T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LİGNOSELÜLOZİK KSİLOOLİGOSAKKARİTLERİN KOLON KANSERİ HÜCRE HATTI ÜZERİNDE MOLEKÜLER ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

FATMANUR AYKÜL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler
Ana Bilim Dalı

NİSAN-2017
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LİGNOSELÜLOZİK KSİLOOLİGOSAKKARİTLERİN KOLON KANSERİ HÜCRE HATTI ÜZERİNDE MOLEKÜLER ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Fatmanur AYKÜL

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler
Ana Bilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Meryem KARA
2017, 72 Sayfa

Jüri
Doç. Dr. Hasibe VURAL
Yrd. Doç. Dr. Meryem KARA
Yrd. Doç. Dr. Saliha DİNÇ

Fonksiyonel gıdalar beslenme üzerinde sağlık açısından yararları olan gıda veya gıda bileşenleridir. Ksilooligosakkaritler (XOS), fonksiyonel gıdalarda aktif bileşen olarak yer almaktadırlarlar. Ksilooligosakkaritlerin gıdalara eklenmesi kolon kanseri ve kardiyovasküler hastalıkları önleme, kalsiyum emiliminde artış, diş çürümelerinde azalma, bağırsak fonksiyonlarında iyileşme gibi olumlu pek çok fayda sağlayabilmektedir. Bu araştırmanın amacı doğal kaynaklardan biyoteknolojik yollarla elde edilen ksiloolgosakkaritlerin insan sağlıklı epitel kolon hücresine model hücre CoN ve kolon kanserine model hücre Caco-2 üzerinde sitotoksik ve moleküler düzeyde etkilerini araştırmaktır.

Bu amaçla birinci aşamada kenevir kıymıklarından elde edilen ksilooligosakkaritlerden furfural ve hidroksimetil furfural (HMF)' nin uzaklaştırılması için nanofiltrasyon (NF), aktif karbon (AK) (Meck AC) adsorbsiyonu ve iyon değişim reçineleri (DOW-XUS 43578, Diaion CR11, Dowex-HCR W2, Purolite C160) kullanılmıştır. Ayrıca NF-AK ve NF-iyon değişim reçineleri hibrit sistemi de kullanılmıştır. Ksilooligosakkaritlerin antioksidan aktivitesini belirlemek için DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) metodu kullanılmıştır. DPPH ölçümleri 517 nm dalga boyunda ELISA okuyucu ile gerçekleştirilmiştir.

İkinci aşamada ise gerçek zamanlı hücre analiz sistemi xCELLigence kullanılarak sitotoksisite analizleri yapılmıştır. Ayrıca XOS' ların moleküler etkilerinin incelenmesi için farklı miktarlarda XOS (10 mg/ml, 5 mg/ml, 1.25 mg/ml) ile muamele edilmiş sağlıklı ve kanserli kolon hücrelerinden RNA izole edilmiş ve XOS'ların RT-PCR (Reverse transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu/ gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, Geri transkriptaz-PZR) yöntemiyle oksidatif stres ile ilgili NFE2L2 geninin ifadesinde etkisi olup olmadığı araştırılmıştır.

Nanofiltrasyon prosesinin HMF gidermede etkili olmadığı, ancak furfuralı neredeyse tamamen uzaklaştırdığı belirlenmiştir. HMF ve furfural uzaklaştırmada reçine ve aktif karbon uygulamalarının etkili olduğu tespit edilmiştir. Purolite C160 ve Dowex-HCRW2 reçinelerinin HMF ve furfural uzaklaştırmada etkili olmadığı, DOW XUS 43578, Diaion CR11 ve Merck aktif karbon ise verimli olduğu belirlenmiştir. Nanofiltrasyon ve aktif karbon proseslerinin birlikte düşünüldüğü hibrid sistem kullanımı ile HMF % 99.3 ve furfural % 100 oranında uzaklaştırılmıştır. Ksilooligosakkaritlerin DPPH süpürücü etkisi L-Askorbik asit ile karşılaştırılmıştır. XOS ve L-Askorbik asit için IC_{50} değerleri sırasıyla 122.29 µl/ml ve 12.01 µg/ml olarak ölçülmüştür.

CoN ve Caco-2 hücre modelleri ile yapılan hücre kültürü çalışmalarında XOS' un 5 mg/ml' den daha az olan konsantrasyonları sitotoksisite ve dublikasyon süresi bakımından güvenli bulunmuşlardır. XOS'ların artan doz miktarına göre CoN/NFE2L2 ve Caco-2/NFE2L2 gen ekspresyon seviyelerinde anlamlı artış ve azalışlar bulunmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Caco-2, CoN, fonksiyonel gıda, iyon değişim reçinesi, ksilooligosakkarit, NFE2L2, pürifikasyon

ABSTRACT

MS THESIS

DETERMINING THE MOLECULAR EFFECT OF LIGNOCELLULOSIC XYLOOLIGOSSACHARIDES ON COLON CANCER CELL LINE

FATMANUR AYKÜL

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN NANOTECHNOLOGY AND ADVANCED MATERIALS

Advisor: Assist. Prof. Dr. Meryem KARA

2017, 72 Pages

Jury
Assoc. Prof. Dr. Hasibe VURAL
Assist. Prof. Dr. Meryem KARA
Assist. Prof. Dr. Saliha DİNÇ

Functional foods are food or food ingredients that have health benefits over nutrition. Xylooligosaccharides (XOS) are present as active ingredients in functional foods. The addition of xylooligosaccharides to foods may provide many positive benefits such as prevention of colon cancer and cardiovascular diseases, increase in calcium absorption, decrease in tooth decay, improvement in bowel function. The aim of this research is to investigate the effects of xylooligosaccharides biotechnologically obtained from natural sources on model cell CoN to human healthy epithelial colon cell and on model cell Caco-2 to colon cancer cell at cytotoxic and molecular levels.

For this purpose, in the first step, nanofiltration (NF), activated carbon (AC) (Merck AC) adsorption and ion exchange resins (DOW-XUS 43578, Diaion CR11, Dowex-HCR W2, Purolite C160) were used to remove furfural and hydroxymethyl furfural (HMF) from xylooligosaccharides obtained from cannabis splinters. The hybrid system of NF-AC and NF-ion exchange resins were also used. The DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method was used to determine the antioxidant activity of xylooligosaccharides. DPPH measurements were performed with an ELISA reader at a wavelength of 517 nm.

In the second step, cytotoxicity analyzes were performed using real-time cell analysis system Xcelligence. In addition, RNA was isolated from healthy and cancerous colon cells treated with different amounts of XOS (10 mg/ml, 5 mg/ml, 1.25 mg/ml) to examine the molecular effects of XOS and the effect of XOS on the expression of NFE2L2 gene related to oxidative stress.was investigated by RT-PCR (Reverse transcriptase-Polimeraze Chain Reaction) method.

The nanofiltration process was not effective for the removal of HMF but was effective for completely removal of furfural. Resin and activated carbon applications were effective for the removal of HMF and furfural. Purolite C160 and Dowex-HCR W2 resins were not effective for the removal of HMF and furfural. However, DOW XUS 43578, Diaion CR11 and Merck activated carbon were effective for removal of HMF and furfural. With the utilization of the hybrid system, in which nanofiltration and activated carbon processes were considered together, HMF was removed by 99.3% and furfural by 100%. The DPPH scavenging activity of xylooligosaccharides was compared with L-Ascorbic acid. The IC_{50} values for XOS and L-Ascorbic acid were 122.29 µL/mL and 12.01 µg/mL, respectively.

Concentrations of XOS less than 5 mg/ml in cell culture studies with CoN and Caco-2 cell models were found to be safe in terms of cytotoxicity and duration of duplication. There was no significant increase or decrease in the expression levels of CoN / NFE2L2 and Caco-2 / NFE2L2 gene according to the increasing doses of XOS.

Keywords: Caco-2, CoN, functional food, ion-exchange resin, NFE2L2, purification, xylooligosaccharides

ÖNSÖZ

Bu çalışma ‘FP7-SME-2013-606073-LIGNOFOOD:Ingredients for Food and Beverage industry from a Lignocellulosic source’ projesi, Selçuk Üniversitesi BAP tarafından 15201104 nolu proje ile ve TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlar Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı ile desteklenmiştir.

Lisans dönemimden bu yana eğitimimde her türlü bilgi ve tecrübelerini ve aynı zamanda sevgisini esirgemeyen Danışman hocam **Yrd. Doç. Dr. Meryem Kara**’ ya,

Yüksek Lisansımda bana yeni ufuklar kazandıran, sevgi dolu bir çalışma ortamının sıcaklığını yaşatan hocam **Meltem Demirel Kars**’ a,

Lisans hayatımda bile eğitimime büyük katkılar sağlayan **Yrd. Doç. Dr. Saliha Dinç** hocama,

Tezime yapmış olduğu değerli katkılarından dolayı **Doç. Dr. Hasibe Cingilli Vural** hocama,

İLTEK ailesinin bir üyesi olmamı sağlayan ve her zaman bir abi gibi yanımda olan hocam **Prof. Dr. Mahmut Kuş’ a**, tüm İLTEK ekibini sağlam bir ekip olarak ayakta tutan **Prof. Dr. Mustafa Ersöz** hocama, lisans hayatımdan bu yana hep kendime örnek aldığım ve hep yanımda olan **Yrd. Doç. Dr. Serpil Edebali**’ ye,

Birlikte çalıştığımız tüm zaman boyunca hep yanımda olan, laboratuvarda, katıldığımız tüm seyahatlerde, eğitimlerde bana can yoldaşı olan ekip arkadaşım **Gamze Önecek**’e ve her zaman bir aile olarak gördüğüm **İLTEK personeli** ve **yüksek lisans arkadaşlarıma**,

Evlatları olduğum için her gün şükrettiğim, tüm hayatım boyunca varlıkları ile hayatımı güzelleştiren annem **Fadime Aykül** ve babam **Ramazan Aykül**’ e,

Beni dünyanın en şanslısı yapan, beni asla yalnız bırakmayan, dünyanın en harika kardeşleri **Gül Aykül Akyüz, Ceylan Aykül** ve **Ayşenur Aykül**’ e,

Her zaman benim hayata en mutlu şekilde bağlanmamı sağlayan, Konya’daki ailem ve destekçim sevgili nişanlım **Mehmet Kerem Gönce**’ ye,

Sonsuz teşekkürler…

Fatmanur AYKÜL

KONYA-2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **vi**

ÖNSÖZ ..... **viii**

İÇİNDEKİLER ..... **ix**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **3**

2.1. Fonksiyonel Gıdalar 3
2.1.1.Prebiyotikler 6
2.2. Ksilooligosakkaritler 8
2.2.1. Lignoselülozik materyaller 8
2.2.2. Ksilooligosakkaritlerin kimyasal yapıları 11
2.2.3. Ksilooligosakkaritlerin sağlık üzerine etkileri 13
2.2.4. Antioksidanlar ve ksilooligosakkaritlerin antioksidan özellikleri 14
2.3. Kolon Kanseri 16
2.4. Oksidatif Stres ve Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 Kodlayan Gen (*NFE2L2*) 19

3. MATERYAL VE YÖNTEM **23**

3.1. Kullanılan Cihaz ve Sarf Malzemeler 23
3.2. Ksilooligosakkarit Şurubunun Saflaştırılması 23
3.2.1. Membran filtrasyon ile saflaştırma yöntemi 24
3.2.2. İyon değişim reçineleri, aktif karbon adsorpsiyonu ve hibrit sistem yöntemleri 25
3.2.3. XOS şurubundaki HMF ve furfuralın HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) analizi 26
3.3. Ham XOS Şurubu' nda Antioksidan Aktivitenin DPPH Metodu ile Belirlenmesi 27
3.2. Normal Kolon ve Kolon Kanseri Hücrelerinde XOS' un Moleküler Etkilerinin Belirlenmesi 28
3.2.1. Hücre kültürü 28
3.2.2. XOS'un CoN ve Caco-2 hücrelerinin üremeleri üzerine etkilerinin belirlenmesi 31
3.2.3. XOS uygulanmış CoN ve Caco-2 hücre hatları üzerinde moleküler analizler 33

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA **37**

4.1. XOS Şurubunun Saflaştırılması 37
4.2. XOS' un İn-Vitro Antioksidan Aktivitesinin DPPH Metodu İle Belirlenmesi 39
4.3. Hücre Kültürü ve Moleküler Uygulama Sonuçları 42

4.3.1. XOS'un CoN ve Caco-2 hücre hatları üzerinde sitotoksik ve proliferatif etkilerinin belirlenmesi 42
4.3.2. XOS uygulanmış CoN ve Caco-2 hücre hatları üzerinde moleküler analizler 46

5. SONUÇ VE ÖNERİLER..... 51

EKLER 57

ÖZGEÇMİŞ 59

ÇİZELGELER VE ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Lignoselülozik biyokütlenin polimer yapısı (Bostancı 2009)

Şekil 2.2. Selülozun yapısı (Erdoğan 2007)

Şekil 2.3. Ligninin yapısı (Bostancı 2009)

Şekil 2.4. Ksilooligosakkaritlerin uygulama alanları (Va´zquez ve ark 2000)

Şekil.2.5. Ksilioligosakkaritlerin kimyasal yapısının şematik gösterimi (Carvalho ve ark 2013)

Şekil 2.6. Antioksidanların serbest radikallere etkisi (Güdücü 2014)

Şekil.2.7. Kolon kanseri oluşma evreleri (Anonim-2 2016)

Şekil.2.8. Kanser ölümlerinin diyet ile bağlantısı (Karagöz 2011)

Şekil 2.9. Oksidatif stresin hücreye etkisi (Dusak 2015)

Şekil 2.10. Oksidatif stresin etkileri (Güdücü 2014)

Şekil 2.11. Nrf2 yolağının şematik gösterimi (Saw ve ark 2010)

Şekil 3.1. Seperasyon işleminde kullanılan filtrasyon sistemi

Şekil 3.2. Hücre hatlarının mikroskop altında morfolojik görüntüleri A) CoN hücre hattı B) Caco-2 hücre hattı

Şekil 3.3. Fermente şurubun liyofilizasyonu ile elde edilen kuru XOS

Şekil 4.1. XOS 'un farklı farklı dozlarının DPPH ile ve DPPH 'siz görüntüleri

Şekil 4.2. XOS' un artan miktarlarının DPPH süpürücü etkisi

Şekil 4.3. Askorbik asidin artan miktarlarının DPPH süpürücü etkisi

Şekil 4.4. XOS' un farklı konsantrasyonları uygulanmış sağlıklı kolon hücresi olan CoN (ATCC® CRL-1790™) proliferasyon grafiği

Şekil 4.5. CoN (ATCC® CRL-1790™) dublikasyon süresi grafiği

Şekil 4.6. XOS' un farklı konsantrasyonları uygulanmış kolon epitel dokusu kanserine model olan Caco-2 (ATCC® HTB-37$^{TM)}$ proliferasyon grafiği

Şekil 4.7. Caco-2 (ATCC® HTB-37^{TM}) dublikasyon süresi grafiği

Şekil 4.8. A) CoN-XOS ribozomal RNA örnekleri, B) Caco-2-XOS ribozomal RNA örnekleri ribozomal alt birimleri (%1) agaroz jel görüntüleri

Şekil 4.9. CoN ve Caco-2 için PCR ürünlerinin şematik gösterimi

Şekil 4.10. XOS' un farklı dozlarının uygulandığı CoN hücre hattında NFE2L2 gen ekspresyonu için dansitometrik oran grafiği

Şekil 4.11. XOS' un farklı dozlarının uygulandığı Caco-2 hücre hattında NFE2L2 gen ekspresyonu için dansitometrik oran grafiği

Çizelge 2.1. Ksilooligosakkaritlerin kimyasal ve biyolojik özellikleri (Samanta ve ark 2015).

Çizelge 2.2. Ksilooligosakkaritlerin insan sağlığı üzerine etkileri (Carvalho ve ark 2013)

Çizelge 3.1. Kullanılan iyon değişim reçineleri

Çizelge 3.2. Furfural ve HMF' ye ait kalibrasyon grafikleri

Çizelge 3.3. CoN ve Caco-2 hücrelerinin üretileceği kültür ortamını içeriği

Çizelge 3.4. Hücre kültürü uygulamalarında kullanılan gereçler

Çizelge 3.5. Sitotoksisite deneyinde kullanılan gereçler

Çizelge 3.6. RNA izolasyonunda kullanılan gereçler

Çizelge 3.7. Primer Sekans listesi ve ürün boyutları

Çizelge 3.8. Optimize PCR koşulları

Çizelge 3.9. PCR reaksiyon bileşenleri

Çizelge 4.1. Nanofiltrasyon, reçine – aktif karbon ve hibrit sistem ile seperasyon sonuçları

Çizelge 4.2. XOS' un farklı konsantrasyonlarına maruz kaldıklarındaki sağlıklı kolon epitel hücrelerinin dublikasyon süreleri

Çizelge 4.3. XOS' un farklı konsantrasyonlarına maruz kaldıklarındaki Caco-2 hücrelerinin dublikasyon süreleri

Çizelge 4.4. XOS ile muamele edilmiş CoN hücre hattı RNA örneklerinin Nano Drop ölçüm sonuçları

Çizelge 4.5. XOS ile muamele edilmiş Caco-2 hücre hattı RNA örneklerinin Nano Drop ölçüm sonuçları

Çizelge 4.6. CoN hücre hattı 0 mg/ml XOS kontrol grubuna göre gen ifadesindeki katlı değişim tablosu

Çizelge 4.7. Caco-2 hücre hattı 0 mg/ml XOS kontrol grubuna göre gen ifadesindeki katlı değişim tablosu

1. GİRİŞ

Gıda bileşenlerinin belirli faydalı yönleri ile ilgili yeni bilimsel kanıtlar sürekli olarak ortaya çıkmaktadır. Diyetteki besin maddelerinin temel beslenme ihtiyaçlarını karşılamanın yanında vücut işlevlerini olumlu yönde etkileyen özellikler barındırdığı ya da bu özelliklerin kazandırılabileceği fark edilmiştir. İnsan sağlığını iyileştirici ve / veya hastalık riskini azaltıcı yönde olumlu etkiler gösteren gıdalar fonksiyonel gıdalar olarak isimlendirilmektedirler (Jiménez-Colmenero 2013). Assmann ve ark (2014) tarafından fonksiyonel gıdalar, beslenme ihtiyacını gidermenin yanı sıra bireylerin refahını artıracak potansiyel sağlık yararları sunan gıdalar olarak tanımlanmıştır. Fonksiyonel gıdalara antioksidanlar, prebiyotikler, bazı aminoasitlerince zengin gıdalar, enerjice zenginleştirilmiş gıdalar gibi çeşitli örnekler verilebilir.

Ksilooligosakkaritler (XOS) esas olarak β-1,4 bağlı ksiloz ünitelerinden oluşmaktadır. Ksilooligosakkaritler doğada meyveler, sebzeler, bambu filizleri, bal ve sütün içerisinde doğal olarak bulunurlar. Endüstriyel üretimleri de ksilanca zengin lignoselülozik materyallerden yapılmaktadır (Va´zquez ve ark 2000).

Gıda amaçlı kullanılan ksilooligosakkaritler safsızlıklar içermektedirler. Üretim şekline göre işlem esnasında furfural gibi çeşitli yan ürünler de oluşabilmektedir. Pürifikasyon amacıyla kullanılan vakum altında buharlaştırma, kromatografi gibi zaman alıcı ve endüstriyel boyutlarda üretime elverişli olmayan yöntemler pratik ve ekonomik değillerdir. Ultrafiltrasyon, bu yöntemlere birer alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Bu işlemle elde edilen hidrolizat büyük molekül ağırlıklı polisakkaritlerin ayrımını yapmaktadır. Nanofiltrasyon işleminde ise düşük molekül ağırlıklı şekerler ve diğer yan ürünler ayrılmaktadır (Erdoğan 2007).

Ksilooligosakkaritler, sindirilemeyen oligosakkaritler sınıfında yer almaktadırlar. Ksiloz monomerleri β bağlarıyla bağlanmasından dolayı insan sindirim enzimleri tarafından hidrolize edilemezler. Bu sebepten dolayı da bağırsakta yaşayan bakterilere substrat olmaktadırlar (Bostancı 2009). Ksilooligosakkaritler çeşitli *bifidobakteriler* tarafından kullanılabilmekte ve bu mikroorganizmaların büyümelerini teşvik edici özellikler taşımaktadırlar (Chung ve ark 2007). Ksilooligosakkaritler kan plazmasındaki kolesterolü daha alt seviyelere çekebilmekte ve kalsiyum kullanılabilirliğini arttırabilmektedirler. Bu özelliklerin yanında kısmen tatlı, pH ve sıcaklık değişimlerine karşı istikrarlı, su tutma kapasitesi yüksek ve gıdaların donma

noktasını değiştirebilme özelliklerine sahip fonksiyonel oligosakkaritlerdir (Bostancı 2009).

Bu araştırmanın amacı, lignoselülozik yan ürünlerden biri olan kenevir kıymıklarından biyoteknolojik yöntemlerle üretilen XOS karışımının sağlıklı ve kanserli kolon hücrelerine model hücre hatlarının proliferasyonuna etkilerini ve gen düzeyindeki etkilerini araştırmaktır. Ayrıca, XOS karışımının saflaştırılması için en uygun seperasyon yöntemleri de araştırılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Fonksiyonel Gıdalar

İnsan diyetinde yer alan gıdaların besleyici değerlerinin yüksek olması, sağlıklı ve uzun bir yaşam sürdürebilmemiz için önem arz etmektedir. Geçmişte beslenme ve gıda konusunda geliştirilen yanlış alışkanlıklar, albenisi yüksek ama besin değeri düşük ürünlerin ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Bu yaklaşım dengesiz/yetersiz beslenmenin ortaya çıkardığı sağlık sorunlarını beraberinde getirmiştir (Sevilmiş 2008).

Diyetin öncelikli görevi, bireyin metabolik ihtiyaçlarını karşılamak, hedonist nitelikleri aracılığıyla tat olarak tüketici memnun etmek ve mutluluk hissi vermektir. Diyet sadece optimal sağlık ve gelişme elde etmek için yardımcı olmaz aynı zamanda hastalık riskini azaltmada önemli bir rol oynayabilir. Sanayileşmiş yeni dünyada beslenme kavramı ‘yeterli beslenme’den ‘optimal beslenme’ye doğru anlam değiştirmiştir. Beslenme kavramına olan vurgu, açlık giderme ve tat memnuniyetinden hastalıklara karşı korunma ve hastalık iyileştirmeye doğru bir anlam kayması göstermiştir (Anonymous-2 1998).

Gıdalar üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda gıdaların ve beslenme alışkanlıklarının sağlığın korunmasında birinci dereceden önemli olduğu ortaya konulmuştur. Bu durumda fonksiyonel gıdaların adlandırılmasını sağlamıştır. Ancak fonksiyonel gıdalarla ilgili alan oldukça yenidir ve diyet-sağlık ilişkisinin bilimsel geçerlilik kazanması için daha ileri araştırmalar gereklidir (Assmann ve ark 2014).

Japonya'da, fonksiyonel gıdalar üzerinde araştırmalar, 1980'lerin başında, 'Sistematik analiz ve gıda fonksiyonlarının gelişimi' programı ile hükümet tarafından finanse edilmiştir. 1990 yılında ‘FONKSİYONEL GIDA’ terimi ilk kez Japonya’ da kullanılmıştır (Anonymous-3 1999). İçerdiği bileşenler nedeniyle veya alerjik etkiye sahip bileşenlerin gıdadan uzaklaştırılmasına bağlı olarak sağlık üzerine olumlu etki gösteren gıdaları adlandırmak için kullanılan FOSHU (Japanese Foods for Specified Health Use – Gıdanın Sağlıklı Yaşam İçin Kullanımı) kavramı ortaya çıkmıştır (Anonim-3 2016).

Fonksiyonel gıda terimi, beslenme üzerinde sağlık yararları sağlayan gıda veya gıda bileşiklerini tanımlamak amacıyla kullanılmaktadır (Sevilmiş 2008). de Boer ve ark (2016)’ nın yaptığı tanıma göre fonksiyonel gıda bir ve ya daha fazla aktif bileşen bakımından odaklanılarak tercih edilen gıdadır. Fonksiyonel gıda terimi yerine sağlık

besinleri, tıbbi besinler, düzenleyici besinler, özel beslenme amaçlı besinler ve farmakolojik besinler gibi adlar da kullanılmaktadır (Sevilmiş 2008).

Fonksiyonel gıdalar aşağıdaki koşulları sağlıyor olmalıdır;

- Beslenmeye katkıda bulunmalı; sağlığın korunması ve daha da iyileştirilmesine yardımcı olmalı,
- Besleyici ve sağlığı olumlu yönde etkileyici özelliklerinin beslenme bilimi ve tıp açısından sağlam temelleri olmalı,
- Tıbbi ve beslenme bilgilerimize dayalı olarak söz konusu besin veya besin öğesi için günlük uygun alım miktarları belirlenmiş olmalı,
- Gıdanın tüketiminin güvenilir olduğu ortaya konulmuş olmalı,
- Gıdanın bileşenlerinin fizikokimyasal özellikleri, niceliksel ve niteliksel özellikleri belirlenmiş olmalı,
- Gıda işlenerek fonksiyonel özellik kazanmışsa; besleyici özelliğinde kayıp olmamalı,
- Gıda seyrek olarak tüketilen değil, günlük beslenmede sıkça kullanılan bir besin olmalı,
- Gıda doğal olarak tüketildiği şeklinde olmalı,
- Gıda veya bileşeni ilaç olarak kullanılan bir madde olmamalıdır (Sevilmiş 2008).

Fonksiyonel gıda çeşitleri:

1) Düşük kalorili gıdalar: Şekerlere oranla daha az kalorili tatlandırıcılar veya yağ yerine kullanılan ingrediyenler ile üretilen şeker ve yağ içeriği azaltılmış gıdalar ve içeceklerdir. Bu grubu ifade etmek amacıyla ülkemizde de "light" ifadesi yaygın olarak kullanılmaktadır. Kısaca, sağlık üzerine etkileri bireylerin kilo kontrolü, diyabet kontrolü, diş sağlığını koruma, obezite ile alakalı tehlikelerin kontrolü şeklindedir. Unlu mamüller (ekmek, bisküvi vb gibi), alkolsüz gazlı içecekler, düşük yağlı ve kalorili süt ve süt ürünleri, şekerleme ürünleri (sakız, şekerleme), çikolata, reçel vb. gıdaların pazarında düşük kalorili örnekleri mevcuttur. İnulin ve diyet lifince zenginleştirilmiş ürünler de aynı kapsamda değerlendirilebilir. İzomalt, maltitol, sorbitol, mannitol, laktitol ve ksilitol gibi şeker alkolleri ilave edilen gıdalarda kaloriyi azaltmaktadırlar. Ayrıca bu gıda bileşenlerinin diş çürümelerine karşı koruma gibi etkileri de mevcuttur.

2) Düşük sodyumlu veya sodyum içermeyen tuzlar da dâhil olmak üzere düşük sodyumlu gıdalar: Özellikle yüksek tansiyona karşı koruyucu nitelikte olan gıdalardır.

3) İçeriğindeki diyet lif miktarı arttırılmış gıdalar: Bu gruba çeşitli içecekler, pudingler ve çorbalar gibi gıdalar örnek gösterilebilir. Bunlar vücutta emilimi gerçekleşemeyen, sindirim sistemi içerisinde önemli fizyolojik etkilere sahip, temel olarak bitki hücrelerinin duvarlarında bulunan karmaşık yapılı karbonhidratlar olarak tanımlanan lif ve lifli ürünlerdir. Pek çok etkileri söz konusudur;

• Bireyin bağırsak fonksiyonlarını düzenleme ve kolon kanserine karşı ve bağışıklık sistemi problemlerine karşı korumada destek,

• Kan şekeri seviyesinin kontrolü ile diyabetik sorunlara destek,

• Kan plazması kolesterolü düzeyinin kontrol edilmesine yardımcı olarak kalp-damar hastalıklarına karşı korumada önemli görevler üstlenmek.

Sebze, meyve ve tahıllarda doğal olarak bulunan inülin ve oligosakkaritler bu sınıfa dâhil edilmektedir. Günlük lif alımının 25-30 g/kişi/gün seviyesinde olması tavsiye edilmektedir.

4) Glutensiz gıdalar: Çölyak hastalarının tüketimi için geliştirilmiş gıdalardır (ekmek, bisküvi vb).

5) Sporcu gıdaları: Enerji içecekleri, aminoasitler, B vitaminleri, fenolik maddeler, şeker alkolleri, protein tozu gibi çeşitli bileşenleri içeren gıda maddeleridir.

6) Diyabetik gıdalar (şeker içermeyen): Diyabetlilere yönelik olarak şeker alkolleri ile hazırlanmış çikolata, şekerleme, lokum, reçel vb. ürünler örnek verilebilir. Ayrıca bu ürünlerde yapay tatlandırıcılar da kullanılabilmektedir.

7) Zenginleştirilmiş gıdalar: Bir gıdaya içeriğinde doğal olarak bulunan/bulunmayan bir veya birden fazla vücuda alınması elzem besin öğesinin toplum nüfusunda veya nüfusun özgün bir grubunda belirlenmiş bir eksikliği gidermek amacıyla ekleme yapılmasıdır (Kalsiyum, magnezyum, potasyum, çinko ve demir gibi mineraller) Fonksiyonları,

i) Kemik ve diş sağlığına destek,

ii) Kemik erimesine (osteoporozis) karşı koruma,

iii) Anemiye karşı koruma,

iv) Bağışıklık sistemine destek,

v) Enerji metabolizmasına destek,

8) Fenilketonuri hastaları için özel gıdalar: Fenilalanin aminoasitinin büyük ölçüde uzaklaştırıldığı ekmek, peynir, çikolata gibi çeşitli gıdalar (Boyacıoğlu 2016),

9) Probiyotik ve prebiyotik içeren ürünler: Prebiyotikler, bağırsak mikroflorasında yer alan yararlı mikroorganizmaların (probiyotikler) gelişimlerini seçici olarak arttıran

sindirilemeyen gıda bileşenleridir (Lim ve ark 2005). En önemli probiyotikler, *Bifidobacterium* ve *Laktobacillus* türleri olup önemli etkileri; bağırsak sisteminin düzenlenmesi ve kolon kanserine karşı koruyuculuk, kolesterolün düşürülmesi ve kalp-damar hastalıklarına karşı koruyuculuk, bağışıklık sistemi aktivitesinde olumlu etkiler ve bağırsak patojenlerini kontrol etme şeklinde sıralanabilir. Probiyotik içeren gıdalara yoğurt gibi fermente ürünler, fermente içecekler (süt bazlı, hububat bazlı vb gibi), bebek devam mamaları örnekler olarak verilebilir.

10) Bağışıklık sistemini güçlendirici, yaşlanmayı geciktirici, fiziksel ve mental performansı arttırıcılar.

11) Yaşlanma karşıtı ürünler: Antioksidanlarca ve fitokimyasallarca içeriği zengin gıdalar, E vitamini, C vitamini ve β- karoten içeren içecekler, doğal antioksidanlarca zengin sebze veya meyve özütleri içeren şekerlemeler (kalp ve damar fonksiyonlarını destekleyici olarak).

12) Bitki sterolleri ve bitki stanol esterleri içeren modifiye margarin ürünleri (sağlıklı kolesterol seviyelerini destekleyici).

13) Çoklu doymamış yağ asitleri omega-3, omega-6 ve omega-9 içeriği zenginleştirilmiş gıdalar: Bunların önemli etkileri, kan plazmasındaki kolesterolü azaltma ve kalp-damar hastalıklarına karşı ve meme, kolon ve prostat kanserlerine karşı koruyucu olmalarıdır (Boyacıoğlu 2016).

2.1.1.Prebiyotikler

Prebiyotikler, seçici olarak kolon için yararlı olan intestinal probiyotik bakterilerin (*Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türleri) büyümelerini arttırıcı besinleri oluşturan, bakterin büyüme veya aktivitelerini teşvik eden sindirilemeyen karbonhidratlardır (Vieira da Silva ve ark 2016). Diğer bir deyişle prebiyotikler, bağırsak florasında bulunan yararlı mikroorganizmalar besin olarak çoğalmalarını sağlayan gıda maddeleridir. Böylece patojen mikroorganizmaların çoğalmasını önlemeye yardımcı olurlar (Sevilmiş 2008). Prebiyotiklerin özellikleri şöyledir:

-Sindirim sistemi tarafından hidroliz edilemezler.

-Sindirim sistemi içinde bağırsaklarda bulunan faydalı bakteriler tarafından fermente edilirler.

-*Bifidobacterium*, *Lactobacillus* ve *Eubacterium* gibi faydalı bakterileri arttırırken *Clostridium* ve *Bacteroides* gibi zararlı bakterileri azaltarak bağırsak florasını düzenlerler.

-Konak canlının sağlığı için faydalı etkileri artırırlar.

Ksilooligosakkaritler tüm bu özellikleri taşımaktadır (Anonymous-4 2013).

Prebiyotik etkileri olan karbonhidratlar, birçok farklı çeşit oligosakkaritlerdir. Bunlar glikozidik bağlarla bağlı 2-10 monosakkarit biriminden oluşan sakkarit polimerleridir. En önemli özellikleri sindirim enzimlerine karşı dayanıklı olmaları ve konak tarafından direkt absorbe edilememeleridir. Bu yüzden düşük kalorilidirler. Temel olarak üretim yöntemleri, bitkilerden ekstrakte edilme, polisakkaritlerin enzimatik ya da kimyasal hidrolizi veya enzimatik sentez şeklindedir (Ölçer 2011).

Sindirilmeyen karbonhidratlar, hem doğrudan fermente olmamış materyalleri arttırarak kolondaki fekal kütle miktarını artırırlar, hem de dolaylı olarak bakteriyel biyokütleyi arttırarak, bu mikroorganizmaların fekal kütle kıvamını ve sıklığını artırıcı etki göstermeklerini sağlamaktadırlar (Anonymous-3 1999).

Prebiyotiklerin besinsel kaynaklarına örnek olarak bir disakkarit olan laktuloz, inülin, oligosakkaritler (maltoz, soya), ksilooligosakkaritler, oligofruktoz ve galaktoz içeren galaktooligosakkaritler (kurubaklagiller) verilebilir. Prebiyotikler; meydana getirdikleri kısa zincirli yağ asitleriyle fekal pH'yı etkiler böylece kolon fonksiyonları etkilenir, bu da kolon dokusunda kanserleşme riskini azaltıcı bir fayda sağlayabilir. Prebiyotiklerin kalınbağırsaklarda fermantasyonu ile laktat, kısa zincirli yağ asitleri, hidrojen gazı, karbondioksit ve metan oluşmaktadır, bağırsak pH'sında etkili bir düşüş gerçekleşir. Bağırsak pH'sının düşmesinin pek çok faydası vardır; potansiyel patojen mikroorganizmaların gelişimlerini inhibe eder, sekonder safra asitlerini azaltır, kalsiyum, magnezyum, demir ve çinko gibi minerallerin çözünürlüklerini ve vücutta emilimlerini arttırır. Ayrıca prebiyotik varlığında mikroflora fitaz aktivitesi ile çözünür lif içindeki kalsiyum ve diğer mineralleri bağlayan fitik asidi parçalar (Anonim-3 2016).

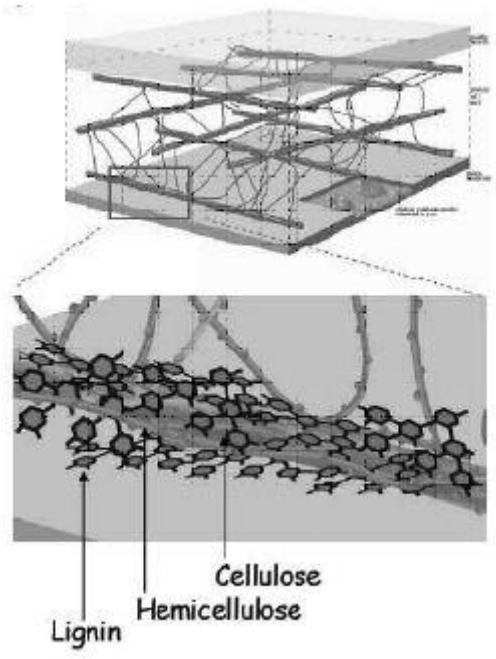
Prebiyotik oligosakkaritler bitkisel kaynaklardan ekstraksiyon, mikrobiyolojik veya enzimatik sentez ve polisakkaritlerin enzimatik hidrolizi ile üretilebilirler. Prebiyotik oligosakkaritlerin çoğunluğu, endüstriyel ölçekte üretilmektedirler ve yaygın olarak piyasada mevcutturlar. Son zamanlarda, prebiyotik oligosakkaritler ile ilgili birçok patent başvurusu yapılmıştır ve bu alan sürekli olarak genişlemektedir. Uygulamada, probiyotik ve prebiyotiklerin kombine karışımları sıklıkla kullanılmaktadır ve böylece birlikte kullanımları ile sinerjik etki kazanmaktadırlar. Bu

nedenle, bu tür karışımlar ‘simbiyotikler’ olarak adlandırılmaktadır (Grajek ve ark 2005).

2.2. Ksilooligosakkaritler

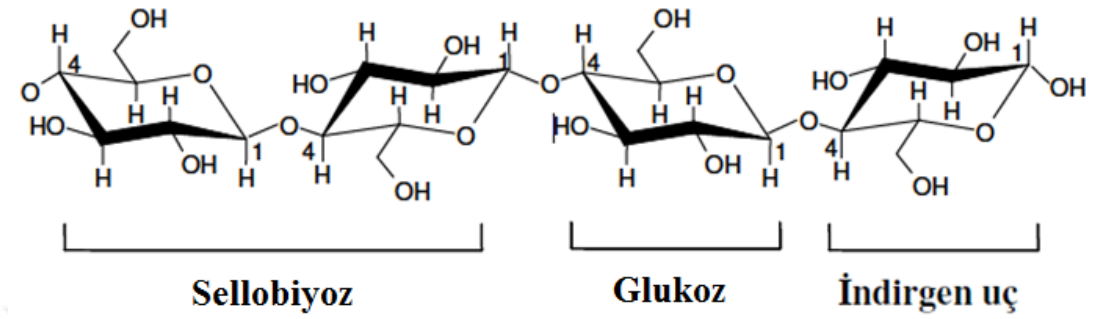
2.2.1. Lignoselülozik materyaller

Lignoselülozik materyaller (LM), pek çok tarımsal atık çeşitleri (sap, saman, kabuk gibi), yıllık yaprak döken ağaçlar ve iğne yapraklı (kozalaklı) ağaçlar, kentsel katı atıklar (kâğıt ve ağaç ürünleri), kâğıt ve pulp endüstrisi atıkları ile otsu bitkilerden oluşmaktadır. Kaynaklarına göre bu materyallerin kompozisyonları değişim göstermektedir; ancak temel olarak selüloz (%35-50), hemiselüloz (%20-35) ve lignin (%10-25)’den oluşmaktadır. Proteinler, yağlar ve kül diğer bileşenleridir. Şekil 2.1.’de LM’nin yapısı gösterilmektedir. Kovalent ve kovalent olmayan bağlarla hücre duvarının temel yapısında önemli rol oynayan ksilan, hemiselülozun büyük bir kısmını oluşturmaktadır ve bitki hücre duvarında lignin ile selüloz arasında yer almaktadır. Ksilanın önünde lignin katmanı vardır ve lignin ksilanın 4-O-metil-D-glukuronik asit birimlerine ester bağları ile bağlıdır (Bostancı 2009).



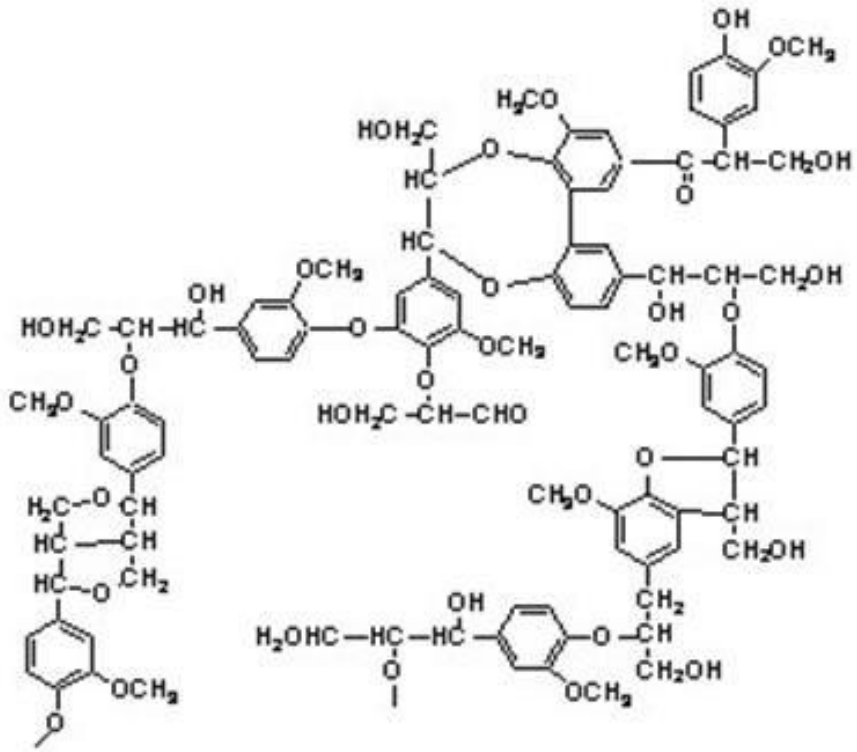
Şekil 2.1. Lignoselülozik biyokütlenin polimer yapısı (Bostancı 2009)

Selüloz: β-1,4 bağıyla birbirine bağlı glikoz ünitelerinden oluşur. Glikoz üniteleri sandalye formunda ($^4C_1$) bulunur. Bu formda, serbest hidroksil grupları ekvatoral, hidrojen grupları da eksenel dir. Her glikoz ünitesi komşusuna 180º açıyla bakar. Bu yüzden polimerin tekrarlanan ünitesi glikoz değil sellobiyozdur (Şekil 2.2). Moleküler büyüklük, selülozun kaynağına göre değişim gösterir (Erdoğan 2007).



Şekil 2.2. Selülozun yapısı (Erdoğan 2007)

Lignin: Bitkiye fiziki destek, madde iletimi ve mikrobiyal parçalanmalara karşı dirençlilik gibi özellikler kazandırır. Lignin, 3 boyutlu, fenilpropan yapıda, p-kumaril, koniferil ve sinapil alkol birimlerinden oluşmuş karmaşık yapılı bir ağ şeklindedir (Şekil 2.3) (Bostancı 2009).



Şekil 2.3. Ligninin yapısı (Bostancı 2009)

Hemiselüloz: Selülozdan sonra doğada en çok bulunan ikinci polisakkarittir. Lignoselülozik biyokütlenin yaklaşık % 20-35'ini oluştururlar. Hemiselülozlar, pentozlar (ksiloz, arabinoz), heksozlar (mannoz, glikoz, galaktoz) ve şeker asitlerinden oluşan heterojen polimerlerdir (Erdoğan 2007).

Hemiselülozun ana iskelet yapısı β-1,4 bağı ile bağlı şekerlerden oluşur. Hemiselüloz; β-1,2, β-1,3 ve β-1,6 noktalarında dallanma gösterir. Hemiselülozlar, yapılarında bulunan şekerlere göre aşağıda verilen biçimlerde gruplandırılmaktadırlar:

- Ksilanlar (β-1,4-D-ksiloz iskeleti)
- Arabinoksilanlar (β-1,4-D-ksiloz iskeleti)
- Glukuronoksilanlar (β-1,4-D-ksiloz iskeleti)
- Mannanlar (β-1,4-D-mannoz iskeleti)
- Glikomannanlar (β-1,4-D-glikoz : β-1,4-D-mannoz iskeleti) (1:3)
- Galaktomannanlar (β-1,4-D-mannoz iskeleti)
- Galaktoglikomannanlar (β-1,4-D-glikoz : β-1,4-D-mannoz iskeleti) (1:3)
- Glukuronomannanlar (β-1,4-D-mannoz ve β-1,2 –D-glikoronik asit iskeleti)
- Arabinogalaktanlar (β-1,3)-(β-1,6)-D-galaktoz iskeleti)
- β-(1,3)-D-glikanlar
- β-(1,3) -β-(1,4)- D-glikanlar (Bostancı 2009)

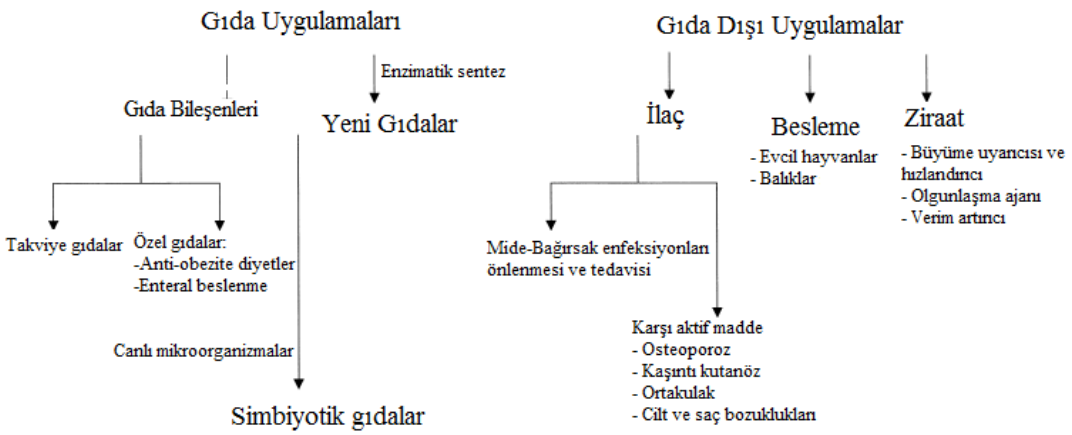
Lignoselülozik yapıdaki ksilan kaynağı olan tarım atıkları (mısır sapı, mısır koçanı, kenevir kıymıkları, pirinç kabuğu, ayçiçeği), sert kabuksu kaynaklardan etkili fraksiyon metodları ile ksilooligomerler üretilebilmektedir. Lignoselülozik materyallerden XOS üretimi 3 şekilde gerçekleştirilmektedir.

1. Kimyasal tepkime ve enzimatik hidroliz yoluyla izolasyon ya da çözündürülme,

2. Ksilanca zengin materyallerden direkt enzimatik hidroliz,

3. Otohidroliz: Sulu/ buhar prosesi ve enzimatik ve/veya kimyasal hidroliz esaslı hidroliz.

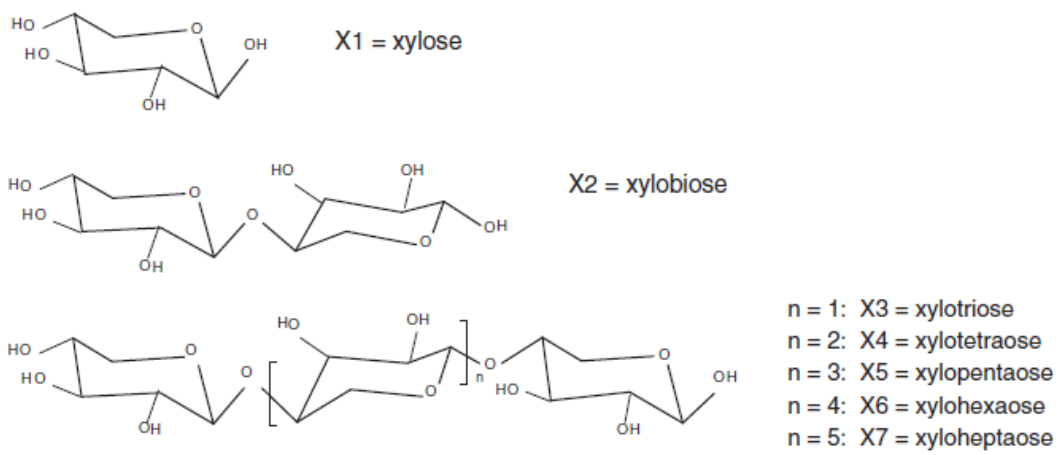
Ksilooligosakkaritler çeşitli uygulama alanlarına sahiptirler (Çizelge 2.4.).



Şekil 2.4. Ksilooligosakkaritlerin uygulama alanları (Va´zquez ve ark 2000)

2.2.2. Ksilooligosakkaritlerin kimyasal yapıları

Ksilooligosakkaritler 2-10 ksiloz molekülünün β-1-4 bağları ile bağlanması ile oluşmuş beyaz toz halinde bulunan bir oligosakkarittir, fakat polimerizasyon derecesi ≤20 olduğu zaman ksilooligosakkarit adını almaktadır. XOS' lerin kararlılıkları oligosakkarit ve şeker kalıntılarının bağlantıları, halka formları ve anomerik yapılandırma tiplerine bağlı olarak büyük farklılıklar göstermektedir. Genellikle, β-bağları α-bağlarından daha güçlüdür ve heksozlar pentozlardan daha güçlü bağları vardır. Kısa zaman periyotları için, yüksek sıcaklıklarda işlendiklerinde veya oda koşulları altında uzun süreli depolamaya maruz bırakıldıklarında oligosakkaritlerde, pH 4.0' ın altında besleyicilikleri ve fiziko-kimyasal özelliklerinin kaybı ile sonuçlanan hidroliz gerçekleşebilmektedir (Carvalho ve ark 2013).



Şekil.2.5. Ksiooligosakkaritlerin kimyasal yapısının şematik gösterimi (Carvalho ve ark 2013)

Ksilooligosakkaritler, β-(1-4)-ksilozidik bağlı ksiloz zinciri şeklindeki şeker oligosakkaritlerdir. Adlandırılmaları monomer sayısına göre yapılmaktadır ve ksilobiyoz (2 monomer), ksilotrioz (3 monomer), ksilotetroz (4 monomer) şeklinde devam etmektedir (Samanta ve ark 2015).

Çizelge 2.1.' de XOS' un biyolojik ve kimyasal özellikleri yer almaktadır.

Çizelge 2.1. Ksilooligosakkaritlerin kimyasal ve biyolojik özellikleri (Samanta ve ark 2015).

Özellik	**Değer/yapı**
Yaygın isim	Ksilooligosakkaritler
Eşanlamlı sözcük	D-ksiloz-hekzuloz
Moleküler formül	$C_{5n}H_{8n+2}O_{4n+1}$; n=2' den 6' ya
Kimyasal grup	Karbonhidrat; ksilobiyoz (DP 2), ksilotrioz (DP 3), ksilotetroz (DP 4), ksilopentoz (DP 5), ksiloheksoz (DP 6)
Moleküler ağırlık	282-810 (X_2-X_6)
Fiziksel hal	Katı kristal, renk ksilan kaynağına, pürifikasyona ya da kurutma işlemine bağlıdır.
Koku	Kokusuz
Erime sıcaklığı	134˚C
Ayrışma sıcaklığı	120 ˚C
Çözünürlük (suda)	21 ˚C' de %58 (w/w)
pH stabilitesi	2-7
Göreceli tatlılık	% 10 'luk çözeltiye % 92' lik sukroz karıştırıldığındaki tatlılık seviyesinde
Soğutma etkisi	Yok.
Enerji değeri	1.5 kcal/g
Kanserojenliği	Yok.
Lezzet arttırıcılık	Yoğun tatlandırıcılarda sinerjistik etki
Nemlendiricilik	Sorbitol ile benzer
Higroskopisite	Fruktozdan daha düşük
Gastrointestinal sistemde absorbsiyon	İnsanda şeker emilim bozukluğu
Maillard reaksiyonu ve karamelizasyon	Sukroz ile benzer kahverengi
Diyetteki faydaları	Düşük kalorili şeker alkolü olarak prebiyotik etki; Kandaki glukoz seviyesini yükseltmez, diyabetik hastalar için uygun; Antioksidan, hücre koruyucu; Diyet takviyeleri, yararlı ilaç ya da adjuvan ilaç kapsamını sağlar.
Tavsiye edilen tüketim miktarı	8-12 g/gün (sağlıklı yetişkin)
Aşırı tüketim yan etkileri	Bağırsakta şişkinlik, mide bulantısı, gaz, ishal vb.
Düzenleyicilik durumu	İlaçlarda ve gıda olmayan maddelerde yan bileşen; Güvenli olarak kabul edilen (Generaly Recognised as Safe- GRAS), Hayvan rasyonlarında yan bileşen; Güvenli olarak kabul edilen (Generaly Recognised as Safe-GRAS), Klinik uygulamada antidiyabetik ilaç uygulama.

2.2.3. Ksilooligosakkaritlerin sağlık üzerine etkileri

İnsan vücudunda β-bağlarını hidrolize etmek için gereken enzim olmadığı için XOS insanlar tarafından sindirilemez, böylece midede değişime uğramaz ve kalın bağırsakta prebiyotik çözünebilir lif olarak kalır. Bu özelliği sayesinde XOS düşük kalorili diyet yiyecekler ve tatlandırıcılarda kullanıma ve diyabetli kişiler tarafından tüketime elverişlidirler (Nabarlatz ve ark 2007). XOS' un biyolojik aktivitesi moleküler ağırlığına bağlıdır (Hughes ve ark 2007). İnsan bağırsağında yararlı mikroorganizmalar olarak kabul edilen *Bifidocterium*'un çoğalmasını teşvik için dörtten daha az monomer birimlerine sahip XOS'lar prebiyotik uygulamalarda önemlidirler (Carvalho ve ark 2013). Ksilooligosakkaritler, fonksiyonel gıdalarda aktif bileşik olarak yer almaktadırlar. Bu yüzden sanayi ürünlerinde iyi bir gıda katkı maddesi olarak kullanıma uygundurlar (Carvalho ve ark 2013) (Nabarlatz ve ark 2007). Ksilooligosakkaritlerin gıdaya eklenmesi durumunda kolon kanserine ve kardiyovasküler hastalıklara engel olma, ayrıca kalsiyum emiliminde artış, diş çürümelerinde azalma, bağırsak fonksiyonlarında iyileşme gibi olumlu pek çok fayda sağlanabilmektedir.

Bunlara ek olarak XOS'lar, immünolojik sistem, antioksidan, antinflamatuar ve antiallerjik faaliyetler üzerinde ve cilt, kan gibi sistemlerde yararlı etkiler sağlamaktadır. XOS'lar patojen ve çürükçül bakterilerin büyümesini inhibe ederlerken yararlı bakteriler, özellikle de *Bifidobacterium*'un yaşam süresini artırabilmektedirler (Carvalho ve ark 2013). Bir çalışmada 3 hafta boyunca günde 4 g XOS' un 65 yaş üzeri insanlarda bağırsak mikroflorasında yararlı bakterileri arttırdığı belirtilmiştir (Chung ve ark 2007).

XOS anti-kanserojen ve kalın bağırsak mineral emilimini artırmak için pankreastan ek insülin salgılanmasını düzenler. Hafif müshil özelliği sayesinde bağırsak fonksiyonlarını etkiler (Samanta ve ark 2015). Ayrıca Tip-2 diyabetli hastalarda diyete 4 g/gün olarak eklenen XOS' un kan şekeri ve lipit seviyesini iyileştirdiği bildirilmiştir (Aachary ve ark 2015).

Chung ve ark (2007) yaptıkları çalışmada, XOS' ların, Kanser Araştırma Enstitüsü farelerinin ICR dışkı rutubetinde, toplam çekum ağırlığında ve *Bifidobakteri* nüfusunda artmaya ve dışkı pH seviyesinin azalmasında etkili olabileceğini göstermişlerdir. XOS alımının hamile kadınlarda yan etki olmaksızın kabızlık azaltılması için son derece etkili olduğu bildirilmiştir.

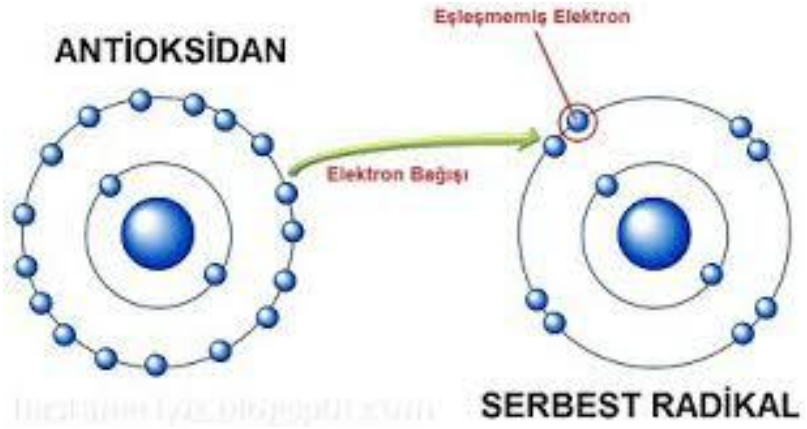
Çizelge 2.2.' de ksilooligosakkaritlerin insan sağlığı üzerine etkileri yer almaktadır.

Çizelge 2.2. Ksilooligosakkaritlerin insan sağlığı üzerine etkileri (Carvalho ve ark 2013)

Ksilooligosakkaritlerin faydaları	**Referans**
Bifidobacterium ve *Lactobacillus* sayısını arttırarak kolon mikroflorasını düzenlerler.	Gullón et al. (2008), Moure et al. (2006), Van Laere, Hartemink, Bosveld, Schols, and Voragen (2000)
Patojen ve pütrifaktif bakteri sayısını düşürürler.	Mussatto and Mancilha (2007)
Metabolizma için faydalı etkileri olan kısa zincirli yağ asitlerinin üretimine yol açan bağırsak sağlığını arttırıcı bakterilerin büyümesini teşvik ederler.	Blaut (2002), Grootaert et al. (2007), Wang et al. (2009)
Bağırsak fonksiyonu ve kalsiyum emilimi iyileştirirler. Diş çürümesini önlerler.	Grootaert et al. (2007), Wang et al. (2009)
Düşük dozlarda biyolojik etkileri vardır. Deri ve kanda, antioksidan aktivitesi, anti-enflamatuar ve anti-allerjik eyleme ilişkin etkileri vardır.	Aachary and Prapulla (2009), Vázquez et al. (2000)
Düşük kalorilidirler.	Vázquez et al. (2000)

2.2.4. Antioksidanlar ve ksilooligosakkaritlerin antioksidan özellikleri

Dış orbitallerinde bir veya daha çok çift oluşturmamış elektron içeren yüksek enerjili bileşiklere serbest radikal adı verilmektedir (Güdücü 2014). Kararlı yapıdaki bir oksijen atomu 8 elektrona sahiptir. Oksijen atomu herhangi bir şekilde 1 elektronunu kaybederek serbest radikal oluşturmaktadır. Antioksidan maddeler, aynı ortamda serbest radikaller ile bir araya geldiğinde serbest radikali nötr hale getirmek için üzerlerindeki bir elektronu serbest radikale vererek onu etkisiz hale getirmektedir (Güdücü 2014).



Şekil 2.6. Antioksidanların serbest radikallere etkisi (Güdücü 2014)

Serbest radikallerdeki çifti olmayan elektronlar serbest radikale büyük bir reaktiflik kazandırarak lipid, DNA, protein, nükleotid, koenzimler gibi biyolojik materyallere zarar verebilme kabiliyeti kazandırmaktadır. Verilen bu zararın yaşlanmayı hızlandırıcı ve ayrıca çeşitli kanser türleri, kalp-damar hastalıkları, bağışıklık sisteminde zayıflama, sinir sistemi dejeneratif hastalıkları, katarakt gibi pek çok hastalığı ortaya çıkarıcı etkilerinin olduğuna dair bilgiler bulunmaktadır (Güdücü 2014).

Düşük konsantrasyonlarda dahi serbest oksijenin zararlarını engelleyebilen ya da azaltabilen maddeler antioksidan olarak adlandırılmaktadır (Tekeli ve ark 2008). Antioksidanların kimyasal sınıflandırılması çok karmaşıktır. Etki mekanizmasına göre, antioksidanlar iki ana grup ayırılabilir. İlk grup radikal hidrojenin yayılmasını veya radikal elektronlarının taşınmasını engelleyen kimyasallardan oluşan gruptur. İkinci grup, bir aktivasyon esnasında sinerjistik rolü ile karakterize edilir. Bunlar oksijen temizleyiciler ve serbest radikal oluşumunda rol oynayan iyonları bağlayan şelatlayıcılardır. Bunların aktivitesi, antioksidan birincil işlevi yeniden oluşturulması sağlar (Grajek ve ark 2005).

Son dönemlerde antioksidanlar, özellikle farmakolojik çalışmalarda büyük önem kazanmışlardır. Tıbbi amaçlı yapılan çalışmalarda, bireyin diyetindeki antioksidan etkili maddelerin oksidatif strese neden olan reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türlerinin insan vücuduna verdiği zararları önemli ölçüde engelleyebildiği belirtilmiştir (Tekeli ve ark 2008).

İyi bir antioksidan şu özellikleri taşımalıdır:

• Düşük konsantrasyonlarda etkili olabilmelidir.

• Yağ veya yağlı ürünlerin tadına, kokusuna ve görünüşüne etki etmemelidir.

• Yemeklerin pişirilmesi sırasında yağa ve bununla hazırlanmış besinlere etki etmemeli ve aktif kalmalıdır.

• Yağda yeterli miktarda çözünmeli ve yağ ile karışabilmelidir.

• Fizyolojik olarak zararsız olmalıdır.

• Kolay elde edilebilmelidir ve ucuz olmalıdır (Güdücü 2014).

Bitki antioksidanları en aktif gıda bileşiklerden birini teşkil etmektedirler. Bu maddelerin ana kaynağı, bitkisel maddelerdir. Sarımsak, brokoli, yeşil çay, soya, domates, havuç, brüksel lahanası, lahana, soğan, karnabahar, kırmızı pancar, kızılcık, kakao, böğürtlen, yaban mersini, kırmızı üzüm, kuru erik ve turunçgiller antioksidan açısından zengin kaynaklardır (Grajek ve ark 2005).

Fonksiyonel gıda değerlendirmede sindirim sistemindeki maddelerin biyolojik aktiviteleri ve bağırsak duvarlarından emilip kan dolaşımına katılmalarında antioksidanlar anahtar rol oynamaktadır. Bu tip araştırmalar için sindirim sistemi koşullarını taklit eden 'in vitro' araştırma modellerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Antioksidan alımının değerlendirilmesi için, insan epitel hücre kültürlerinin 'in vitro' modelleri kullanılmalıdır (Grajek ve ark 2005).

Ksilooligosakaritlerin antioksidan, anti-allerjik, anti-enflamatuar, antihiperlipidemik, bağışıklık düzenleyici aktivite, anti-kanser aktivite, anti-mikrobiyal aktivite, büyüme düzenleyici aktivite ve diğer biyolojik aktivitelere sahip oldukları rapor edilmiştir. Ksilooligosakkaitlerin mide-bağırsak problemleri için mikro/nano ya da hidrojelleri ilaç olarak hazırlanarak tedavi edici ya da önleyici olarak kullanılmaktadır (Kumar ve ark 2012).

Bir çalışmada deneysel olarak diyabet hastası yapılan ratlarda XOS uygulanmıştır. Uygulama sonucunda plazma glukoz, kolesterol ve kreatinin seviyelerinde düşüş seyredilmiştir (Samanta ve ark 2015). Yüksek yağlı diyet tüketimi, yüksek oksidatif stres ile birlikte hiperlipidemiye neden olur (Sreekumar ve ark 2002). Yüksek yağlı diyetten kaynaklanan oksidatif stres belirtilerini hafifletmek amacıyla diyete % 5 XOS eklenmiş. Diyete XOS eklemesi sonucunda okside glutatyon seviyesinde azalma olmuştur. Bunun yanında serum, karaciğer ve kalpte indirgenmiş glutatyon, katalaz ve süperoksit dismutaz içeriğinde arttış olmuştur (Samanta ve ark 2015). Aynı zamanda XOS kaynağı, özellikle biyomolekülün antioksidan potansiyelini etkilemektedir. Ragi kepeğinden üretilen XOS antioksidan aktivite tayin yöntemlerinde (DPPH ve sıkı bağlamak deneyi) 10 µg/ml konsantrasyonda % 12 antioksidan aktivite göstermiştir ve buğday pirinç ve mısırdan üretilen XOS karışımları 60 µg/ml konsantrasyonda % 70 antioksidan aktivite değerlerine kadar ulaşarak yüksek antioksidan potansiyel göstermişlerdir (Veenashri ve Muralikrishna 2011).

2.3. Kolon Kanseri

Kanser, dünya çapında en çok ölüm oranına sahip hastalıklarından biridir. 2012 yılında dünya genelinde 8,2 milyon kişi kanserden hayatını kaybetmiştir. Kanser, ölüm sıralamasında ise ikinci sırada yer almıştır (Anonymous-1 2012).

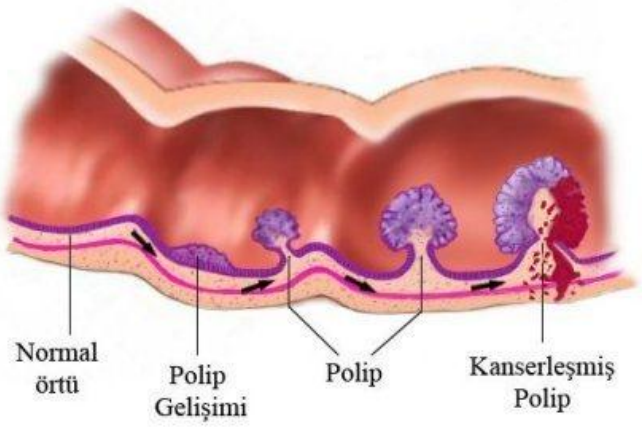
Kanser, daha çok çok-hücreli organizmalarda görülen, anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve anormal hücre yayılması ile karakterize edilen bir hastalık

grubudur (Karagöz 2011). Başka bir deyişle kanser, kontrolsüz hücre bölünmesi sonucu vücudun herhangi bir yerinde tümör oluşumu olarak tanımlanmaktadır. Kansere dış faktörler (tütün, kimyasallar, radyasyon ve bulaşıcı organizmalar) ya da iç faktörler (kalıtsal mutasyonlar, hormonlar, bağışıklık koşulları ve mutasyonlar) neden olmaktadır (Kars 2008).

Hücrede DNA hasarı meydana gelmiş ise kanser gelişebilir. Normal hücrede DNA zarar görmüşse çoğu zaman bunu tamir edebilir. Kanser hücrelerinde ise hasar görmüş DNA tamir edilmez. Solid kanserler tümör oluştururlar. Bazı kanserler, lösemi gibi tümör oluşturmaz. Bunun yerine, bu kanser hücreleri kan ve kan yapıcı organların içerisindedirler ve onlar büyüdükçe diğer dokuların içinde dolaşmaktadırlar. Genellikle, kanser hücreleri vücudun diğer bölgelerine seyahat ederek yeni dokuda büyümektedirler. Bu süreç metastaz olarak adlandırılır. Ne olursa olsun bir kanser yayıldığı bölgede tekrar yeni bir ad ile adlandırılır. Örneğin, karaciğere yayılan meme kanseri hala meme kanseri değildir, karaciğer kanseridir (Kars 2008).

Kolon, Latince kökenlidir ve sindirim sisteminin bir parçası olan kalın bağırsakların genel adıdır. Kalın bağırsakların ilk 1.5-2 metresine kolon ve son 15-20 cm' sine ise rektum ve anal kanal denir. Anal kanal anüste (kolonun vücut dışına açılan bölümü) sonlanır (Dusak 2015).

Kolon kanseri, dünyada en fazla görülme ve ölüm oranlarına sahip kanser tiplerinden biridir. Aynı zamanda 3. en sık görülen kanser türüdür. Son zamanlarda, kolon kanseri oranları beslenme alışkanlıklarının değişmesi nedeniyle artmaktadır. Bu nedenle diyet, kanserin önlenmesinde önemli bir faktördür. Gıdaların kanseri önleme etkileri çeşitli farmokolojik çalışmalara konu olmuştur. (Manosroi ve ark 2015).



Şekil.2.7. Kolon kanseri oluşma evreleri (Anonim-2 2016)

Kolon kanserleri polip olarak adlandırılan yapılar üzerinden gelişirler (Şekil 2.7.). Sağlıklı bireylerde her gün milyonlarca kalın bağırsak hücresi görevini tamamlayıp ölür ve dışkı ile dışarı atımı gerçekleşir. Bu ölen hücrelerin yerine yeni hücreler yerleşir. Genetik ve çevresel faktörlerden dolayı bu hücrelerin genetik yapılarında değişiklikler oluşması sonucu hücrelerin normal yaşam döngüsünde bozulma olur. Böylece yeni oluşan, büyüyüp gelişen ve çoğalan hücreler ölmeleri gereken zamanda ölmezler ve anormal şekilli hücreler olarak çoğalmaya devam ederler. Bulundukları kalın bağırsak bölümünde küçük bir polip (hiperplastik ve adenomatöz polipler) olarak yer edinip büyürler. Daha sonra genetik değişiklikten dolayı oluşan kanser yapıcı genler (onkogenler) sayesinde adenomatöz polipler bulundukları organları ele geçirerek kanser oluştururlar ve diğer başka organları da çeşitli yollarla ele geçirirler (Dusak 2015).

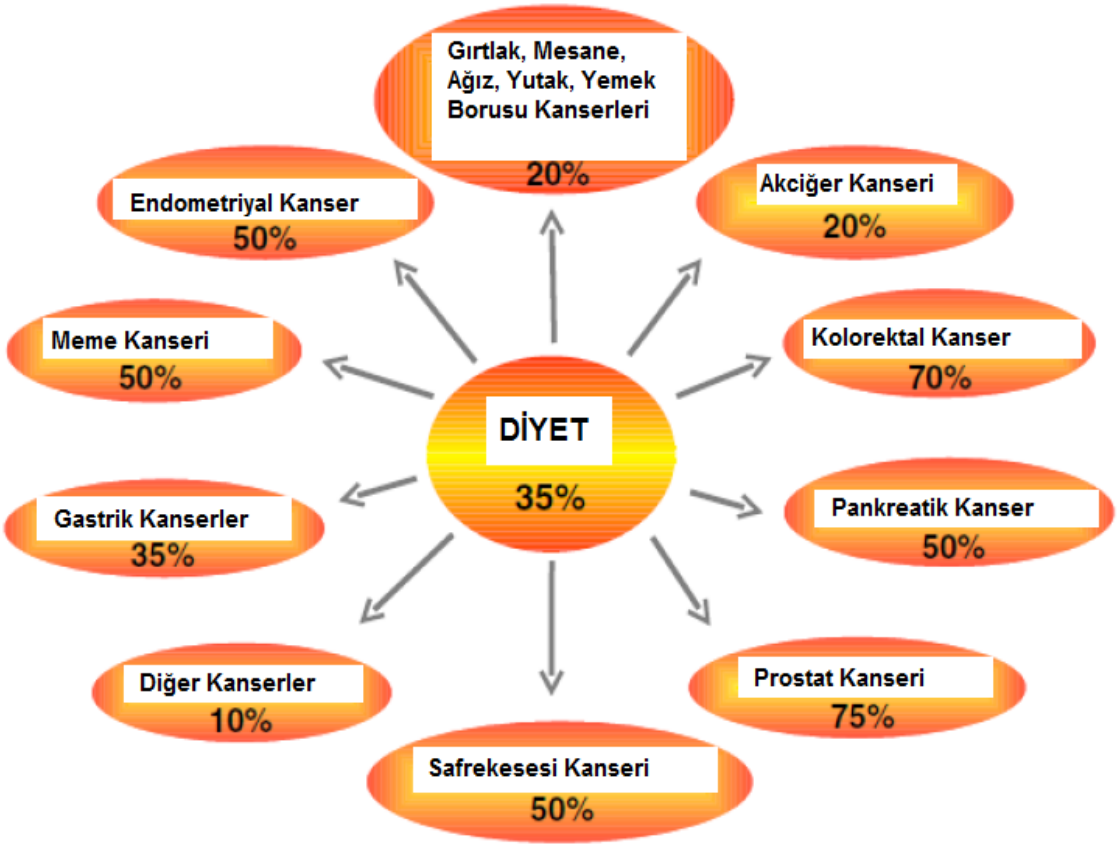
Kolon kanseri için risk faktörleri;

-Ailede kolon veya rektum kanseri hikâyesi olması,

-Kişinin kendisinde kolon, rektum, over, endometrium ve meme kanseri hikâyesi olması,

-Kolonda daha önce saptanan polip geçmişi olması, ülseratif kolit (kalın barsağın içerisindeki ülserler) ya da Crohn Hastalığı geçmişi olmasıdır (Dusak 2015).

Araştırmalara göre değişik kanser türleri beslenme faktörlerine bağlıdır ve kanser ölümlerinin % 30-35’ inden sorumlu olabileceği öne sürülmektedir. Şekil.2.8. diyetsel faktörler ve kanser türleri arasındaki ilişki görülmektedir. Diyetin kolorektal kanser üzerine etkisi oldukça yüksektir (Karagöz 2011). Hayvansal yağ alımı gibi diyet alışkanlıkları ile kolorektal kanser riski arttığı bilinmektedir (Hajiaghaalipour ve ark 2015).

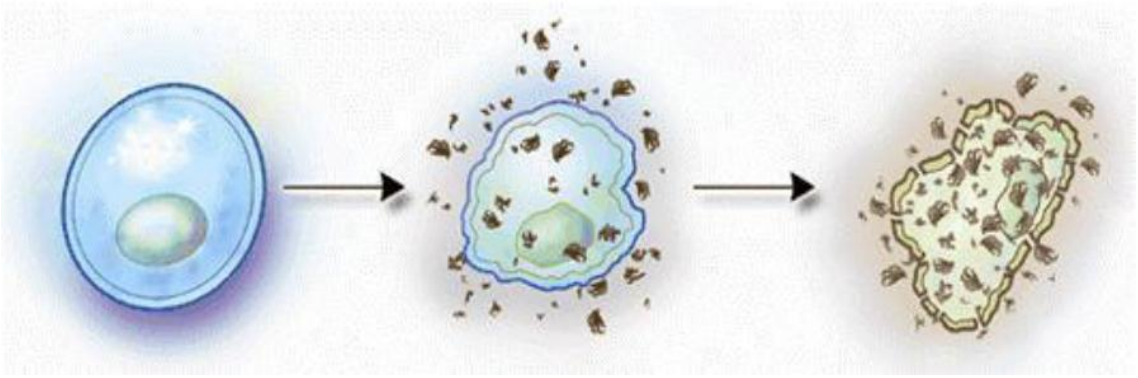


Şekil.2.8. Kanser ölümlerinin diyet ile bağlantısı (Karagöz 2011)

Kolorektal kanser için geçerli tedavi genellikle kemoterapi ile kombine edilmiş sitotoksik ilaçlar ve radyasyondur. Ancak, bu tedavi özellikle geç evre kanserler için sadece orta derecede başarılı olduğundan kolorektal kanserin tedavisinde yeni yaklaşımlar gereklidir. Son yıllarda, farmakolojik amaçlı doğal ürünler kullanımı artmıştır (Hajiaghaalipour ve ark 2015).

2.4. Oksidatif Stres ve Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 Kodlayan Gen (*NFE2L2*)

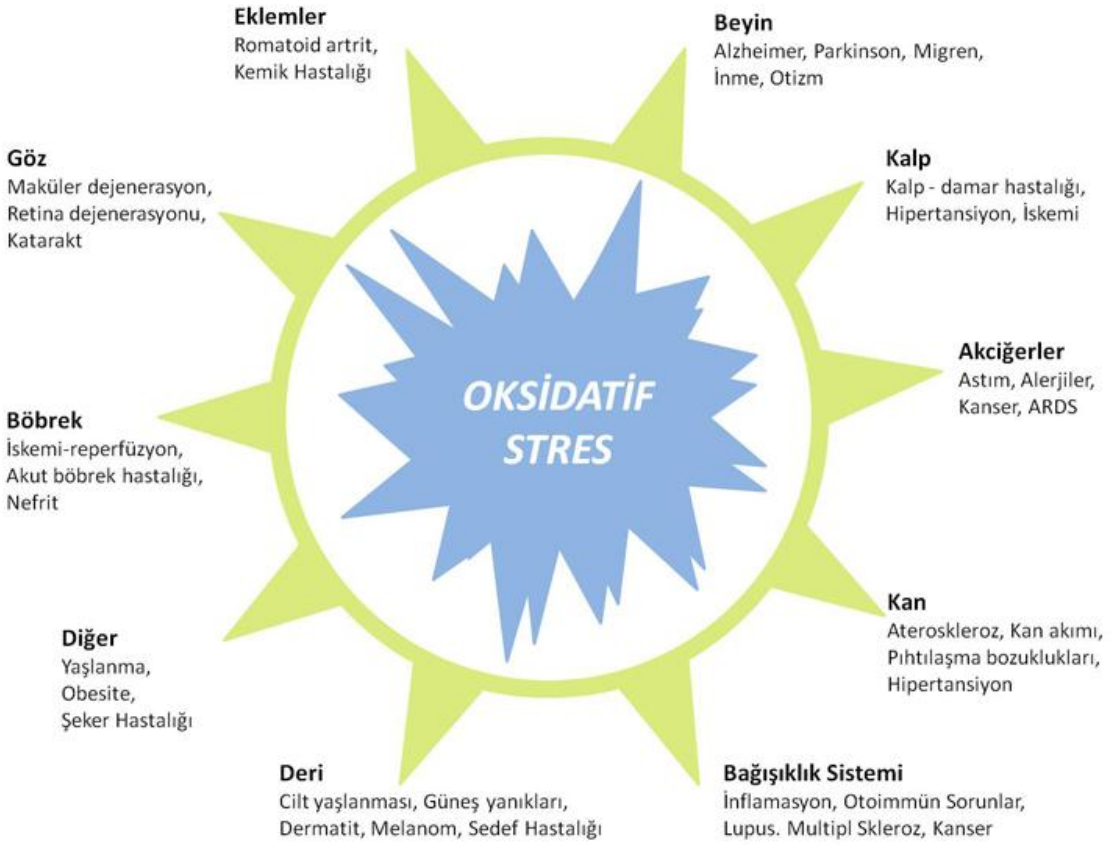
Oksidatif stres hemen hemen her dokuda meydana gelebilir ve oksidatif stresin karsinogenezde önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır. Normal biyolojik süreçte reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu ile antioksidan maddeler arasında fizyolojik bir denge söz konusudur. Düşük miktardaki ROT fizyolojik koşullarda hücrede koruyucu bir role sahiptir, ancak, reaktif oksijen türlerinin hücre içerisinde yüksek miktarlarda birikimi çeşitli hücre yapılarına zarara yol açan oksidatif stres ile sonuçlanabilmektedir (Deferme ve ark 2015).



Şekil 2.9. Oksidatif stresin hücreye etkisi (Dusak 2015)

Oksidatif stres esnasında hücre içerisinde süperoksit anyonları, hidroksil radikalleri, singlet oksijen, hidrojen peroksit, nitrik oksit radikali, hipoklorit radikali ve lipid peroksitlerinin miktarları artar. Tüm bu artış gösteren maddeler membran lipidleri, nükleik asitler, proteinler, enzimler ve diğer küçük moleküller ile reaksiyona girerek hücresel hasar oluştururlar.

Serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarı yaşlanma, kanser, ateroskleroz, artrit, kardiyovasküler hastalıklar, katarakt, bağışıklık eksikliği, karaciğer hastalıkları, iltihap, böbrek yetmezliği ve beyin bozukluğu gibi dejeneratif hastalıklar için önemli bir sebep olarak görülmektedir (Veenashri ve Muralikrishna 2011).

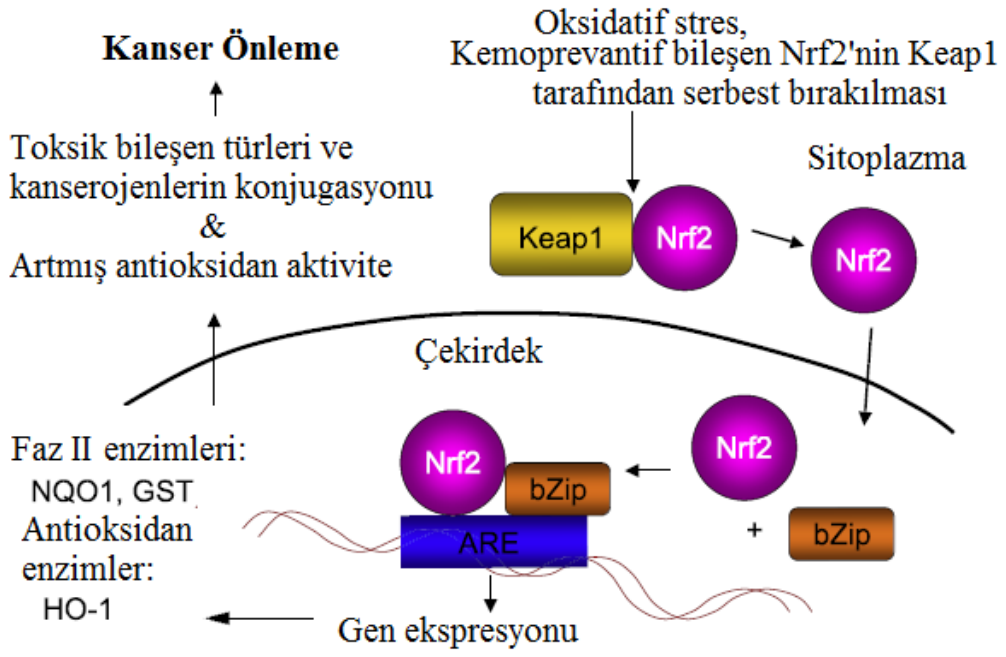


Şekil 2.10. Oksidatif stresin etkileri (Güdücü 2014)

Transkripsiyon faktörü Nrf2 (NFE2L2 geni ile ifade edilen) antioksidan ve detoksifikasyon genlerinin ekspresyonunun düzenlenmesinde çeşitli çevresel etkenlere karşı hücresel korumada önemli bir moleküldür (Morales-Marin ve ark 2015).

Oksidatif stres ile karşı karşıya gelen hücrelerde hızla artmış ROT üretimine karşı ve homeostasiziyi korumak için antioksidan kapasitenin artması gerekir. Hücreler oksidatif strese maruz kaldıklarında DNA' da genomik istikrarsızlık, neoplastik dönüşümler gibi oksidatif zararlar meydana gelebilir. Bu da hücreyi kansere götürebilir (Saw ve ark 2010). Nuclear factor erythroid 2- related factor (Nrf2) geni hücrenin homeostatik dengesinde anahtar role sahip genlerin transkripsiyonunu sağlayan önemli bir faktördür. Oksidatif stres altında Nrf2 sinyal yolağı redoks homeostazisin yeniden kurulması için çok sayıda antioksidan ve faz II enzimlerinin ekspresyonunu arttırmak için etkinleştirilir. Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), sitozol içinde sistein bakımından zengin bir protein olup, Cul3 bağımlı E3 (Cul3) ubikuitin ligaz (protein yıkımında yıkıma uğrayacak protein dizilerini tutmakla sorumlu olan tanıma elementi) kompleksi için bir adaptör protein olarak Nrf2 ile etkileşime girer. Normal şartlar altında Keap1, Nrf2' nin yayılmasını ve nihai übikütinasyonunu sağlar. Bu normal

koşullarda Nrf2'nin yarı ömrü 13-21 dakikalık oldukça kısa bir süredir. Keap1 amino asit dizisinde yer alan amino asitlerdeki sistein kalıntıları hücrede redoks durumundaki sinyalleri algılayan bir sensör olarak hareket eder. Hücredeki stres esnasında hücre Nrf2 degradasyonuna daha az teşvik edilir. Stabilize olan Nrf2 (yarı ömrü stres altında 100-200 dakikaya kadar uzatılmıştır) hücre çekirdeğine girer ve yüksek ROT seviyelerini dengelemek için antioksidan sistem bileşenleri de dahil koruyucu genlerin transkripsiyonunu aktive eder (Anonymous-5 2016). Çekirdek içine giren Nrf2 küçük MAF-aile proteinleri gibi basic leucine zipper partner proteinleri (bZIP) ile dimerleşir ve Faz II ve antioksidan promotoru olan ARE (antioxidant responsive element) üzerine bağlanırlar. Nrf2' nin hücredeki kritik rolü, oksidatif stres esnasında homeostazisi sağlamak üzere detoksifiye ve antioksidan enzimlerinin ifade edilmesini sağlayarak hücrede neoplastik transformasyonu engellemektir. Kemopreventif bileşiklerin uygulanması Nrf2-ARE ekspresyonun regülasyonu ile Faz II detoks ve antioksidan enzimlerin ifadesini artırabilir (Saw ve ark 2010).



Şekil 2.11. Nrf2 yolağının şematik gösterimi (Saw ve ark 2010)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihaz ve Sarf Malzemeler

Projede kullanılan sıvı ve liyofilize edilmiş ksilooligosakkarit karışımı (XOS) Avrupa Birliği 7. Çerçeve Programı `FP7-SME-2013-606073-LIGNOFOOD Ingredients for Food and Beverage Industry from a Lignocellulosic Source' projesi kapsamında kenevir kıymıklarından elde edilen lignoselülozdan biyoteknolojik yolla üretilip proje ortağı tarafından sağlanmıştır.

Lignoselülozik ksilooligosakkarit karışımının (XOS) kolon kanser hücre hattı üzerindeki etkisi sağlıklı kolon hücre hattı ile birlikte değerlendirilmiştir. Bu amaçla sağlıklı kolon hücre hattı olan CoN (CCD 841 CoN, ATCC® CRL-1790™) ve kolon kanseri hücre hattı Caco-2 (ATCC® HTB-37^{TM}) kullanılmıştır. Hücrelerin saklama koşulları %90 FBS , %10 DMSO içeren solüsyon içerisinde -80 °C ve ya -130 °C' nin altındaki ortamlardır. Sitotoksisite analizlerinde Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi xCELLigence (ACEA) kullanılmıştır. RNA izolasyonu için, TRI Reagent (SIGMA, ABD) ve Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanılmıştır. Reverse transcriptase (Fermentas, Revert-aid RT enzyme)(Biorad, ABD) enzimi kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır. Oksidatif stres ile ilgili olan NF2L2, β-actin genlerine spesifik primerler (Sentegen, Türkiye) kullanılarak Reverse Transkriptaz enzimi kullanılarak geri transkripsiyon ve Taq DNA polymerase enzimi (Biorad, ABD) kullanılarak da polymerase chain reaction (RT-PCR) yapılmıştır. BETA-*ACTIN* (beta-actine) geni kontrol olarak kullanılmıştır. Reverse transcription-PCR ürünleri %1.5 luk agaroz jelde (SIGMA, ABD) yürütülmüş ve jeller floresan olarak görüntülenmiş (Vilber Lourmat Gel Documentation System), ve Image J programıyla dansitometrik analizler yapılmıştır.

Tez çalışmasında kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar EK-1 ve EK-2' de verilmiştir.

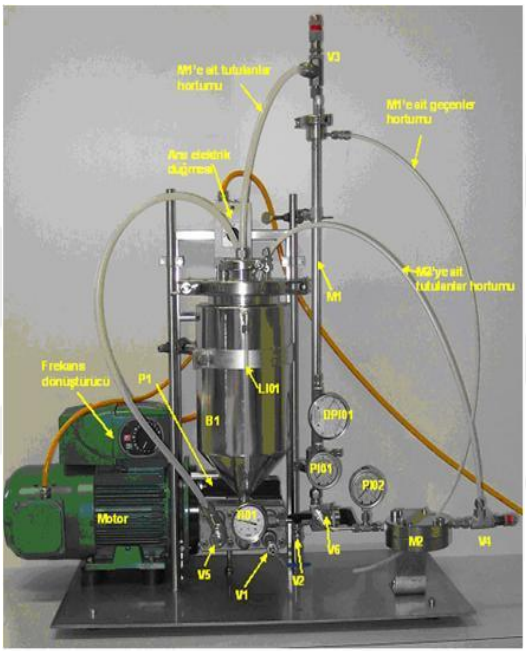
3.2. Ksilooligosakkarit Şurubunun Saflaştırılması

XOS şurubunun saflaştırılmasında membran filtrasyon, iyon değişim reçineleri ve aktif karbon kullanılmıştır. En iyi saflaştırma tekniğini test etmek amacıyla membran filtrasyon ve aktif karbon / iyon değişim reçineleri hem ayrı ayrı hem de kombine

şekilde kullanılmıştır. Saflaştırma işleminden önce XOS'ların üretimi sırasında istenmeyen ürünlerden olan HMF (Hidroksi Metil Furfural) ve furfural miktarları HPLC sisteminde analiz edilmiştir. Saflaştırma yöntemlerinin etkinliği ise saflaştırma işlemleri sonrasında elde edilen süzüntüde HMF ve furfuralın analiz edilmesiyle test edilmiştir.

3.2.1. Membran filtrasyon ile saflaştırma yöntemi

Tezde nanofiltrasyon (NF) membran seperasyonu kullanılmıştır. (Şekil 3.1)



Şekil 3.1. Seperasyon işleminde kullanılan filtrasyon sistemi

M1: Membran kaplama
M2: Düz disk membran (Ø75mm; 28 cm^2)
B1: Soğuma ve ısıtma ceketli, 5 litra kapasiteli besleme tankı
P1: Pompa. Akış aralığı: 1.8 – 12 L/dk (% 15 – 100). Basınç aralığı: mak. 40 bar
V1: Tahliye vanası, pompa girişi
V2: Tahliye vanası, pompa çıkışı
V3: M1 modülü için basınç ayarı
V4: M2 modülü için basınç ayarı
V5: Kaynak vanası
V6: Üç yollu vana
PI01 PI02: Basınç ölçer, 0 – 40bar, gliserin dolu
DPI01: M1 membran modülünün giriş ve çıkış arasındaki basınç farkı göstergesi
LI01: Besleme tankı için seviye göstergesi
TI01: Sıcaklık göstergesi, 0 – 100°C

Ham otohidroliz sıvısının nanofiltrasyonu; yüksüz organik moleküller için ~150-300 Dalton molekül ağırlığı ile karakterize edilen 44 cm^2' lik özel, ince film, düz levha

D-Serisi membran (GE Osmonics, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Membranın üretici kataloğunda belirttiği özellikleri şu şekildedir: Monovalent iyon reddi, besleme konsantrasyonu ve bileşimine bağlı iken iki-değerli ve çok-değerlikli anyonlar, tercihen membran tarafından reddedilir. Tek değerlikli iyonlar membrandan geçerken, D-Serisi NF membran sistemindeki ozmotik basıncı arttırmazlar. DL membranının $MgSO_4$' ü (25°C ve 110 psi çalışma basıncı ve pH aralığı 2-10 olduğu ortamda 24 saat sonunda) minimum % 96 reddi vardır.

Nanofiltrasyon deneylerini yürütmek için küçük ölçekli bir pilot birim kullanılmıştır. Üçlü daldırma ucu membran modülüne sıvı beslemek için kullanılmıştır. Basınç membran modülünün giriş ve çıkışında gözlemlenmiş ve membran modülü yanında yer alan bir iğne valfi, istenen işlem sırasında transmembran basıncı elde etmek için kullanılmıştır. Ön deneyler ile optimum transmembran basıncının 10 bar olacak şekilde tam geri beslemeli olarak gerçekleştirilmesine karar verilmiştir. Sisteme 1 litre fermantasyon şurubundan ilk besleme yapılmıştır. Ardından proses tam beslemeli olarak kapalı sistem şeklinde 5 saat boyunca devam ettirilmiştir.

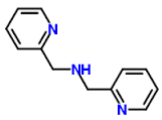
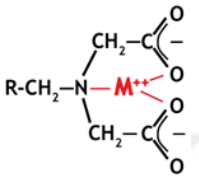
3.2.2. İyon değişim reçineleri, aktif karbon adsorpsiyonu ve hibrit sistem yöntemleri

Nanofiltrasyon işleminden sonra ikinci pürifikasyonu metodunda ticari olarak temin edilen iyon değişim reçineleri (Purolite C160, Dow Xus 43578, Diaion CR11, Dowex-HCR W2) ve aktif karbon (Merc AC) adsorpsiyon sistemleri uygulanmıştır. Uygulama şu şekilde gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon sıvısından 5 deney kabına 25' er ml olacak şekilde ölçülerek alınmıştır. Fermantasyon sıvılarının üzerlerine ayrı ayrı iyon değişim reçineleri ve ya aktif karbondan 0.1 gram ilave edilmiştir. Deney kapları balık yardımıyla manyetik karıştırıcılarda 3 saat boyunda karıştırılarak oda sıcaklığında bekletilmiştir. İşlem sonunda karışımlar filtre kâğıdı yardımıyla süzülerek ölçümler yapılmıştır.

Nanofiltrasyon + iyon değişim reçineleri/aktif karbon hibrit sistemi ise 3. pürifikasyon işlemi olarak gerçekleştirilmiştir. Pilot tesisimizdeki nanofiltrasyon membranından 100 ml süzüntü alınmıştır. Süzüntüden 3 ayrı deney kabına 25 ml olacak şekilde bölünmüştür. Süzüntülerin üzerlerine ayrı ayrı 0.1 gram reçine/ aktif karbon (Purolite C160, Dowex-HCR W2, Merc AC) ilave edilmiştir. Deney kapları balık yardımıyla manyetik karıştırıcılarda 3 saat boyunda karıştırılarak oda sıcaklığında

bekletilmiştir. İşlem sonunda karışımlar filtre kâğıdı yardımıyla süzülerek ölçümler yapılmıştır.

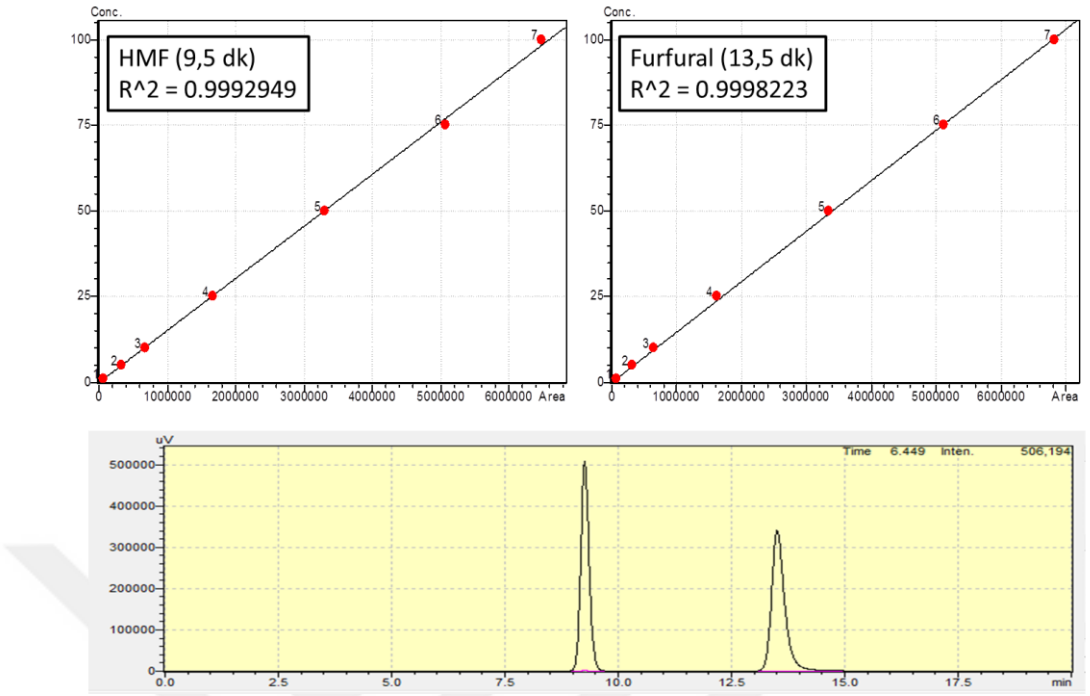
Çizelge 3.1. Kullanılan iyon değişim reçineleri

Uygulanan madde, Firma	Matriks	Fonksiyonel Grup	Asit-Baz Karakteristiği
Dow Xus 43578, Dow Chemicals	Macrostyrene	Bis picolylamine 	Şelatlayıcı reçine
Diaion CR11, Mitsubishi Chemical	Polystyrene	Iminodiacetic acid 	Şelatlayıcı reçine

3.2.3. XOS şurubundaki HMF ve furfuralın HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) analizi

HMF ve furfural miktarları HPLC (Shimadzu, Japan) (Model SPD-20A/20AV) sisteminde belirlenmiştir. Sabit faz olarak Inertsil ODS-3 (5µm 4.6 x 250) kolonu ve hareketli faz olarak methanol/su (%50 (v/v)) kullanılmıştır. Furfural ve HMF analizleri 40 °C sıcaklıkta ve 1 ml/dk akış hızında UV-VIS dedektör ile 283 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Tüm maddeler ve mobil faz kullanımdan önce 0.22 µm filtrelerden (Millipore FH membran Bedford, MA) geçirilmişlerdir. Elüentlerin hazırlanması için, ultra saf su (Milli-Q Synthesis A10 system; Millipore, Billerica, MA) kullanılmıştır. Bir maddenin HPLC sisteminde analizinin gerçekleştirilebilmesi için maddenin sisteme verilerek alıkonma süresinin ve optimum analiz koşulların belirlenmesi ve sonrasında kalibrasyon eğrisinin çizilmesi gerekmektedir. HMF ve furfurala ait kalibrasyon eğrileri Çizelge 3.2. de verilmiştir. HMF ve furfural standart çözeltileri karışım olarak ultra saf su içerisinde hazırlanmıştır. HMF ve furfural standartlarının karışım çözeltileri 1, 5, 10, 20, 25, 75, 100 ppm konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. Tüm çözeltiler kısa süreli saklama koşulu -4℃, uzun süreli saklama için -20℃' de depolanmışlardır.

Çizelge 3.2. Furfural ve HMF ‘ye ait kalibrasyon grafikleri



3.3. Ham XOS Şurubu’ nda Antioksidan Aktivitenin DPPH Metodu ile Belirlenmesi

Antioksidan aktiviteyi belirlemek için DPPH (SIGMA) metodu kullanılmıştır. DPPH ölçümleri 517 nm dalga boyunda ELISA okuyucu (Biotek) ile gerçekleştirilmiştir. DPPH çözeltisi 10 mg DPPH katısından (Sigma, ABD) 50 ml metanolde (% 99) çözdürülmüş (510 µM) stok olarak hazırlanmıştır. Stok çözeltiden 19,6 ml alınmış ve 50 ml’ ye tamamlanarak (200 µM) deney çözeltisi hazırlanmıştır. Stok ve deney çözeltileri ışıktan etkilenmemeleri için alüminyum folyo ile sarılmıştır. Standart olarak L-askorbik asit kullanılmıştır. 80 mg L-askorbik asit tartılmış ve 1 ml distile suda çözündürülerek 80 mg/ml’ lik stok çözeltisi elde edilmiştir. Kurutulmuş XOS maddesinden 60 mg tartılmış ve 1 ml distile suda stok çözeltisi hazırlanmıştır. Deney konsantrasyonları L-askorbik asit için 200 µg/ml-0.0976 µg/ml arasındaki ve XOS için 7.5 mg/ml-0.0147 mg/ml arasındaki seri dilüsyonlar şeklinde hazırlanmıştır (Lu ve ark 2014).

Deney iki aşamalı olarak yapılmıştır. İlk aşamada 2 ml’lik eppendorf tüplere 0.6 ml (3 tekrarlı) her bir konsrastrasyondan dağıtılmıştır. Çözeltilerin üzerlerine 200 µM’lık DPPH çözeltisinden 0.2 ml eklenmiş ve 30 sn vortekslenmiştir. Ardından her tüpten 50 µl çözelti 96 kuyucuklu plakalara mikro pipet yardımıyla aktarılmıştır. 517

nm' de multi-well plaka okuyucuda 0. dk ölçümleri alınmıştır. Plaka alüminyum folyo ile kapatılıp karanlıkta oda sıcaklığında 30 dk inkübasyona bırakılmış ve 30. dakikada tekrar ölçüm alınmıştır. Deneyin ikinci aşamasında ise 2 ml'lik eppendorf tüplere 0.6 ml (3 tekrarlı) her bir konsantrasyondan dağıtılmıştır. Çözeltilerin üzerlerine 0.2 ml metanol (% 99) eklenmiş ve 30 sn vortekslenmiştir. Ardından her tüpten 50 µl çözelti 96 kuyucuklu plakalara mikro pipet yardımıyla aktarılmıştır. 517 nm' de multi-well plaka okuyucuda ölçümleri alınmıştır. İnhibisyon değerleri Eşitlik 3.1'e göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_{DPPH}-A_{örnek})/A_{DPPH}] \times 100 \qquad (3.1)$$

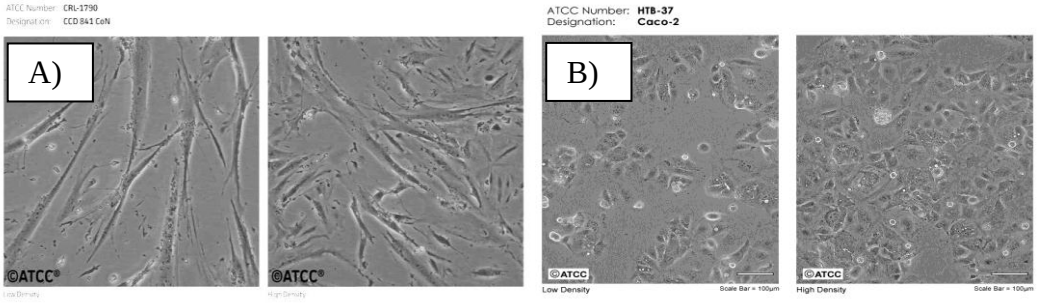
A_{DPPH} = DPPH (50 µM) çözeltisinin soğurma değeri

$A_{örnek}$ = (Örneğin 30. dakikadaki soğurma değeri- Örneğin 0. dakikadaki soğurma değeri)

3.2. Normal Kolon ve Kolon Kanseri Hücrelerinde XOS' un Moleküler Etkilerinin Belirlenmesi

3.2.1. Hücre kültürü

CoN (CCD 841 CoN, ATCC® CRL-1790™) insan normal kolon epitel hücresine model bir hücre hattıdır. Kökeni 21 haftalık gebelikten elde edilmiş dişi fetüstür. Caco-2 (ATCC® HTB-37^{TM}) ise 72 yaşında yetişkin bir erkek bireyden elde edilmiş kolon epitel kanserine model hücre hattıdır (http://www.lgcstandards-atcc.org).



Şekil 3.2. Hücre hatlarının mikroskop altında morfolojik görüntüleri A) CoN hücre hattı B) Caco-2 hücre hattı (http://www.lgcstandards-atcc.org)

Hücrelerin üretilmesi ve pasajlanması

CoN hücre hattı, % 20 FBS (Fetal Dana Serum Biological Industries (FBS) (041271A) – İsrail) ve % 1 penicillin- steptromycin (BioChrom – Almanya) içeren DMEM-F12 (BioChrom FG-4815 – Almanya) ortamında büyütülebilmektedir. Caco-2 hücre hattı, % 20 FBS (Fetal Dana Serum Biological Industries (FBS) (041271A) – İsrail) ve % 0.1 gentamicin sulfate solution (Biological Industries – İsrail) içeren RPMI-1640 (BioChrom FG-1215- Almanya) ortamında büyütülebilmektedir.

Çizelge 3.3. CoN ve Caco-2 hücrelerinin üretileceği kültür ortamını içeriği

Madde	**Miktar**	**Firma – Ülke**
Penicillin- Steptromycin (10.000U/ml/ 10.000 µg/ml)	%1	BioChrom – Almanya
Gentamicin Sulfate Solution	% 0.1	Biological Industries – İsrail
Fetal Dana Serum (FBS) (041271a)	%20	Biological Industries – İsrail
DMEM-F12 Hücre Ortamı (FG-4815) (CoN)	500 ml	BioChrom – Almanya
RPMI-1640 Hücre Ortamı (FG-1215) (Caco-2)	500 ml	BioChrom – Almanya

Kültürlerde çoğalan hücreler, hücre besi ortamı içerisindeki besleyici ajanları yüksek oranda tükettikten ya da flask içerisindeki üreyebilecekleri yüzeyin tamamını kullandıktan sonra proliferasyon hızlarını gittikçe kaybetmektedirler ve zamanla hücrelerin yüzeyden kalkmaları ve ölümleri gerçekleşmektedir. Bu dönemde kültürün bölünmesi yapılması gereken en doğru işlemdir ve bu işleme "pasajlama" adı verilmektedir (Koygun 2015). Tek katmanlı kültür ortamında geliştirilen hücreler ile yapılan kültür çalışmalarında öncelikle hücrelerin kültür kabındaki gelişme yüzeyinden ayrılmaları ve birbirlerine yapışarak oluşturdukları agregatlarının parçalanması gerekir. Bu işlemler fiziksel, enzimatik ya da kimyasal yöntemlerle mümkün olmaktadır.

Çizelge 3.4. Hücre kültürü uygulamalarında kullanılan gereçler

Kullanılan Gereç	**Firma – Ülke**
Steril Hücre Kültür Kabı (25 cm2)	Cellstar – Almanya
Steril Hücre Kültür Kabı (75 cm2)	Cellstar – Almanya
2, 5, 10, 25 ml hacimli otomatik pipetler	Thermo Scientific- ABD
Thoma-lamı	Bright-line ABD
İnvert mikroskop	Leica – Almanya
%99.9 Dimetilsülfoksit (DMSO)	AppliChem-Almanya
%0.05 / % 0.02 (w/v) Tripsin-EDTA (03-052-1B)	Biological Industries – Israil

Pasajlama işlemi esnasında flask içinden besi ortamı çekilmiştir. Flask tipine uygun miktarda tripsin ile ortamda bulunan hücre atıklarının uzaklaştırılması amacıyla yıkama yapılmıştır (T25: 0,5 ml; T75: 1 ml). Tripsin verilmiş ve tüm yüzeyden hızlıca geçirilip tek kullanımlık steril cam pastör pipet ile ortamdan uzaklaştırılmıştır. Flask tipine uygun miktarda tripsin (T25: 1ml; T75: 1,5 ml) eklendikten sonra flask 37 ^{o}C de % 5 CO_2' li inkübatörde 5-7 dk inkübasyona bırakılmıştır. Mikroskop altında kalkma durumu incelenmiştir. Hücrelerin tamamı yüzeyden kalkmıştır. 10 ml besi ortamı ile flask içindeki hücrelere pipetaj yapılmıştır. Bu işlem yardımıyla homojenizasyon ve agregatların (hücre öbeklerinin) dağıtılması sağlanmıştır. Oluşan bu süspansiyonun içinden 1 ml çekilmiş ve aktarılacağı flaska alınmıştır. Üzeri flaska uygun miktarda besi ortamı ile tamamlanmıştır.

Hücrelerin sayılması

Hücre sayımı işlemi hücre süspansiyonunun yoğunluğunun belirlenmesi ve yapılacak uygulama esnasında gerekli olan hücre sayısını elde etmek için yapılmaktadır. Hücre sayımı için Thoma lamı kullanılmıştır. Sayım işlemleri için öncelikle hücre süspansiyonu homojen hale getirilmiş ve hücre süspansiyonundan 900 µl alınıp üzerine 100 µl trifan mavisi eklenip Thoma lamı ile üzerine yerleştirilmiş olan lamelin arasındaki oluğa pipetleme ile süspansiyonun yayılması sağlanmıştır ve mililitredeki hücre sayısını belirlemek için ise aşağıdaki formül kullanılmıştır:

Hücre sayısı / mL= Hücre sayısı (tüm lam üzerinde sayılan) $x\ 10^4$ (3.2)

Hücrelerin dondurulması ve çözdürülmesi

Hücre kültürü çalışmalarında hücre hatlarının kısa veya uzun süreli depolanması farklı nedenlerden dolayı bir gereklilik olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenler;

- hücre hatlarının korunabilmesi,
- pasaj sayısının ilerlemesine bağlı fenotipik ve genotipik değişimlerin önlenmesi;
- ayrıca bu çalışmalar sırasında güvenli olarak geriye dönebilme seçeneğinin sağlanabilmesi.

Hücrelerin depolanabilmesi ve saklanabilmesi için en uygun yöntem -80˚C veya -130˚C'nin altında dondurulması işlemidir. Dondurma işlemi esnasında hücrenin organellerinin korunması için dimetilsülfoksit (DMSO) ya da gliserol gibi

kriyoprotektan ajanlar kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan ajanlar suda eriyebilen maddelerdir; donma sürecinde oluşan buz kristali miktarını ve elektrolit konsantrasyonundaki artışı kontrol ederek optimal değerlerin üzerine çıkmasını engellemektedirler.

Dondurma işlemi için ilk olarak hücreleri yüzeyden kaldırabilmek amacıyla; 25cm^2'lik kültür kapları için 2 ml %0.05/%0.02(w/v) Tripsin-EDTA (Trypsin-Ethylenediaminetetraacetic acid – Tripsin-Etilendiamintetraasetik asit) yıkamasının ardından 2 ml %0.05 / %0.02(w/v) Tripsin-EDTA uygulanmıştır. Hücreler 37˚C'de 5-6 dakika süreyle inkübatöre bırakılmıştır. Hücreler inkübatörden çıkarıldıktan sonra mikroskop altında kültür kabından ayrıldıkları gözlenip, 3- 4 ml tam besiyeri (serum içeren) ilave edilmiş ve sonrasında pipetaj işlemi ile homojen hale getirilmiştir. 1500 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra elde edilen hücre pelletinin üzerine 1 ml; %90 FBS , % 10 DMSO içeren solüsyonun ilavesinin ardından kriyo tüplere aktarılarak bir gece -20˚C ve daha sonra da -80˚C'deki derin dondurucuya, daha sonra da sıvı azot tankına kaldırılmıştır. Donmuş olarak saklanan hücreler daha sonra çözündürülerek yeni kültürler hazırlanabilmektedir. Bu işlem esnasında ekstrasellüler ortam intrasellüler ortamdan önce çözülmekte ve ani olarak serbest sıvı salınmakta ve sonuçta hipotonik hücreler şişerek patlamaktadır. Bu olumsuzlukların önüne geçebilmek için çözdürme işlemi olabildiğince hızlı yapılmalıdır. Çözdürülecek olan hücreler -80˚C derin dondurucudan çıkarılır çıkarılmaz 37˚C'lik inkübatörde çözünene kadar (yaklaşık 1-2 dakika) bekletilmiştir. Ardından falkon tüp içerisinde bulunan 6 ml 37˚C'ye ısıtılmış besiyeri içerisinde süspanse edilip homojen hale getirilmiştir. 1500 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra elde edilen hücre pelletinin üzerine 6 ml besiyeri ilave edilerek homojen hale getirilmiştir. Ardından hücre kültür kabına (T25) aktarılmıştır.

3.2.2. XOS'un CoN ve Caco-2 hücrelerinin üremeleri üzerine etkilerinin belirlenmesi

Her iki hücre hattı için ayrı ayrı deneyler yürütülmüştür. XOS çözeltilerini hazırlamak için 180 mg kurutulmuş XOS tartılmış 3 ml besi yeri (serumlu) içerisinde çözdürülmüştür. Sterilizasyon işlemi için Millex GP 0.22 µm steril şırınga filtresinden geçirilmiştir. Stok çözeltiden seri dilüsyonlar halinde alt konsantrasyonlar hazırlanmıştır. E-plaka kuyucuklarına 50 µl besiyeri eklenmiştir. Kullanılacak hücreler

(Con / Caco-2) 50 µl içerisinde 10^4 hücre olacak şekilde 50 µl besi yeri içerisinde ekilmiş ve E-plaka oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Ardından E-plaka inkübatörde bulunan RTCA (Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi) cihazının plaka bölgesine yerleştirilmiştir. Hücrelerin logaritmik proliferasyon durumları 60 dakikalık zaman aralıklarında RTCA analiz cihazı ile gözlenmiştir.



Şekil 3.3. Fermente şurubun liyofilizasyonu ile elde edilen kuru XOS

Cihazın ölçüm yaptığı hücre indeksi (cell index; CI) 1'e ulaştığı zaman kuyucuklara XOS' un farklı konsantrasyonlarını (deney konsantrasyon 20 mg/ml; 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2.5 mg/ml, 1.25 mg/ml, 0 mg/ml olacak şekilde) içeren 50 µl besiyeri eklenmiştir. Kontrol kuyucuklarına ise sadece besiyeri (serumlu) eklenmiştir. XOS eklendikten sonra CI- zaman grafiğinde logaritmik faz tamamlanana kadar deneye devam edilmiş ve bu sırada CI değerlerinin ölçümü gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin XOS' a karşı geliştirdikleri cevabı ölçmek için, hücreler XOS eklenmesinden sonra 15 dakikada bir gözlenmiştir. Veri analizi xCELLigence sistemine ait bilgisayardaki RTCA yazılımıyla yapılmıştır. Deney süresince CI değerlerinin ölçümü gerçek zamanlı olarak sürmüş, RTCA yazılımı elde edilen deney verilerine göre "sigmoidal doz-cevap" grafiği çizmiştir. Belirlenen zaman dilimleri için IC_{50} değerleri ve duplike olma süresi hesaplanmıştır.

Çizelge 3.5. Sitotoksisite deneyinde kullanılan gereçler

Kullanılan Gereç	**Firma- Ülke**
xCELLigence – RTCA DP Analyzer (Model: 3X16)	ACEA, ABD
E –plate VIEW 16	ACEA, ABD
MILLEX GP 0.22 um steril şırınga filtresi	Merck, Almanya

3.2.3. XOS uygulanmış CoN ve Caco-2 hücre hatları üzerinde moleküler analizler

3.2.3.1. XOS' un CoN ve Caco-2 hücreleri kültür ortamına uygulanması ve RNA izolasyonu

RNA izolasyonunda kullanılacak hücrelerin belirli bir süre ve belirli bir miktarda XOS' a tabi tutulması gerekmektedir. Bunun için önceden yaptığımız XOS' un proliferasyona etkisini incelediğimiz deney sonucuna göre XOS' un RNA izolasyonundan önceki inkübasyon süresi 5 saat ve uygulanacak konsantrasyonları 10 mg/ml, 5 mg/ml, 1.25 mg/ml, 0 mg/ml (kontrol grubu) olarak belirlenmiştir. 100 mg kurutulmuş XOS tartılmış 10 ml besi yeri (serumlu) içerisinde çözündürülmüştür. Su banyosunda 37 C' ye ısıtılmış ve vortekslenmiştir. Steril hale getirmek amacıyla Millex GP 0.22 µm steril şırınga filtresinden geçirilmiştir. Böylece ilk konsantrasyon elde edilmiş, diğer konsantrasyonlar seri dilüsyon yapılarak elde edilmiştir.

Çizelge 3.6. RNA izolasyonunda kullanılan gereçler

Kullanılan malzeme	**Firma- Ülke**
TRI Reagent Solution	SIGMA, ABD
Rnasy Mini Kit	Qiagen, Almanya
% 100 biyolojik seviye Etanol	SIGMA, ABD
Micro 120 Santrifüj	Hettich, Almanya
Rotina 380R Ultra Santrifüj	Hettich, Almanya
Nano Drop 2000	BioTek, ABD

Kullanılacak hücrelerin sayımı yapılarak steril kültür kaplarına (25 cm^2) 10^6 hücre olacak şekilde her doz için 2 tekrarlı ekim yapılmıştır. Hücreler 24 saat 37˚C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında eski besiyerleri boşaltılmış her dozdan 5 ml olacak şekilde hücreler üzerine XOS çözeltileri uygulanmış, 5 saat 37˚C'de inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda hücrelerin besiyerleri kalkan hücreleri de kullanmak için ayrı falkon tüplerinde toplanmıştır. Kültür kaplarından pasajlanan hücreler de bu falkon tüpler içerisinde toplanmışlardır. Hücre süspansiyonları 1200 rpm'de 5 dk santrifüj ile dibe çöktürülmüş, süpernatant atılmıştır. 3 ml PBS ile süspanse edilmiş ve 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra pellet üzerine hücreyi parçalaması için 1000 µl TRI Reagent konulup dikkatlice pipetaj (10 kez) yapılıp 1 dk vortekslenmiştir. 15 dk oda sıcaklığında inkübasyonun ardından hücreler tamamen parçalanmışlardır. Parçalanmış hücre süspansiyonları 1.5 ml' lik

eppendorf tüpe aktarılmış, 12000 g (11300 rpm)' de oda sıcaklığında 10 dk santrifüj edilmiştir. RNA içeren süpernatant alınıp, diğer hücre materyallerini çokça içeren pellet atılmıştır. Süpernatant üzerine 200 µl kloroform eklenip 1dk boyunca elde çalkalanmıştır. 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 12000 g (11300 rpm)' de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj tüpü içinde 3 faz oluşmuştur (En altta pembe, ortada bulutsu süt beyaz protein fazı ve en üstte RNA'ların bulunduğu şeffaf faz). Üstte yer alan faz yeni bir 1.5 ml' lik ependorf tüpe miktarı ölçülerek toplanmıştır. Alınan üst faz ile aynı hacimde % 70' lik (V/V) etanol eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Bu faz etanol karışımı Qiagen Rnasy Mini Kit kolonu içine kolona dokunmadan tam olarak ortalayacak şekilde bırakılmış 10000 rpm' de oda sıcaklığında 15 sn santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılıp 700 µl RW1 tamponundan kolona eklenmiştir. 10000 rpm' de oda sıcaklığında 15 sn santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. 500 µl RPE tamponundan kolona eklenip 10000 rpm' de oda sıcaklığında 15 sn santrifüj edildikten sonra süpernatant atılmıştır. 500 µl RPE tamponundan kolona eklenmiş ve 10000 rpm' de oda sıcaklığında 2 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant ile birlikte 2 ml lik toplama tüpü de atılmıştır. Kolon yeni 2 ml' lik toplama tüpüne aktarılıp 14000 rpm' de 1dk sanrifüj edilmiş ve süpernatant ile birlikte 2 ml lik toplama tüpü de atılmıştır. Kolon yeni 1,5 ml' lik eppendorf tüpe aktarılmıştır. 40 µl RNase içermeyen ultra saf su eklenmiş oda sıcaklığında 10000 rpm' de 1 dk santrifüj ile RNA elute edilmiştir. Elde edilen RNA' nın kalite kontrolü Nanodrop ölçümü ile gerçekleştirilmiştir. RNA yapısı Etidyum Bromür boyaması yapılarak agaroz (% 1) jel elektroforezi (70 V, 90 dk) ile kontrol edilmiştir.

3.2.3.2. RT-PCR (Geri-transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Çalışmalardaki cDNA sentezi (reverse transcription); üreticinin talimatlarına uygun olarak (Bio-Rad) her bir tüp için toplam 5 µg RNA, 2 pmol gen spesifik primer (Sentegen Biotech, Türkiye), 200 ünite M-MuLV Reverse Transcriptase (37 °C, 50 dk) olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Özetle; RNA ve ultra saf su 9 µl olacak şekilde tüpe konulmuştur. Bunlara ek olarak 2 pmol gen spesifik reverse primer (2 µl) ve 10 mM dNTP (1µl) tüpe konulmuş ve tüp RNA süper sarmal yapısının degradasyonu için 65 °C' de 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Sonraki adımda 5X FS buffer (4 µl), 0.1 M DTT (2 µl), ultra saf su (1 µl) tüpe eklenmiştir. Reaksiyon karışımı 37 °C' de 2 dk

inkübasyona bırakılarak primer bağlanması sağlanmıştır. Son olarak 200 ünite M-MuLV Reverse Transcriptase enzimi eklenmiş ve reaksiyon tüpü 37 °C' de 50 dk inkübe edilerek sentez gerçekleştirilmiştir. Ardından 70 °C' de 10 dk inkübasyon ile sentez sonlandırılmıştır. Elde edilen cDNA -20 °C' de saklanmıştır. Primer çiftlerinin sekans listesi Çizelge 3.7.' da verilmiştir.

Çizelge 3.7. Primer Sekans listesi ve ürün boyutları

Primer	**Sekans**	**Ürün Büyülüğü**
NFE2L2 *Sense* NFE2L2 *Antisense*	5'-GCGACGGAAAGAGTATGAGC-3' 5'-GTTGGCAGATCCACTGGTTT-3'	181 bç
β-actin *Sense* β-actin *Antisense*	5'-TGAGCGCGGCTACAGCTT-3' 5'-TCCTTAATGTCACGCACGATTT-3'	120 bç

Sentezlenen cDNA RT-PCR reaksiyonu için kullanılmıştır. Reaksiyonda 1 ünite Taq DNA polimeraz 25 µl toplam hacim için kullanılmıştır. NFE2L2, β-actin genlerine spesifik primerler ekspresyon analizleri için RT-PCR reaksiyonunda kullanılmışlardır. Başlangıçta PCR koşulları döngü testleri yapılarak optimize edilmiştir. Her primer için cDNA' lar ayrı döngülerde çoğaltılmıştır. Optimal döngü koşulları belirlenmiştir. β-ACTIN geni pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. PCR reaksiyon koşulları Çizelge 3.8.' de ve PCR reaksiyon bileşenleri Çizelge 3.9.' da verilmiştir.

Çizelge 3.8. Optimize PCR koşulları

	Genler			
	CoN		**Caco-2**	
	NFE2L2	***β-ACTIN***	***NFE2L2***	***β-ACTIN***
İlk denatürasyon	94 ºC 5 dk	94 ºC 5 dk	94 ºC 5 dk	94 ºC 5 dk
Döngü sayısı	**25**	**35**	**25**	**35**
Denatürasyon	94 ºC 30 sn	94 ºC 30 sn	94 ºC 30 sn	94 ºC 30 sn
Bağlanma	56 ºC 30 sn	55 ºC 30 sn	60 ºC 30 sn	55 ºC 30 sn
Uzama	72 ºC 30 sn	72 ºC 30 sn	72 ºC 15 sn	72 ºC 30 sn
Son uzama	72 ºC 10 dk	72 ºC 5 dk	72 ºC 5 dk	72 ºC 5 dk

Çizelge 3.9. PCR reaksiyon bileşenleri. PCR reaksiyonları 25 µl hacimde gerçekleştirilmiştir.

Bileşenler	Hacim (µl)			
	CoN		Caco-2	
	NFE2L2	β-ACTIN	NFE2L2	β-ACTIN
Buffer (10X Taq buffer)	2.5	2.5	2.5	2.5
$MgCl_2$	2	2	1,5	2
dNTP (10 mM)	0.5	0.5	0.5	0.5
Sense Primer (25 pmol/ µl)	0.5	0.5	0.5	0.5
Antisense Primer (25 pmol/µl)	0.5	0.5	0.5	0.5
cDNA	3	2	3	2
Enzim (Taq DNA polimeraz)	0.2	0.2	0.2	0.2
Ultra saf su (25 µl' ye tamamla)	16.3	17.6	16.3	17.6

3.2.3.3. Agaroz jel elektroforezi ve bant yoğunluğu belirlenmesi

RT-PCR ürünlerinin kontrolü, TAE (Tris-Asetat-EDTA) buffer sistemi ile agaroz jel elektroforezinde incelenmiştir. PCR ürünleri agaroz (% 1.5) jel elektroforezi (90 V, 60 dk) ile yürütülmüş ve EtBr ile boyanarak Vilber Lourmat Gel Documentation System (Cedex, Fransa) ile görüntülenmiştir. Bant yoğunluklarının dansitometrik analizleri Image J (National Institue of Health, ABD) programı ile hesaplanmıştır. RT-PCR ürünlerinin bant yoğunlukları β-actin geni bant yoğunlukları ile normalize edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. XOS Şurubunun Saflaştırılması

Hidroliz metoduyla XOS üretildiğinde ortamda çeşitli ürünler oluşmaktadır. Bunlar; monosakkaritler, asetik asit, ekstraktif ürünler, asitte çözünebilir lignin fraksiyonları, pentoz dehidratasyonundan furfural, çözünür inorganik bileşenler, protein türevleri şeklinde listelenmektedir. Gıda olarak tüketilebilecek XOS üretmek için, otohidroliz sıvılarından, mümkün olduğunca yüksek bir XOS içeriğine sahip ve monosakaritler olmayan sakarit bileşikleri çıkarmadan rafine etmek gerekir. Ticari XOS'ların saflık derecesi % 75 – 90 aralığındadır.

İnhibitörlerin türüne ve işlemin ölçeğine bağlı olarak biyokütle hidrolizatındaki inhibitör bileşikleri uzaklaştırmak için bir dizi detoksifikasyon yöntemi mevcuttur. Bu yöntemler fiziksel (buharlaşma ve membran filtrasyon gibi), fizikokimyasal (aktif kömür, iyon değişimi, nötrleştirme, aşırı kireç haline getirme ve organik çözücüler ile ekstraksiyon) veya biyolojik (spesifik enzimlerin veya mikroorganizmaların kullanımı gibi) olabilir. Bu detoksifikasyon yöntemleri arasında adsorpsiyon, basit bir işlem olması, kolay toparlanma ve adsorbentin tekrar kullanımı nedeniyle düşük konsantrasyonlarda kimyasalların sıvı fazdan seperasyonu için uygun ve etkili bir tekniktir (Lee ve ark 2016).

Nanofiltrasyon gibi membran teknolojileri biyokütle ön ekstraktı gibi sistemlerden çözünmüş organik maddelerin konsantre edilmesi, saflaştırılması ve / veya ayrılmasında kullanılmaktadırlar (Shen ve ark 2013).

İyon değişim reçineleri ve aktif karbon adsorpsiyonu en iyi detoksifikasyon metodu olarak belirtilmektedir. Bu işlemlerin lignin türevi inhibitörlerin, asetik asitin, hidrolizat furfuralının uzaklaştırılmasını sağlayarak fermantasyon verimini önemli ölçüde iyileştirdiği bilinmektedir. İyon değişim reçinelerinin kullanımının temel avantajı, rejenere edilebilir ve etkinliği değişmeden yeniden kullanılabilir olmasıdır (Erdoğan 2007). İyon değiştiriciler, sodyum hidroksit veya hidroklorik asit gibi seyreltik kimyasallar kullanılarak kolaylıkla rejenere edilebilirler. İyon değiştirme reçineleri normalde düşük veya orta seviyelerde istenmeyen iyonları uzaklaştırmak için kullanılır. İyonik değiştiricilerin bağlanma verimliliği, boyut dışlama, reçinelerin işlevsel grubu tarafından Donnan dışlanması ve reçine matrisi ile hidrofobik etkileşimler gibi bir dizi faktörden etkilenir. Katyonik iyon değişim reçineleri önemli

miktarda şeker kaybı olmaksızın HMF ve furfural gibi hidrofobik bileşiklerin etkin bir şekilde giderilmesini sağlar. Anyonik iyon değişim reçineleri ise etkili bir şekilde asetik asidi uzaklaştırırken, monomer şeker kaybı bu reçinenin en büyük dezavantajıdır (Lee ve ark 2016). İyon değişim reçineleri ile hidrolizat içerisinden en çok adsorbe edilen iki madde hidroksimetil furfural (HMF) ve furfuraldır. Katyonik değişim reçinesi ve polimer adsorbent ile furfural HMF'dan daha kuvvetli şekilde adsorbe edilir. Aktive edilmiş karbon için ise bunun tam tersi geçerlidir (Sainio ve ark 2011).

Çalışmamızda saflaştırma işlemleri XOS fermentasyon şurubundan furfural (96.08 g/mol) ve HMF'nin (126 g / Mol) uzaklaştırılması amacıyla uygulanmıştır. Bu amaçla nano filtrasyon, iyon değişim reçineleri (DOW-XUS 43578 (Dow Chemicals) ve Diaion CR11 (Mitsubishi Chemicals)) ve aktif karbon (Merck) adsorpsiyonu kullanılmıştır. Ayrıca NF membran, iyon değişim reçineleri ve aktif karbon adsorpsiyonu ile oluşturulan hibrit sistemler de kullanılmıştır. Nanofiltrasyon, reçine – aktif karbon ve hibrit sistem ile seperasyon sonuçları Çizelge 4.1 de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Nanofiltrasyon, reçine – aktif karbon ve hibrit sistem ile seperasyon sonuçları (Tüm sonuçlar mg/100 ml olarak verilmiştir.)

	HMF	**Furfural**
Başlangıç konsantrasyonu	54.55	10.68
Nanofiltrasyon		
NF sonrası	44.90	0.05
Reçineler ve Aktif Karbon		
Prolite C160	57.28	8.23
Merck AC	0.70	-
Dowex-HCR W2	57.00	8.11
Dow-Xuss 43578	0.20	0.50
Diaion CR-11	1.50	0.20
Hibrit sistem		
NF + Prolite C160	48.15	8.65
NF + Merck AC	0.30	-
NF + Dowex-HCR W2	47.24	8.74

Nanofiltrasyon ile seperasyon sonuçları incelendiğinde, NF membranının HMF'yi gidermede etkili olmadığı (% 17.6) ancak furfuralın neredeyse tamamını (% 99.5) uzaklaştırdığı sonucuna varılabilir.

Son zamanlarda enzimatik hidroliz ve otohidroliz ile üretilen XOS'un işlenmesinde membran teknolojileri başarıyla kullanılmaktadır (Aachary ve Prapulla 2011). Yuan ve ark (2004) mısır koçanlarına kimyasal-enzimatik işlemin ardından

topaklaşma, iyon değişimi, nanofiltrasyon, kömür adsorpsiyonu ve vakum buharlaştırma ile saflaştırma yoluyla pilot fabrika ölçeğinde XOS üretimi gerçekleştirdiklerini bildirmişlerdir.

Nguyen ve ark (2012)' de yaptıkları çalışmada XOS fermantasyon şurubundan nanofiltrasyon işlemi ile furfuralı % 97 oranında ve HMF' yi % 87 oranında uzaklaştırdıklarını bildirmişlerdir.

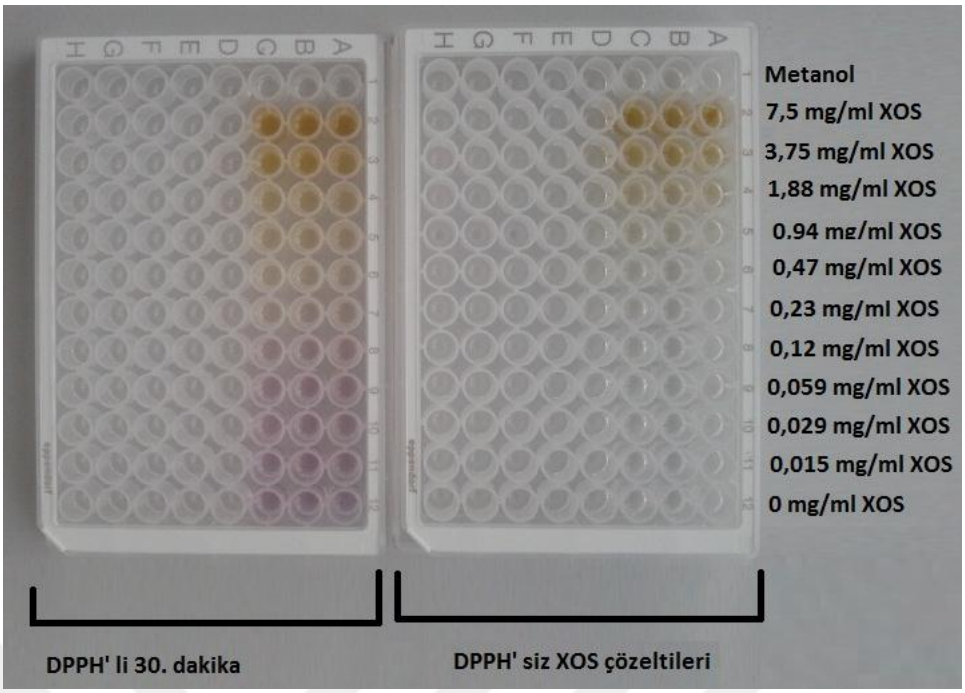
Kullanılan reçinelerin ve aktif karbonun furfural ve HMF giderme kapasiteleri incelendiğinde reçinelerden DOW XUS 43578 (% 99.6 HMF, % 95.3 furfural) ve Diaion CR11 (% 97.3 HMF, % 98.1 furfural)'in ayırmada etkili olduğu görülmektedir. Benzer şekilde Lee ve ark (2016) yaptıkları çalışmada katyonik iyon değişim reçinesi (DOWEX 50WX8) ve anyonik iyon değişim reçinesi (IRA 743) ile HMF ve furfuralın tamamını biyokütle hidrolizatının içinden adsorbe etmişlerdir.

Merck AC aktif karbon kullanımı da (% 98.7 HMF, furfural % 100) ayırmada etkili bulunmuştur. Purolite C160 ve Dowex-HCR W2 reçinelerinin ise etkili olmadığı belirlenmiştir. NF ve aktif karbonun hibrit sistem olarak kullanımı HMF 'yi % 99.3, furfuralı ise % 100 gidermiştir. Montane´ ve ark (2006), ksilooligosakkarit saflaştırma amacıyla aktif karbon adsorpsiyonu üzerinde yaptıkları çalışmada 3 çeşit aktif karbon kullanmışlardır (ROX 0.8, AC200, Darco 12 x 40). Kullanılan 3 çeşit adsorbentin de hidrolizat bileşiminden HMF ve furfuralı % 100 oranında uzaklaştırıldığı belirtilmiştir.

Eğer istenmeyen bileşiklerin ksilooligosakkarit karışımlarından ayrılması için ekonomik bir yöntem tercih edilmek istenirse, sadece DOW XUS 43578 (% 99.6 HMF, % 95.3 furfural) ya da sadece aktif karbon kullanılarak (% 98.7 HMF, % 100 furfural) HMF ve furfuralın giderilmesi sağlanabilir.

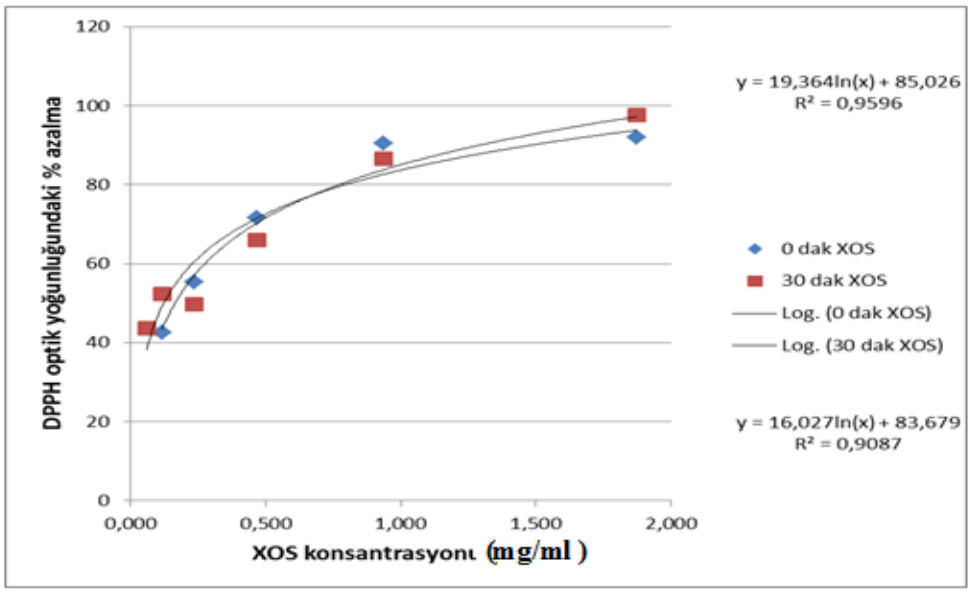
4.2. XOS' un İn-Vitro Antioksidan Aktivitesinin DPPH Metodu İle Belirlenmesi

Antioksidan aktivite DPPH radikal süpürücü etkisi temelinde değerlendirilmiştir. L – askorbik asit ve liyofilize XOS karışımlarının (Şekil 4.1.) metanol ile hazırlanan çözeltilerinin DPPH serbest radikallerinin yarısını sönümlemesi için gerekli olan IC_{50} değerleri belirlenmiştir. Şekil 4.1.' de XOS 'un farklı dozlarının DPPH ile ve DPPH' siz görüntülerinin olduğu deney düzeni verilmiştir.



Şekil 4.1. XOS 'un farklı farklı dozlarının DPPH ile ve DPPH 'siz görüntüleri

Liyofilize XOS çözeltisinin DPPH'in %50'sini söndürücü miktarı (IC_{50}), grafiklerdeki (Şekil 4.2.) logaritmik eğrinin denkleminde y değerleri yerine 50 konularak hesaplanmıştır. 0. dakikada **163.85 µg/ml** ve 30. dakikada **122.29 µg/ml** olarak bulunmuştur.

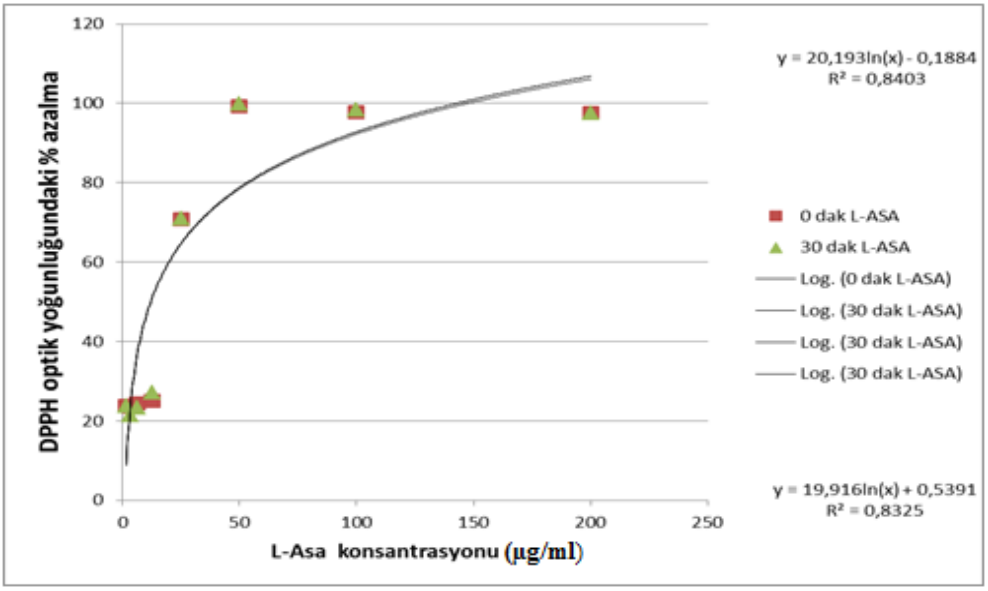


Şekil 4.2. XOS' un artan miktarlarının DPPH süpürücü etkisi

Veenashri ve Muralikrishna (2011) yaptıkları çalışmada farklı kaynaklardan elde ettikleri XOS' larda antioksidan aktiviteyi DPPH metoduyla belirlemişlerdir ve en yüksek antioksidan aktivite değerini 60 µg/ml konsantrasyonda DPPH radikalini süpürücü etkisini % 70 olarak bulmuşlardır. Bu konsantrasyon değerinin üzerinde de elde ettikleri XOS' un DPPH radikalini süpürücü etkisi % 70 olarak kalmaya devam etmiştir. Başka bir çalışmada; enzimatik hidroliz ile elde edilen hidrolizatın bileşimini ağırlıklı olarak polimerizasyon derecesi 2'den 4'e kadar olan ksilooligosakkaritler (ksilobioz, ksilotrioz ve ksilotetroz), düşük miktarlarda ise polimerizasyon derecesi 5-6 olan ksilooligosakkaritler (ksilopentoz ve ksiloheksoz) ve diğer maddeler olarak tespit edilmiştir. Hidrolizatın DPPH radikalinin % 50' sini süpürücü etkisi 600 µg hidrolizat / ml konsantrasyonda ölçülmüştür (Bian ve ark 2013).

Gowdhaman ve Ponnusami (2015) mısır koçanından elde ettikleri ksilooligosakkaritler ile yaptıkları çalışmada antioksidan süpürücü etkinin daha önceki çalışmalarından farklı olma nedenini, sakkarit kaynağına ve elde etme/saflaştırma metotlarının farklılıklarına bağlamışlardır.

L- askorbik asit çözeltisinin IC_{50} değeri çizdirilen grafiklerdeki (Şekil 4.3.) logaritmik eğrinin denkleminde y değerleri yerine 50 konularak hesaplanmıştır. 0. dakikada **11.98 µg/ml** ve 30. dakikada **12.01 µg/ml** olarak bulunmuştur.



Şekil 4.3. Askorbik asidin artan miktarlarının DPPH süpürücü etkisi

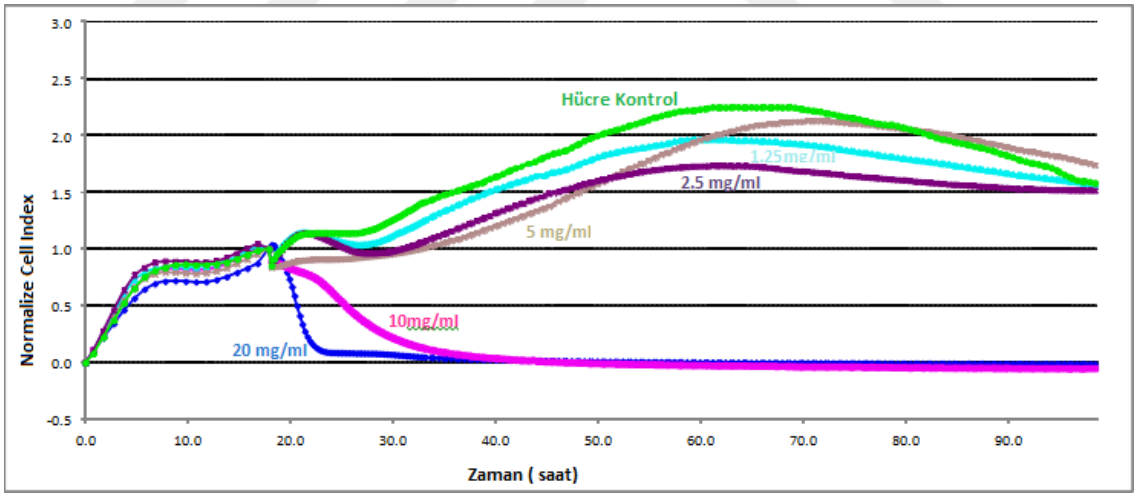
Sonuç olarak, XOS' un in-vitro antioksidan etkisi, güçlü bir antioksidan olan askorbik asidin DPPH radikalini süpürücü etkisiyle karşılaştırılmıştır. Doğal kaynaktan

elde edilen XOS' un askorbik asit kadar güçlü bir antioksidan etkiye sahip olmamasına rağmen DPPH süpürücü etkisi azımsanmayacak ölçülerde bulunmuştur. XOS'ların DPPH ile reaksiyonunun 30. dakikada 122,29 µg/mL 'lik konsantrasyonunun DPPH radikalini %50 oranında süpürdüğü gözlemlenmiştir.

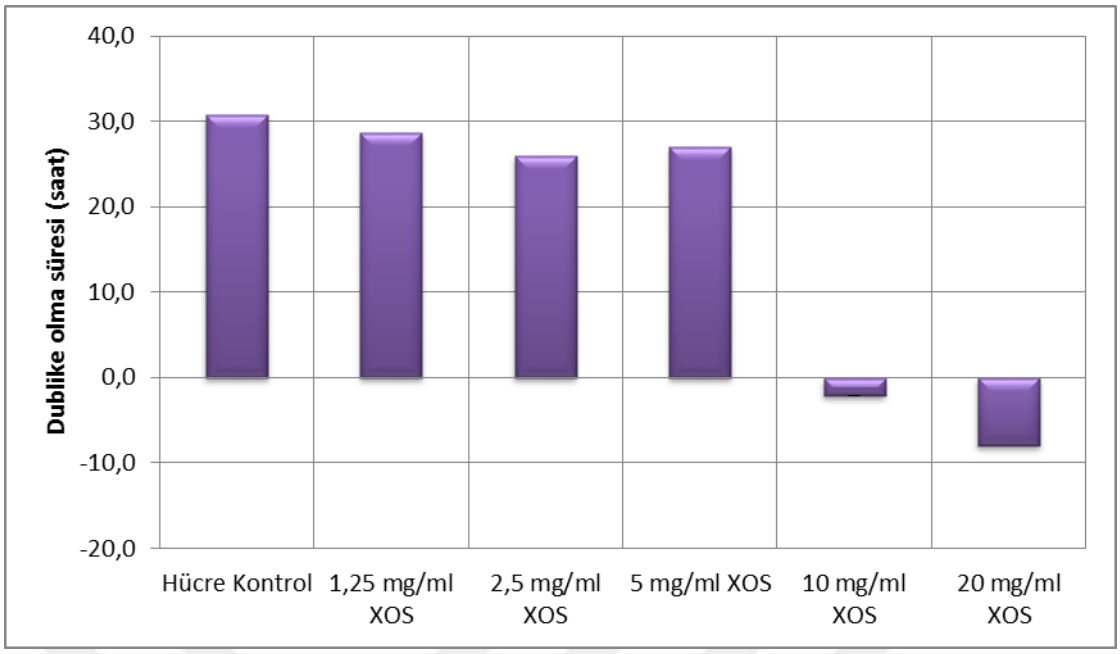
4.3. Hücre Kültürü ve Moleküler Uygulama Sonuçları

4.3.1. XOS'un CoN ve Caco-2 hücre hatları üzerinde sitotoksik ve proliferatif etkilerinin belirlenmesi

Tezde iki farklı hücre kültürü grubu kullanılmıştır. Hücreler e-plate yüzeyine yapıştıktan sonra XOS' un besiyeri içerisinde hazırlanmış farklı konsantrasyonları hücrelere uygulanmıştır ve 3 gün daha takip edilmiştir. Şekil 4.4.' de sağlıklı kolon hücresi olan CoN (ATCC® CRL-1790™) üzerine XOS' un sitotoksik etkisini gösterir "sigmoidal doz-cevap'' grafiği ve Şekil 4.5.' de duplikasyon süresini gösteren grafik verilmiştir.



Şekil 4.4. XOS' un farklı konsantrasyonları uygulanmış sağlıklı kolon hücresi olan CoN (ATCC® CRL-1790™) proliferasyon grafiği



Şekil 4.5. CoN (ATCC® CRL-1790™) dublikasyon süresi grafiği

Elde edilen grafiklere göre XOS' un 20 mg/ml ve 10 mg/ml konsantrasyonları hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermişlerdir. 1.25 mg/ml, 2.5 mg/ml, 5 mg/ml konsantrasyonları ise hücre kontrolü ile aynı değerler üzerinde kalmaya devam etmişlerdir. Herhangi bir toksik etki söz konusu olmamıştır. Ayrıca XOS' un hücre duplikasyon süreleri üzerine etkisini belirlemek için hücre sayısının ikiye katlanma süresi de hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 5 mg/ml' den daha az olan konsantrasyonlar uzun süreli maruz kalma durumları için güvenli bulunmuştur. Sağlıklı kolon epitel hücrelerinin XOS' un farklı konsantrasyonlarına maruz kaldıklarındaki duplikasyon süreleri Çizelge 4.2.' de verilmiştir.

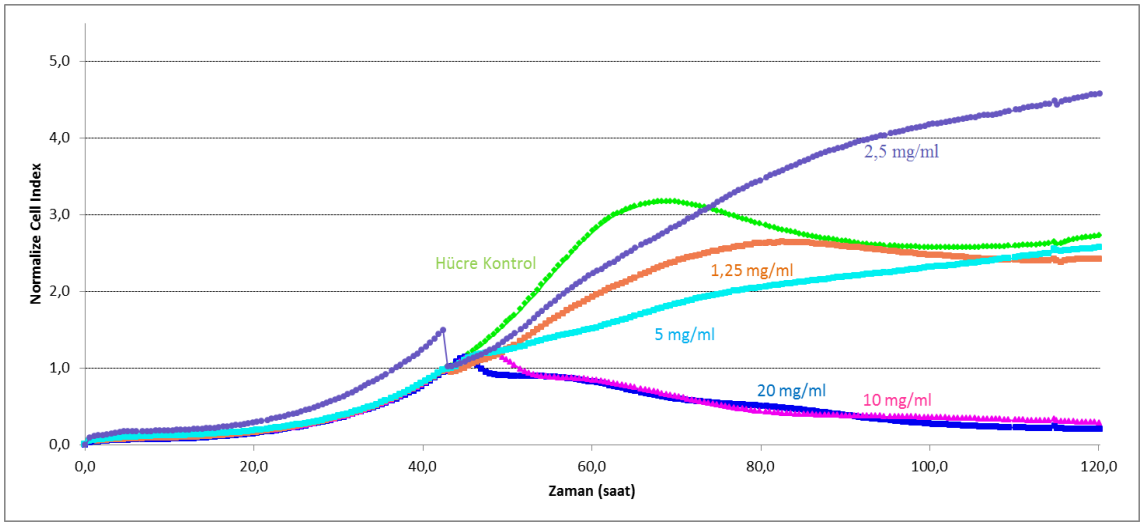
Çizelge 4.2. XOS' un farklı konsantrasyonlarına maruz kaldıklarındaki sağlıklı kolon epitel hücrelerinin duplikasyon süreleri

Hücre Grubu	**Duplikasyon süresi (saat)**	**Std sapma**
Hücre Kontrol	30.7836	0.5005
1.25 mg/ml XOS	28.7452	0.6701
2.5 mg/ml XOS	25.9716	0.3166
5 mg/ml XOS	27.0516	0.2111
10 mg/ml XOS	-2.0714	0.2828
20 mg/ml XOS	-7.9589	0.1242

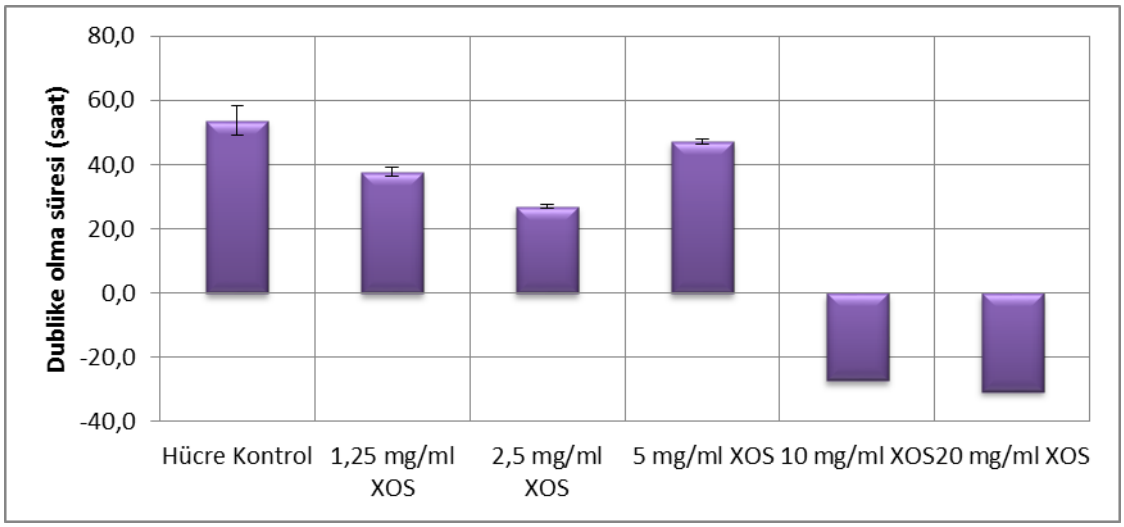
Çalışmamıza benzer şekilde Maeda ve ark (2012)' nın yaptıkları çalışmada normal insan derisi fibroblast hücresi NB1RGB, fare miyoblast hücresi C2C12 ve insan

meme kanseri hücresi MCF-7' nin 24 saat süreyle 1 mg/ml, 1.5 mg/ml XOS (Polimerizasyon derecesi 5) dozları ile tedavi edilmesi proliferasyonu önemli ölçüde etkilememiştir.

XOS' un farklı konsantrasyonları kolon epitel dokusu kanserine model olan Caco-2 (ATCC® HTB-37^{TM}) hücreleri üzerinde de incelenmiştir. Şekil 4.6.' da kanserli kolon hücresi olan Caco-2 (ATCC® HTB-37^{TM}) üzerine XOS' un sitotoksik etkisini gösterir "sigmoidal doz-cevap'' grafiği ve Şekil 4.7.' de duplikasyon süresini gösteren grafik verilmiştir.



Şekil 4.6. XOS' un farklı konsantrasyonları uygulanmış kolon epitel dokusu kanserine model olan Caco-2 (ATCC® HTB-37$^{TM)}$ proliferasyon grafiği



Şekil 4.7. Caco-2 (ATCC® HTB-37^{TM}) duplikasyon süresi grafiği

Caco-2 hücre hattı üzerinde yapılan deneylerden elde edilen grafiklere göre XOS' un 20 mg/ml ve 10 mg/ml konsantrasyonları hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermişlerdir. 1.25 mg/ml, 2.5 mg/ml, 5 mg/ml konsantrasyonları ise hücre kontrolü ile aynı değerler de kalmaya devam etmişlerdir. Herhangi bir toksik etki söz konusu olmamıştır. Ayrıca XOS' un hücre duplikasyon süreleri üzerine etkisini belirlemek için hücre sayısının ikiye bölünme süresi de hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 5 mg/ml' den daha az olan konsantrasyonlar uzun süreli maruz kalma durumları için güvenli bulunmuştur. Kanserli kolon epitel hücrelerinin XOS' un farklı konsantrasyonlarına maruz kaldıklarındaki duplikasyon süreleri Çizelge 4.3.' de verilmiştir.

Çizelge 4.3. XOS' un farklı konsantrasyonlarına maruz kaldıklarındaki Caco-2 hücrelerinin duplikasyon süreleri

Hücre Grubu	**Duplikasyon süresi (saat)**	**Std sapma (saat)**
Hücre Kontrol	53.653	4.5602
1,25 mg/ml XOS	37.7007	1.3516
2,5 mg/ml XOS	26.973	0.5421
5 mg/ml XOS	47.1936	0.784
10 mg/ml XOS	-27.1846	0.3396
20 mg/ml XOS	-30.6228	0.2802

Literatürde Ando ve ark (2004) yaptıkları çalışmada; ksiloz, ksilooligosakkarit (ksilobiyoz, ksilotrioz, ksilopentaoz) ve ayrıca bazı suda çözünür ligninler içeren ksilan parçalanma ürünlerinden oluşan karışımı kullanmışlardır. Karışımın % 25 civarında suda çözünür lignin, kalan % 75'nin ise ksiloz ve ksilooligosakkaritleri (her birinin konsantrasyonu 4-6 µg / ml aralığında) içerdiği belirtilmiştir. Kullanılan karışımın (150-200 µg / ml), akut lenfoblastik lösemi (ALL)' den türetilen lösemi hücre hatlarının (Jurkat, MOLT-4) proliferasyonunu belirgin şekilde (doza bağımlı şekilde) azalttığı tespit edilmiştir. Bu etkinin önemli oranda suda çözünen ligninden kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Buna karşılık karışımın iyi bilinen normal lenfoblast hücreleri olan miyelojenik lösemi (ML-2) ve lenfomadan (SupT-1) türetilmiş hücre hatlarının proliferasyonunu etkilemediğini ileri sürmüşlerdir.

4.3.2. XOS uygulanmış CoN ve Caco-2 hücre hatları üzerinde moleküler analizler

Bu tezde ksilooligosakkaritlerin normal ve kanserli memeli hücre hatlarında spesifik bir gen grubu üzerindeki moleküler etkilerinin gen ifadesi düzeyinde incelenmesi ilk olarak literatüre kazandırılmıştır.

4.3.2.1. Total RNA izolasyonu, kalite ve miktar kontrolü

RNA izolasyonunun ardından nükleik asit konsantrasyonu NanoDrop ile ölçülmüştür (Çizelge 4.4. ve Çizelge 4.5.). UV absorbansı DNA'nın saflığının belirlenmesinde de kullanılabilir (260 nm'de nükleik asitler, 280 nm'de de proteinler pik verir). 260/280 oranının 1.8-2 arasında olması RNA saflığını göstermektedir. Elde ettiğimiz RNA örneklerinin 260/280 değerleri de bu doğrultuda çıkmıştır.

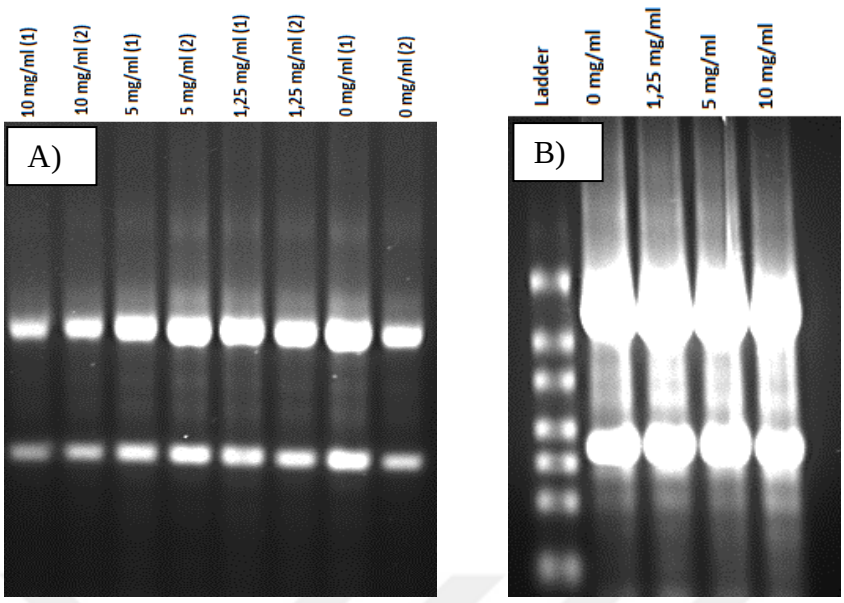
Çizelge 4.4. XOS ile muamele edilmiş CoNhücre hattı RNA örneklerinin Nano drop ölçüm sonuçları

Örnek Adı	**Nükleik asit kons. (**ng/µl)	**A260**	**A280**	**260/280**
CoN-XOS-10mg/ml(1)	190.4	4.759	2.368	2.01
CoN-XOS -10mg/ml(2)	212.9	5.323	2.637	2.02
CoN-XOS -5mg/ml(1)	259.1	6.478	3.34	1.94
CoN-XOS -5mg/ml(2)	307.6	7.69	3.919	1.96
CoN-XOS -1.25mg/ml(1)	263	6.576	3.347	1.96
CoN-XOS -1.25mg/ml(2)	251.5	6.287	3.126	2.01
CoN-XOS - 0 mg/ml(1)	291.9	7.297	3.714	1.96
CoN-XOS - 0mg/ml(2)	228.6	5.715	2.812	2.03

Çizelge 4.5. XOS ile muamele edilmiş Caco-2 hücre hattı RNA örneklerinin Nano Drop ölçün sonuçları

Örnek Adı	**Nükleik asit kons. (ng/ml)**	**A260**	**A280**	**260/280**
Caco-2-XOS - 0 mg/ml	983.7	24.6	12.0	2.04
Caco-2-XOS – 1.25 mg/ml	1043.4	26.1	12.8	2.03
Caco-2-XOS - 5 mg/ml	976.1	24.4	11.9	2.06
Caco-2-XOS - 10 mg/ml	702.5	17.6	8.4	2.08

RNA yapısı Etidyum Bromür boyaması yapılarak agaroz (%1) jel elektroforezi (60 V, 90 dk) ile kontrol edilmiştir. Jel görüntüleri Şekil 4.8. de verildiği gibidir.

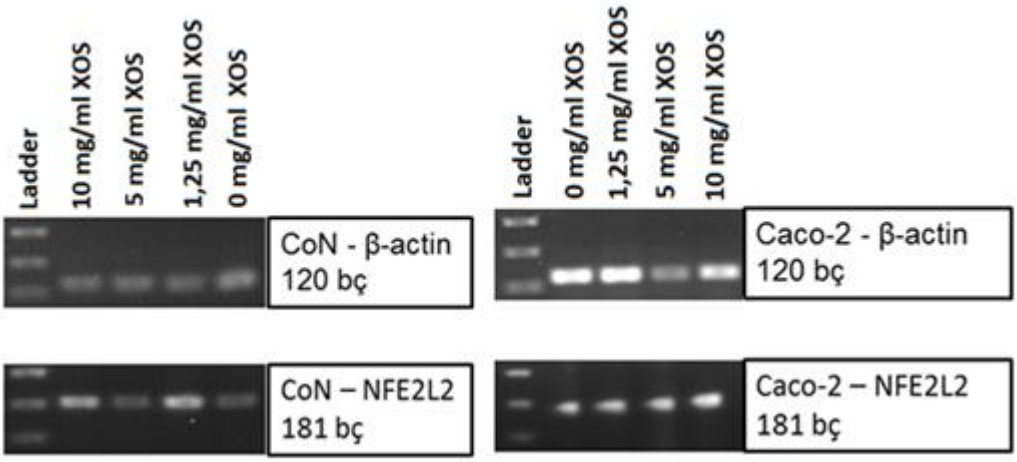


Şekil 4.8. A) CoN-XOS ribozomal RNA örnekleri, B) Caco-2-XOS ribozomal RNA örnekleri ribozomal alt birimleri (%1) agaroz jel görüntüleri

4.3.2.2. XOS uygulamasının CoN ve Caco-2 hücrelerinde Nuclear factor erythroid-derived 2) - like 2 kodlayan gen (*NFE2L2*) ifadesine etkileri

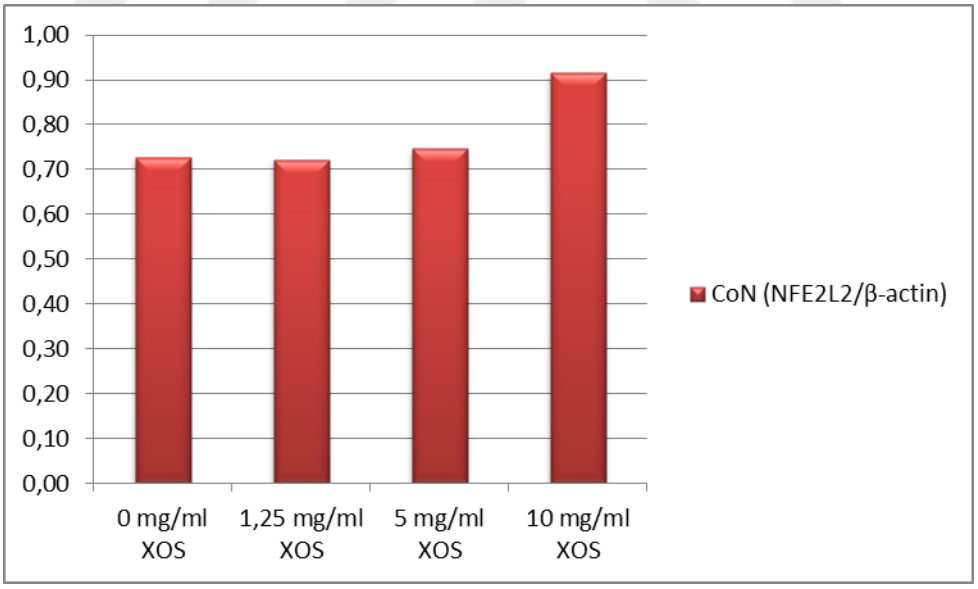
Nrf2, antioksidan, hücre koruyucu ve metabolik genleri düzenleyen bir ana transkripsiyon faktörüdür. Bu faktör; oksidatif stres, elektrofilik kimyasallar ve çeşitli fitokimyasallar gibi hücreye zararlı olan stres etkenlerine karşı hücre savunması olarak transkripsiyonel tepki başlatmaktadır. Nrf2 seviyesi, stressiz koşullarda Nrf2'yi düşük seviyede tutmak için Kelch-like ECH-associated protein1 (Keap1) tarafından modüle edilir. Bununla birlikte, stres koşulları altında, Nrf2 Keapl'den salınır ve daha sonra antioksidan, hücre koruyucu, ilaç metabolize eden enzimler ve çeşitli metabolik enzimler de dahil olmak üzere bir dizi Nrf2 tarafından regüle edilen genlerin transaktivasyonu ile çekirdek içine translokasyona girer. Oluşan yanıt sayesinde hücrenin sağ kalımı sağlanır (Samatiwat ve ark 2016).

PCR reaksiyonları için optimum döngü sayıları deneme yöntemi ile her gen için ayrı ayrı belirlenmiştir. PCR reksiyonlarında son uzama aşamasından önceki döngü sayıları CoN-NFE2L2, Caco-2-NFE2L2 için 25 döngü; Caco-2-β-actin, CoN-β-actin için 35 döngü olarak optimize edilmiştir. Optimizasyonun ardından tüm örnekler için RT-PCR yapılmıştır. Şekil 4.9.' da agaroz jel (%1.5) görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.9. CoN ve Caco-2 için PCR ürünlerinin şematik gösterimi

CoN/NFE2L2 gen ekspresyon dansitometrik oran grafiğinde artan doz miktarına göre ekspresyon seviyesinde anlamlı artış ve ya azalışlar gözlenmemiştir. Çizelge 4.6.' da CoN hücre hattı 0 mg/ml XOS kontrol grubuna göre gen ifadesindeki katlı değişim tablosu verilmiştir.



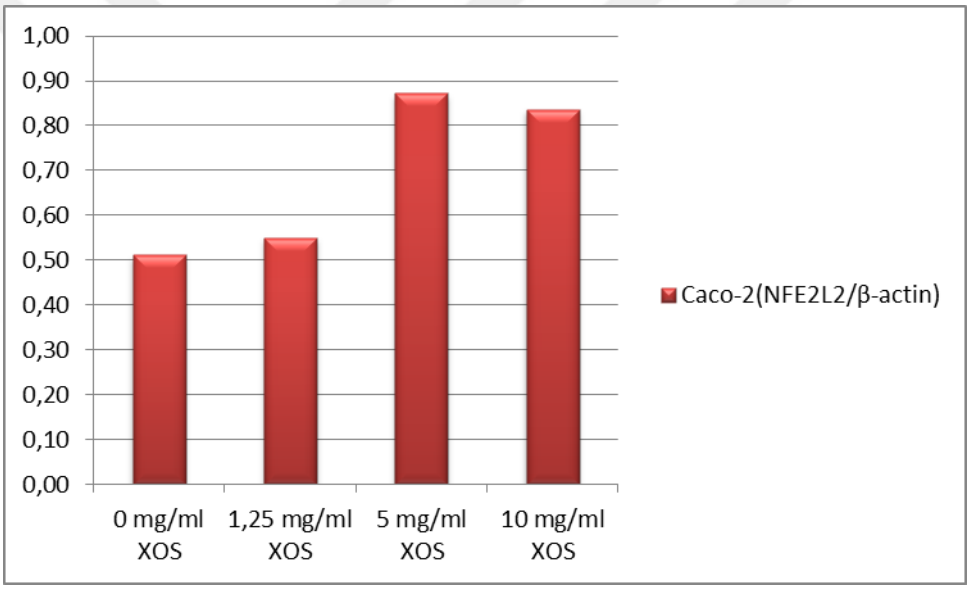
Şekil 4.10. XOS' un farklı dozlarının uygulandığı CoN hücre hattında NFE2L2 gen ekspresyonu için dansitometrik oran grafiği

Çizelge 4.6. CoN hücre hattı 0 mg/ml XOS kontrol grubuna göre gen ifadesindeki katlı değişim tablosu*

Hücre Hattı	Örnek Tipi	NFE2L2/ β-actin
CoN	0 mg/ml XOS	1.00
	1,25 mg/ml XOS	-0.99
	5 mg/ml XOS	+1.03
	10 mg/ml XOS	+1.26

*“+ “ ile ifade edilen gruplarda gen ifadesinde artış olmuştur ve “-“ ile ifade edilen gruplarda gen ifadesinde azalma olmuştur. Bu artış ve azalışlar istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Caco-2/NFE2L2 gen ekspresyon dansitometrik oran grafiğinde artan doz miktarına göre ekspresyon seviyesinde anlamlı artış ve azalışlar bulunmamıştır. Çizelge 4.7.’ de Caco-2 hücre hattı 0 mg/ml XOS kontrol grubuna göre gen ifadesindeki katlı değişim tablosu verilmiştir.



Şekil 4.11. XOS’ un farklı dozlarının uygulandığı Caco-2 hücre hattında NFE2L2 gen ekspresyonu için dansitometrik oran grafiği

Çizelge 4.7. Caco-2 hücre hattı 0 mg/ml XOS kontrol grubuna göre gen ifadesindeki katlı değişim tablosu*

Hücre Hattı	Örnek Tipi	NFE2L2/ β-actin
Caco-2	0 mg/ml XOS	1.00
	1,25 mg/ml XOS	+1.08
	5 mg/ml XOS	+1.71
	10 mg/ml XOS	+1.65

*“+ “ ile ifade edilen gruplarda gen ifadesinde artış olmuştıur ve “-“ ile ifade edilen gruplarda gen ifadesinde azalma olmuştur. Bu artış ve azalışlar istatistiksel olarak anlamlı değildir

Sonuç olarak RT-PCR yöntemiyle yapılan gen ifade analizlerinde XOS uygulamasının hem normal kolon, hem de kolon kanseri hücrelerinde oksidatif stres ve antioksidan sistem ile ilgili NFE2L2 gen ifadesinde bir değişime neden olmadığı bulunmuştur. Bu sonuca göre toksik olmayan XOS uygulamasının normal ve kansere model kolon hücrelerinde oksidatif stresi de tetiklemediği ortaya koyulmuştur.

Wang ve ark (2011) ratlar üzerinde yaptıkları canlı hayvan deneyleri ile kan seviyesindeki antioksidan enzim miktarlarını incelemişlerdir. Yaptıkları çalışma sonuçlarına göre, diyetin XOS ile desteklenmesinin lipid metabolizmasını ve antioksidan savunma sistemini modüle ederek yüksek yağlı diyetle oluşan oksidatif stresin hasarını zayıflatabileceğini ve insan sağlığı için faydalı bir etkiye sahip olduğunu düşündüklerini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da bu çalışmaya paralel olarak, toksisiteyi tetiklemeyecek düzeyde uygulanan XOS, NFE2L2 gen ifadesini tetiklememiş ve oksidatif stres oluşumu bulgusu gözlenmemiştir. Hücre kültürü analizleri ve moleküler çalışmalar, biyoteknolojik yolla kenevir kıymıklarından elde edilmiş olan prebiyotik XOS'un 5 mg/mL'ye kadar kolon hücrelerine uygulanmasının güvenli olduğu sonucunu ortaya koymaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada ortaya konan bulgulardan elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

1. XOS' un 20 mg/ml ve 10 mg/ml konsantrasyonları hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermişlerdir. 1.25 mg/ml, 2.5 mg/ml, 5 mg/ml konsantrasyonları ise hücre kontrolü ile aynı CI (Cell Index) değerlerinde kalmaya devam etmişlerdir ve herhangi bir toksik etki gözlemlenmemiştir.
2. XOS' ların hücre duplikasyon süreleri üzerine etkisi de 5 mg/ml' den daha az olan konsantrasyonlarda uzun süreli maruz kalma durumları için güvenli bulunmuştur.
3. Toksik olmayan düzeyde uygulanan XOS, NFE2L2 gen ifadesini tetiklememiş ve oksidatif stres oluşumu ile ilgili bulgular tespit edilmemiştir. Moleküler çalışmalar, kenevir kıymıklarından biyoteknolojik yollarla elde edilmiş olan prebiyotik XOS karışımının 5 mg/mL'ye kadar kolon hücrelerine uygulanmasının güvenli olduğu sonucunu ortaya koymaktadır.
4. XOS' un in-vitro antioksidan etkisi, güçlü bir antioksidan olan askorbik asidin DPPH radikalini süpürücü etkisiyle karşılaştırılmıştır. Doğal kaynaktan elde edilen XOS' un askorbik asit kadar güçlü bir antioksidan etkiye sahip olmamasına rağmen DPPH süpürücü etkisi azımsanmayacak ölçülerde bulunmuştur. XOS'ların DPPH ile reaksiyonunun 30. dakikada 122,29 μg/mL 'lik konsantrasyonunun DPPH radikalini % 50 oranında süpürdüğü gözlemlenmiştir.
5. Nanofiltrasyon ile seperasyon sonuçları incelendiğinde, NF membranının HMF'yi gidermede etkili olmadığı (% 17.6) ancak furfuralın neredeyse tamamını (% 99.5) uzaklaştırdığı sonucuna varılabilir. Eğer istenmeyen bileşiklerin ksilooligosakkarit karışımlarından ayrılması için ekonomik bir yöntem tercih edilmek istenirse, sadece DOW XUS 43578 (% 99.6 HMF, % 95.3 furfural) ya da sadece aktif karbon kullanılarak (% 98.7 HMF, % 100 furfural) HMF ve furfuralın giderilmesi sağlanabilir.

Elde edilen sonuçlar in-vitro ortam koşulları için geçerlidir. XOS'ların moleküler etkilerinin in-vivo koşullarda da belirlenebilmesi için yeni çalışmalar planlanmalıdır. Aynı zamanda moleküler analizlerde hedef gen sayıları arttırılmalı, özellikle antioksidan etkiye sahip diğer genler üzerinde de çalışılarak ksilooligosakkaritlerin hücre oksidatif stres mekanizmasını nasıl etkilediği araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

Aachary AA, Prapulla SG, 2011. Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 10, 2-16.

Aachary AA, Gobinath D, Srinivasan K, Prapulla SG, 2015. Protective effect of xylooligosaccharides from corncob on 1,2-dimethylhydrazine induced colon cancer in rats. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 5, 2, 146-52.

Ando H, Ohba H, Sakaki T, Takamine K, Kamino Y, Moriwaki S, Hatate Y, Bakalova R, Uemura Y, 2004. Hot-compressed-water decomposed products from bamboo manifest a selective cytoxicity aganist acute lymphoblastic leukemia cells. Toxicology in Vitro, 18, 765-71.

Anonim-1, 2016. Fonksiyonel gıdaların tanımı ve sınıflandırılması. Erişim adresi, http://kimyaevi.org, [Ziyaret Tarihi: 5 Mart 2016].

Anonim-2, 2016. Kolon kanseri. Erişim. Erişim adresi, http://kanserecare.net, [Ziyaret Tarihi: 25 Nisan 2016].

Anonim-3, 2016. Fonksiyonel gıda. Erişim adresi, http://food.ege.edu.tr, [Ziyaret Tarihi: 3 Haziran 2016].

Anonymous-1, 1998. Addition of nutrients to foods: nutritional and safety considerations. In ILSI Europe Report Series.

Anonymous-2, 1999. Scientific concepts of functional foods in europe consensus document. British Journal of Nutrition, 81.

Anonymous-3, 2012. GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence , mortality and prevalence worldwide in 2012. Erişim adresi, http://globocan.iarc.fr/, [Ziyaret Tarihi: 15 Mayıs 2016].

Anonymous-4, 2013. Xylooligosaccharides. Shangdong Longlive Biotechnology, Ltd.'s. Erişim adresi, www.longlivegroup.com, [Ziyaret Tarihi: 15 Mayıs 2016].

Anonymous-5, 2016. Nrf2 Antioxidant Stress Response: Managing its 'Dark Side'. Erişim adresi, http://www.caymanchem.com, [Ziyaret Tarihi: 20 Haziran 2016].

Assmann G, Buono P, Daniele A, Della Valle E, Farinaro E, Ferns G, Krogh V, Kromhout D, Masana L, Merino J, Misciagna G, Panico S, Riccardi G, Rivellese AA, Rozza F, Salvatore F, Salvatore V, Stranges S, Trevisan M, Trimarco B, Vetrani C, 2014. Functional foods and cardiometabolic diseases* International Task Force for Prevention of Cardiometabolic Diseases. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 24, 12, 1272-300.

Bian J, Peng F, Peng X, Peng P, Xu F, Sun R, 2013. Structural features and antioxidant activity of xylooligosaccharides enzymatically produced from sugarcane bagasse. Bioresource Technology, 127, 236-41.

Bostancı Ş, 2009. Tarımsal atıklardan enzimatik yolla ksilooligosakkarit üretimi Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tokat.

Boyacıoğlu D, 2016. Fonksiyonel gıda tanımı, İTÜ, İstanbul, 5-6.

Carvalho AFA, Neto PdO, da Silva DF, Pastore GM, 2013. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. Food Research International, 51, 1, 75-85.

Chung Y-C, Hsu C-K, Ko C-Y, Chan Y-C, 2007. Dietary intake of xylooligosaccharides improves the intestinal microbiota, fecal moisture, and pH value in the elderly. Nutrition Research, 27, 12, 756-61.

de Boer A, Urlings MJE, Bast A, 2016. Active ingredients leading in health claims on functional foods. Journal of Functional Foods, 20, 587-93.

Deferme L, Briede JJ, Claessen SM, Cavill R, Kleinjans JC, 2015. Cell line-specific oxidative stress in cellular toxicity: A toxicogenomics-based comparison between liver and colon cell models. Toxicol In Vitro, 29, 5, 845-55.

Dusak A, 2015. Kolon kanserli hastalarda bazı antioksidant enzim aktivitelerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van, 1-20.

Erdoğan K, 2007. Tütün saplarından ksilooligosakkarit üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tokat, 1-20.

Gowdhaman D, Ponnusami V, 2015. Production and optimization of xylooligosaccharides from corncob by Bacillus aerophilus KGJ2 xylanase and its antioxidant potential. International Journal of Biological Macromolecules, 79, 595-600.

Grajek W, Olejnik A, Sip A, 2005. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. Acta Biochimica Polonica, 52, 3, 665-71.

Güdücü F, 2014. Pyrus elaeagrifolia bitkisi ekstrelerinin fenolik madde içerikleri, DPPH radikali giderme aktiviteleri ve in vitro antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Edirne.

Hajiaghaalipour F, Kanthimathi MS, Sanusi J, Rajarajeswaran J, 2015. White tea (Camellia sinensis) inhibits proliferation of the colon cancer cell line, HT-29, activates caspases and protects DNA of normal cells against oxidative damage. Food Chem, 169, 401-10.

Hughes SA, Shewry PR, Li L, Gibson GR, Sanz ML, Rastall RA, 2007. In vitro fermentation by human fecal microflora of wheat arabinoxylans. J Agric Food Chem, 55, 11, 4589-95.

Hybertson BM, Gao B, Bose SK, McCord JM, 2011. Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. Mol Aspects Med, 32, 4-6, 234-46.

Jiménez-Colmenero F, 2013. Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. Food Research International, 52, 1, 64-74.

Karagöz A, 2011. Effects of the olive extracts on cancer cell lines, Yüksek Lisans Tezi, Fatih Üniversitesi, İstanbul, 1-10.

Kars MD, 2008. Molecular mechanisms of vincristine and paclitaxel resistance in MCF-7 cell line Doktora Tezi, ODTÜ, Ankara, 1.

Koygun G, 2015. Meme kanseri kök hücre (benzeri) kültürlerde kanser ilaçlarının etkinliğinin moleküler mekanizmalarının araştırılması Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya, 1-38.

Kumar GP, Pushpa A, Prabha H, 2012. A review on xylooligosaccharides. International Research Journal Of Pharmacy, 3, 8, 71-4.

Lee J, Guragain YN, Bastola KP, Vadlani PV, 2016. Innovative methods to generate clean sugar stream from biomass feedstocks for efficient fermentation. Bioprocess Biosyst Eng. Doi: DOI 10.1007/s00449-016-1727-1

Lim CC, Ferguson LR, Tannock GW, 2005. Dietary fibres as "prebiotics": implications for colorectal cancer. Mol Nutr Food Res, 49, 6, 609-19.

Liong MT, 2008. Roles of probiotics and prebiotics in colon cancer prevention: Postulated mechanisms and in-vivo evidence. Int J Mol Sci, 9, 5, 854-63.

Lu Y, Shipton FN, Khoo TJ, Wiart C, 2014. Antioxidant activity determination of Citronellal and Crude extracts of Cymbopogon citratus by 3 different methods. Pharmacology & Pharmacy, 5, 4, 395-400.

Maeda R, Ida T, Ihara H, Sakamoto T, 2012. Induction of apoptosis in MCF-7 cells by B-1,3-xylooligosaccharides prepared from Caulerpa lentilifera. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 76, 5, 1032-34.

Manosroi A, Akazawa H, Akihisa T, Jantrawut P, Kitdamrongtham W, Manosroi W, Manosroi J, 2015. In vitro anti-proliferative activity on colon cancer cell line (HT-29) of Thai medicinal plants selected from Thai/Lanna medicinal plant recipe database "MANOSROI III". J Ethnopharmacol, 161, 11-7.

Montane´ D, Nabarlatz D, Martorell A, Torne´-Ferna´ndez V, Fierro V, 2006. Removal of lignin and associated impurities from xylo-oligosaccharides by activated carbon adsorption. Ind. Eng. Chem. Res., 45, 2294-302.

Morales-Marin ME, Cordova EJ, Centeno F, Martinez-Hernandez A, Mendez-Garcia A, Molina B, Frias S, Orozco L, 2015. NFE2L2 Gene Variants and Arsenic

Susceptibility: A Lymphoblastoid Model. J Toxicol Environ Health A, 78, 10, 628-34.

Nabarlatz D, Ebringerová A, Montané D, 2007. Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides. Carbohydrate Polymers, 69, 1, 20-8.

Nguyen N, Fargues C, Lewandowski R, Guiga W, Lameloise ML, 2012. Assessing nanofiltration and reverse osmosis for the detoxification of fermantable solutions. Procedia Engineering, 44, 1476-78.

Ölçer Z, 2011. Prebiyotik üretimi, Doktora Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Kocaeli, 4-12.

Sainio T, Turku I, Heinonen J, 2011. Adsorptive removal of fermentation inhibitors from concentrated acid hydrolyzates of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology, 102, 6048-57.

Samanta AK, Jayapal N, Jayaram C, Roy S, Kolte AP, Senani S, Sridhar M, 2015. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 5, 1, 62-71.

Samatiwat P, Prawan A, Senggunprai L, Kukongviriyapan V, 2016. Nrf2 inhibition sensitizes cholangiocarcinoma cells to cytotoxic and antiproliferative activities of chemotherapeutic agents. Tumor Biol., 37, 8, 11495-507.

Saw CL-L, Wu Q, Kong A-NT, 2010. Anti-cancer and potential chemopreventive actions of ginseng by activating Nrf2 (NFE2L2) anti-oxidative stress/anti-inflammatory pathways. Chinese Medicine, 5, 37, 1-7.

Sevilmiş G, 2008. Bazı fonsiyonel gıdalarda tüketici kararları ve bunları etkileyen faktörlerin belirlenmesi üzerine bir araştırma Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 25-38.

Shen J, Kaur I, Baktash MM, He Z, Ni Y, 2013. A combined process of activated carbon adsorption, ion exchange resin treatment and membrane concentration for recovery of dissolved organics in pre-hydrolysis liquor of the kraft-based dissolving pulp production process Bioresource Technology, 127, 59-65.

Sreekumar J, Unikrisdnan J, Fu A, Nygren J, Shork KR, Schimke J, 2002. Impact of high fat diet and antioxidant supplement on mitochondrial functions and gene transcript in rat muscle. American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism, 282.

Tekeli Y, Sezgin M, Şanda MA, 2008. Konya'da yetişen Centaurea pterocaula truatv. 'in fenolik yapısı ve antioksidan etkisi SDÜ Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi 3, 1, 35-41.

Va´zquez MJ, Alonso JL, Domı´nguez H, Parajo´ JC, 2000. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. Trends in Food Science & Technology, 11, 387-93.

Veenashri BR, Muralikrishna G, 2011. In vitro anti-oxidant activity of xylo-oligosaccharides derived from cereal and millet brans – A comparative study. Food Chemistry, 126, 3, 1475-81.

Vieira da Silva B, Barreira JCM, Oliveira MBPP, 2016. Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: Extraction, biochemistry and protected-delivery technologies. Trends in Food Science & Technology, 50, 144-58.

Yuan QP, Zhang H, Qian ZM, Yang XJ, 2004. Pilot-plant production of xylo-oligosaccharides from corncob by steaming, enzymatic hydrolysis and nanofiltration. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 79, 1073-79.

Wang J, Cao Y, Wang C, Sun B, 2011. Wheat bran xylooligosaccharides improve blood lipid metabolism and antioxidant status in rats fed a high-fat diet. Carbohydrate Polymers, 86, 1192-97.

Wu Q, Qu H, Jia J, Kuang C, Wen Y, Yan H, Gui Z, 2015. Characterization, antioxidant and antitumor activities of polysaccharides from purple sweet potato. Carbohydr Polym, 132, 31-40.

EKLER

EK-1 Kullanılan sarf malzemeler

Kullanılan Sarf Malzeme	**Firma - Ülke**
Penicillin- Steptromycin (10.000U/ml/ 10.000ug/ml)	BioChrom - Almanya
CoN (CCD 841 CoN, ATCC® CRL-1790™)	ATCC, ABD
Caco-2 (ATCC® HTB-37^{TM})	ATCC, ABD
Gentamicin Sulfate Solution (50 mg/mL – 100 ml)	Biological Industries - İsrail
Fötal Dana Serum (FBS) (041271a)	Biological Industries – İsrail
DMEM-F12 Hücre Ortamı (FG-4815)	BioChrom – Almanya
RPMI-1640 Hücre Ortamı (FG-1215)	BioChrom – Almanya
%99.9 Dimetilsülfoksit (DMSO)	AppliChem-Almanya
%0.05 / % 0.02 (w/v) Tripsin-EDTA (03-052-1B)	Biological Industries – İsrail
Trypan blue solution (100 ml, % 0.4)	SIGMA - ABD
HMF	SIGMA - ABD
Furfural	SIGMA - ABD
Metanol	SIGMA - ABD
DPPH	SIGMA - ABD
E –plate VIEW 16	ACEA - ABD
MILLEX GP 0.22 um steril şırınga filtresi	Merck - Almanya
Milli-Q Synthesis A10 system, Millipore	Billerica - MA
Millipore FH membrane (0.22 μm)	Bedford - MA
Steril Hücre Kültür Kabı (25 cm2)	Cellstar – Almanya
Steril Hücre Kültür Kabı (75 cm2)	Cellstar – Almanya
Ksilooligosakkait Standartları (ksiloz, ksilobiyoz, ksilotrioz, ksilotetroz, ksilopentoz, ksilohekzos)	SIGMA - ABD
GE DL nanofıltratıon (nf) membrane, 47 mm sıze	GE Osmonics, ABD
DOW-XUS 43578 (Şelatlayıcı iyon değişim reçinesi)	Dow Chemicals - ABD
Diaion CR11 (Şelatlayıcı iyon değişim reçinesi)	Mitsubishi Chemical - Japonya
Merck AC	Merck - Almanya
Dowex-HCR W2 (Katyonik iyon değişim reçinesi)	Dow Chemicals - ABD
Purolite C160 (Katyonik iyon değişim reçinesi)	Purolite - ABD
TRI Reagent Solution	SIGMA, ABD
Rnasy Mini Kit	Qiagen, Almanya
% 100 biyolojik seviye Etanol	SIGMA, ABD

EK-2 Kullanılan cihazlar

Kullanılan Cihaz	**Firma- Ülke**
xCELLigence – RTCA DP Analyzer (Model: 3X16)	ACEA - ABD
Fusion FX Vilber Lourmat Gel Documentation System	Cedex, Fransa
BIO-RAD yatay-dikey-blot elektroforez sistemleri	Bio-Rad, ABD
NanoDrop 2000 Spektrofotometre	Thermo Scientific, ABD
MyCycler Personal Thermal Cycler	Bio-Rad, ABD
Micro 120 Santrifüj	Hettich, Almanya
Rotina 380R Ultra Santrifüj	Hettich, Almanya
2, 5, 10, 25 ml hacimli otomatik pipetler	Thermo Scientific - ABD
Thoma-lamı	Bright line - ABD
HPLC sistemi, Model SPD-20A/20AV	Shimadzu – Japonya
Inertsil ODS-3 (5µm 4.6 x 250) kolon	Intersil - ABD
Biorad Aminex HPX-42A kolonu (300 x 7.8 mm) kolon	Biorad - ABD
Nuaire LabGard 425S/T sınıf II Biyolojik Güvenlik Kabini	Nuaire - ABD
Leica DM IL LED, Faz kontraslı invert mikroskop- DFC295	Leica - Almanya
Işık mikroskobu, CX21FS1	Olympus - Japonya
Binder CB 150-UL karbodiyoksit inkübatörü	Binder - Almanya
NÜVE OT 90L otoklav	Nüve - Türkiye
Nüve bath sıcak su banyosu (nb9)	Nüve - Türkiye
Biotek Epoch ELISA okuyucu	Biotek - Türkiye
Hettich soğutmalı santrifüj- universal 320 R	Hettich - Almanya

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : FATMANUR AYKÜL
Uyruğu : TÜRKİYE
Doğum Yeri ve Tarihi : AKSARAY / 10.07.1992
Telefon : 05382325711
e-mail : fatmanuraykul@gmail.com

EĞİTİM

Derece		Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	:	**Plevne Lisesi, Gaziosmanpaşa, İSTANBUL**	**2009**
Lisans	:	**Selçuk Üniversitesi, Gıda Mühendisliği, Selçuklu, KONYA**	**2014**
Yan Dal	:	**Selçuk Üniversitesi, Kimya Mühendisliği, Selçuklu, KONYA**	**2014**
Yüksek Lisans	:	**Selçuk Üniversitesi, Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler, Selçuklu, KONYA**	**2017**

UZMANLIK ALANI

- HÜCRE KÜLTÜRÜ
- KONFOKAL MİKROSKOP
- MİCROARRAY YÖNTEMLERİ
- X-CELLIGENCE
- HPLC
- WESTERN BLOTTING
- ULTRAMİKROTOM
- MEMBRAN FİLTRASYON TEKNİKLERİ
- Q-PCR ve RT-PCR

YABANCI DİLLER

İngilizce **(İYİ)**

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

PROJELER VE STAJLAR

Ekim 2015- Şubat 2017

Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (İLTEK)'te "Lignoselülozik ksilooligosakkaritlerin kolon kanseri hücre hattı üzerinde moleküler etkilerinin belirlenmesi" konu başlıklı BAP projesi.

2015 Ocak - 2016 Ocak

Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (İLTEK)'te 'FP7-SME-2013-606073-LIGNOFOOD:Ingredients for Food and Beverage industry from a Lignocellulosic source' konu başlıklı Avrupa Birliği projesi.

Temmuz 2013 - Ağustos 2013

Trakya Et Ve Süt Ürünleri San. Ve Tic. A.Ş' de mühendislik stajı

Temmuz 2012 – Ağustos 2012

İstanbul Su ve Kanalizasyon İdaresi (İSKİ) Kimya Laboratuarı'nda laboratuar stajı

YAYINLAR

Uluslararası bildiriler

- Kars MD, Önecek G, **Aykül F**, Kayadibi G, Paclitaxel resistant breast cancer cell population includes considerable amount of ALDH+, CD44+, CD24-,cancer stem cell-like cells, EACR-Sponsored 3rd Anticancer Agent Development Congress, p108, May 18- 19, 2015. (Tez dışı)
- Kayadibi G, **Aykül F**, Önecek G, Ceylan A, Kars MD, Çakır M, Börüban C, Artaç H, Artaç M, Identification of response to chemotherapy and investigation of matrix metallo protease related protein expression profiles in primary breast cancer, stem cell-like cells. EACR-Sponsored 3rd Anticancer Agent Development Congress, p103, May 18- 19, 2015. (Tez dışı).
- Kars G, Kars MD, **Aykül F**, Ceylan A, Effects of carotenoids extracted from Rhodobacter sphaeroides on the proliferation of breast cancer cells: A biotechnological approach. EACR-Sponsored 3rd Anticancer Agent Development Congress, p103, May 18- 19, 2015. (Tez dışı).

Ulusal Bildiriler

- Önecek G, **Aykül F**, Cengiz E, Kars MD, Gündoğdu Y, Kepçeoğlu A, Kılıç HŞ, 5-ALA Uygulanmış Farklı Kanser Dokularına Model Hücrelerde Femtosaniye Lazer ile Fotodinamik Tedavinin Teranostik Etkilerinin Araştırılması. 18. Biyoteknoloji Kongresi, 18-19 Aralık, 2015. (Tez dışı).
- **Aykül F**, Kars MD, Kars G, Ersöz M, Lignoselülozik ksilooligosakkaritlerin kolon epitel dokusuna model hücreler üzerinde etkilerinin belirlenmesi. 18. Biyoteknoloji Kongresi, 18-19 Aralık, 2015. **(Y.L. Tezinden, Poster Bildirisi).**