): 31-37.

Van Loo J. A., 2004 Prebiotics promote good health: the basis, the potential, and the emerging evidence, Journal of Clinical Gastroenterology, 38, 70-75.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Varım P., Vatan M., Varım C., 2017, Kardiyovasküler Hastalıklar ve Mikrobiyota, Journal of BSHR, 1, 141-147.

Vazouez vd., 2017, Phenolic acids, flavonoids, ascorbic acid, β-glucans and antioxidant activity in Mexican wild edible mushrooms, Ital. J. Food Sci., 29, 766-772.

Villares vd., 2012, Structural Features and Healthy Properties of Polysaccharides Occurring in Mushrooms, Agriculture, 2, 452-471.

Villmones vd., 2018, Species Level Description of the Human Ileal Bacterial Microbiota, Scıentıfic Report, 8:4736, 1-9.

Yousaf M. S., 2007, Effects Of Inluin And Oligofructose Fortification On The Physico-Chemical, Sensory And Functional Properties Of Clarfified Banana Juice, Doktora Tezi, Universiti Putra Malaysia, 9 s.

Zavastin vd., 2016, Studies on antioxidant, antihyperglycemic and antimicrobial effects of edible mushrooms *Boletus edulis* and *Cantharellus cibarius*, J. Plant Develop, 23, 87-95.