

**T.C.**

**NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇEŞİTLİ GIDALARDAN İZOLE EDİLEN MAYALARIN  
ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

**Tezi Hazırlayan  
Didem BAĞIŞLIYAN**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Şahlan ÖZTÜRK**

**Biyoloji Ana Bilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Ocak 2017  
NEVŞEHİR**



**T.C.**

**NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇEŞİTLİ GIDALARDAN İZOLE EDİLEN MAYALARIN  
ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

**Tezi Hazırlayan  
Didem BAĞIŞLIYAN**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Şahlan ÖZTÜRK**

**Biyoloji Ana Bilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Ocak 2017  
NEVŞEHİR**

Doç.Dr. Şahlan ÖZTÜRK danışmanlığında **Didem BAĞIŞLIYAN** tarafından hazırlanan “**Çeşitli Gıdalardan İzole Edilen Mayaların Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi**” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

16/01/2017

### JÜRİ

Başkan : Prof.Dr. Serkan YILMAZ

Üye : Doç.Dr. Şahlan ÖZTÜRK

Üye : Doç.Dr. Zeliha LEBLEBİCİ

### ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun. 30.01/2017...tarih ve 07-38... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

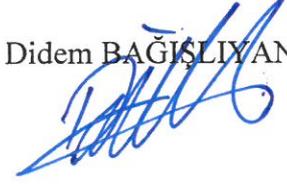
Doç. Dr. Şahlan ÖZTÜRK  
Enstitü Müdürü



## TEZ BİLDİRİM SAYFASI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada yer alan bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu ve bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Didem BAĞIŞLIYAN



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca, tez konusunun belirlenmesinde, çalışmalarımın yürütülmesi ve değerlendirilmesinde bilgi ve deneyimleriyle bana yardım eden ve desteğini esirgemeyen değerli hocam tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Şahlan ÖZTÜRK'e

Çalışmam süresince benimle düşüncelerini paylaşan, laboratuvar olanaklarını kullanabilme ve çalışma şartları konusunda desteğini esirgemeyen Uzman Enver Ersoy ANDEDEN ve Arş. Gör. Ezgi KESKİN'e,

Hayatımın her alanında yanımda olup maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen annem Naciye BAĞIŞLIYAN, babam Ahmet BAĞIŞLIYAN, abim Refik BAĞIŞLIYAN, dedem Namık UÇAR ve anneannem Necmiye UÇAR'a

Her zaman yanımda olan desteğini her an hissettiğim Hasan YILDIZ'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu çalışmaya “Çeşitli gıda maddelerinden izole edilen mayaların antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi” başlıklı Neülüp 15/2F22 No' lu araştırma projesi olarak maddi destek sağlayan Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Rektörlüğü' ne minnettar olduğumu belirtmek isterim.

# ÇEŞİTLİ GIDALARDAN İZOLE EDİLEN MAYALARIN ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Didem BAĞIŞLIYAN

NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2017

## ÖZET

Bu çalışmada çeşitli gıdalardan izole edilen probiyotik özellikteki mayaların antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Yoğurt, peynir, salça, pekmez, tereyağı, turşu suyu, zeytin suyu, şarap, kombu, acılı, üzüm mayası ve kefir gibi gıdalardan 42 adet izole edilerek en iyi aktiviteyi gösteren izolatlar API 20C AUX (biomerieux) sistemi ile tanımlanmıştır. Mayaların antioksidan aktiviteleri DPPH radikali indirgenmesi, metal iyonları şelatlama ve total fenol miktarı metotları ile belirlenmiştir. Antioksidan aktiviteleri araştırılırken parçalanmamış maya hücreleri ve parçalanmış maya hücreleri için ayrı ayrı metotlar uygulanmıştır. Parçalanmamış maya hücrelerinde en yüksek DPPH radikali indirgenmesi yoğurttan izole edilen *S. cerevisiae* D42 (% 69,34) izolatı iken, parçalanmış maya hücrelerinde en yüksek DPPH radikalinin indirgenmesi *S. cerevisiae* D42 (% 97,57) izolatı olduğu rapor edilmiştir. Parçalanmamış maya hücrelerinde en yüksek metal şelatlama aktivitesi peynirden izole edilen *S.cerevisiae* D17 (% 89,51) izolatında gözlemlenmişken, parçalanmış maya hücrelerinde en yüksek metal şelatlama aktivitesinin *S.cerevisiae* D17 (% 92,97) izolatında olduğu saptanmıştır. Parçalanmamış maya hücrelerinde total fenol miktarı en yüksek olan izolat *S.cerevisiae* D42 (64,05 mg/ml) iken, parçalanmış maya hücrelerinde total fenol miktarı en yüksek olan izolatın *S.cerevisiae* D42 (80,86 mg/ml) olduğu tespit edilmiştir. Antioksidan aktiviteleri sentetik antioksidan olan trolox ile kıyaslanmıştır. Aynı konsantrasyonlarda DPPH ve metal iyonları şelatlama metotlarında, doğal kaynaklardan izole edilen mayaların sentetik olan trolox' dan daha iyi aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. Ayrıca bu

Çalışmada DPPH ve total fenol miktarı arasında pozitif korelasyon olduğu saptanmıştır. Bu alışma ile yoğurttan ve peynirden izole edilen *S.cerevisiae*' nin yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir.

***Anahtar kelimeler: Maya, antioksidan aktivite, probiyotik, DPPH***

**Tez danışmanı: Doç. Dr. şahlan ÖZTÜRK**

**Sayfa Adedi: 84**

**DETERMINATION ANTIOXIDANT ACTIVITY OF YEASTS ISOLATED  
FROM SEVERAL FOODS**

**(M. Sc. Thesis)**

**Didem BAĞIŞLIYAN**

**NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL OF  
NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

**January 2017**

**ABSTRACT**

In this study antioxidant activities of yeast strains isolated from several foods were investigated. 42 yeast strains were isolated from foods such as yoghurt, cheese, tomato paste, grape molasses, butter, pickled water, olive water, wine, and kefir, isolates having the best antioxidant activity were identified by API 20C AUX (biomerieux) system. Antioxidant activities of yeast strains were determined by investigating DPPH free radical scavenging potential, metal ions chelating capacity and phenolic content. During the investigating of antioxidant activities of yeast strains different methods were carried for disrupted and undisrupted yeast cells. The highest DPPH free radical scavenging potential among the undisrupted yeast cells was observed in *S.cerevisiae* D42 (69.34 %) isolated from the yoghurt, whereas the highest DPPH free radical scavenging potential among the disrupted yeast cells was reported to be in *S.cerevisiae* D42 (97.57 %) isolates. The highest metal ions chelating capacity among the undisrupted yeast cells was observed in *S.cerevesiae* D17 (89.51 %) whereas the highest metal ions chelating capacity among the disrupted yeast cells was reported to be in *S.cerevesiae* D17 (92.97 %). Isolate having the highest phenolic content among the undisrupted yeast cells was *S.cerevisiae* D42 (64.05 mg/ml), whereas it was determined that isolate having the highest phenolic content among disrupted yeast cells was *S.cerevisiae* D42 (80.86 mg/ml). The antioxidant activities of isolates were compared with synthetic antioxidant Trolox. It was determined that all yeast isolates had the higher antioxidant activity than Trolox at the same concentration. Furthermore, it was determined that there was a

correlation between DPPH free radical scavenging potential and phenolic content in this study. In this study it was found that *S.cerevisiae* isolated from yoghurt and cheese have high antioxidant activity.

Isolate having the highest phenolic content among the undisrupted yeast cells was *S.cerevisiae* D42 (64.05 mg/ml), whereas it was determined that the highest phenolic content in disrupted yeast cells was *S.cerevisiae* D42 (80.86 mg/ml).

**Keywords:** *Yeast, antioxidant activity, probiotic, DPPH*  
**Thesis supervisor:** Assoc. Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK  
**Page Number:** 84

## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI .....	i
TEZ BİLDİRİM SAYFASI .....	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	xiii
RESİMLER LİSTESİ .....	xiv
SİMGE LİSTESİ.....	xv
KISALTMALAR .....	xvi
1.BÖLÜM	1
GİRİŞ .....	1
2.BÖLÜM	4
2.1. Mayalar.....	4
2.2. Mayaların gelişimine etki eden faktörler.....	6
2.2.1. Su .....	6
2.2.2. Sıcaklık .....	6
2.2.3. Ortam pH .....	7
2.2.4. Oksijen ve karbondioksit .....	7
2.2.5. Besi yeri uygunluğu .....	8
2.3. Mayaların sınıflandırılması .....	8
2.4. Mayaların biyoteknolojide uygulama alanları.....	9
2.5. Serbest radikaller .....	10
2.6. Serbest radikallerin oluşması.....	10

2.6.1.	Normal bir molekülün elektron kaybetmesi .....	10
2.6.2.	Kovalent bağların homolitik kırılması .....	10
2.6.3.	Normal bir moleküle elektron transferi.....	11
2.7.	Serbest radikal kaynakları .....	12
2.8.	Serbest radikallerin metabolizma üzerine etkileri .....	12
2.9.	Antioksidan .....	13
2.10.	Antioksidanların sınıflandırılması.....	14
2.11.	Gıdalardaki doğal antioksidanlar.....	15
2.11.1.	Enzim sistemleri.....	15
2.11.1.1.	Superoksit dismutaz (SOD) enzimi .....	15
2.11.1.2.	Glutasyon redüktaz enzimi .....	15
2.11.1.3.	Katalaz (CAT) enzimi .....	16
2.11.2.	Enzimatik olmayan antioksidanlar (doğal) .....	16
2.11.2.1.	Vitaminler .....	16
2.11.2.1.1.	E vitamini .....	16
2.11.2.1.2.	A vitamini .....	17
2.11.2.1.3.	C vitamini (Askorbit asit) .....	17
2.11.2.1.4.	Karotenoidler.....	17
2.11.2.1.5.	Polifenolik bileşikler .....	18
2.11.2.1.6.	Fenolik asitler.....	18
2.11.3.	Enzimatik olmayan antioksidanlar (sentetik).....	19
2.11.3.1.	Bütillenmiş hidroksianisol (BHA) ve bütillenmiş hidoksitoluen (BHT).....	19
2.11.3.2.	Tersiyer bütihidrokinon (TBHQ).....	20
2.11.3.3.	Gallatlar.....	20
2.11.3.4.	Nordihidroguareyetik asit (NDGA) .....	21

2.12. Doğal ve sentetik antioksidan özellikleri .....	21
2.13. Antioksidan mineraller.....	22
2.14. Antioksidanların hastalıklar üzerine etkileri .....	23
2.15. Antioksidan tayin yöntemi .....	26
2.15.1. Oksijen radikal absorpsiyon kapasitesi (ORAC) yöntemi .....	27
2.15.2. TRAP (toplam radikal tutma potansiyali) yöntemi.....	27
2.15.3. Crocin bleaching assay (krosin beyazlatma yöntemi).....	27
2.15.4. FRAP (Demir (III) indirgeme antioksidan gücü) yöntemi.....	28
2.15.5. DPPH radikali indirgenmesi.....	28
2.15.6. FCR ile total fenolik madde analizi .....	29
2.15.7. Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite analizi (TEAC).....	29
2.15.8. Bakır(II) indirgeyici antioksidan kapasite analizi (CUPRAC) .....	30
3.BÖLÜM .....	31
MATERYAL- YÖNTEM.....	31
3.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların toplanması.....	31
3.2. Maya üretiminde kullanılan besiyerleri .....	31
3.3. İzolatların saklanması .....	32
3.4. Gram boyama .....	32
3.5. API 20C AUX (biomerieux) testi ile tanımlama .....	33
3.6. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.....	33
3.7. Üreme ve büyüme eğrileri.....	33
3.8. DPPH radikali indirgenmesi .....	35
3.9. Metal iyonları şelatlama aktivitesi .....	36
3.10. Total Fenol miktarı.....	36
4.BÖLÜM .....	38

BULGULAR.....	38
4.1. İzolatların bulunması ve izolatların tanımlanması.....	38
4.2. DPPH radikali indirgenmesi .....	39
4.3. Metal iyonların (demir) şelatlama.....	42
4.4. Total fenol miktarı.....	46
5.BÖLÜM .....	50
TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER.....	50
KAYNAKÇA.....	57
ÖZGEÇMİŞ .....	65

## TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. <i>S.cerevisiae</i> 'de Hücre Duvarı.....	5
Tablo 2.2. Örnek maya türlerinin üreme sıcaklığı .....	7
Tablo 2.3. Maya türleri için uygun pH ortamları .....	7
Tablo 2.4. Mayalar için gerekli azotlu bileşikler .....	8
Tablo 2.5. Mayaların sınıflandırılması.....	9
Tablo 2.6. Reaktif oksijen ve azot türleri.....	11
Tablo 2.7. Serbest radikal kaynakları.....	12
Tablo 2.8. Antioksidanların sınıflandırılması .....	14
Tablo 2.9. Vitaminlerin hastalıklar üzerine etkisi.....	25
Tablo 3.1. YPD broth karışım oranı .....	31
Tablo 3.2. YPD agar karışım oranı .....	32
Tablo 3.3. Gram boyalar ve süreleri .....	32
Tablo 4.1. İzolat kodları, orjinleri .....	38
Tablo 4.2. DPPH radikali indirgeme yüzdesi.....	39
Tablo 4.3. Maya izolatları ve troloxun DPPH radikalini indirgemesi .....	42
Tablo 4.4. Metal iyonları şelatlama aktivitesi.....	42
Tablo 4.5. Maya İzolatları ve troloxun metal iyonları şelatlama aktivitesi .....	46
Tablo 4.6. Maya izolatlarının total fenol miktarları.....	46

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1.D8 izolatinın büyüme eğrisi.....	34
Şekil 3.2. D9 izolatinın büyüme eğrisi.....	34
Şekil 4.1. Parçalanmamış ve parçalanmış maya hücrelerinin DPPH radikalinin indirgenmesi. ....	41
Şekil 4.2. Parçalanmamış ve parçalanmış maya hücrelerinin metal iyonlarının şelatlama aktivitesi.....	45
Şekil 4.3. Parçalanmamış ve parçalanmış maya hücrelerinin total fenol miktarı. ....	49

## RESİMLER LİSTESİ

Resim 2.1. Mayalarda üreme .....	4
Resim 2.2. E vitamini kimyasal yapısı.....	16
Resim 2.3. A vitamini kimyasal yapısı .....	17
Resim 2.4. C vitamini kimyasal yapısı.....	17
Resim 2.5. $\beta$ karotenoid kimyasal yapısı .....	18
Resim 2.6. BHA ve BHT kimyasal yapısı .....	19
Resim 2.7. TBHQ kimyasal yapısı.....	20
Resim 2.8. Propil Gallat kimyasal yapısı.....	20
Resim 2.9. NDGA kimyasal yapısı .....	21
Resim 2.10. DPPH kimyasal yapısı .....	29
Resim 3.1. D12 izolatu.....	33
Resim 3.2. Pozitif kontrol .....	35
Resim 3.3. Negatif kontrol ve izolatlar .....	36
Resim 3.4. D8-D9 izolatları .....	36
Resim 3.5. D12-D13 izolatları .....	37

## SİMGE LİSTESİ

<b>A</b>	Absorbans
<b>°C</b>	Santigrat derece
<b>L</b>	Litre
<b>ml</b>	Mililitre
<b>μ</b>	Mikro
<b>μl</b>	Mikrolitre
<b>μg</b>	Mikrogram
<b>M</b>	Molar
<b>mM</b>	Milimolar
<b>nm</b>	Nanometre
<b>α</b>	Alfa
<b>β</b>	Beta
<b>γ</b>	Gama
<b>%</b>	Yüzde

## KISALTMALAR

<b>ABTS</b>	2, 2'-azinobis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
<b>BHT</b>	Bütillenmiş hidroksitoluen
<b>BHA</b>	Bütillenmiş hidroksianisol
<b>CAT</b>	Katalaz
<b>CUPRAC</b>	Kuprik iyon indirgeme antioksidan kapasitesi tayini
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
<b>FRAP</b>	Demir iyonlarını indirgeme antioksidan kapasitesi tayin yöntemi
<b>GPx</b>	Glutatyon peroksidaz
<b>GR</b>	Glutatyon redüktaz
<b>GST</b>	Glutatyon-S-Transferaz
<b>GST</b>	Glutatyon
<b>HAT</b>	Hidrojen atom transferi
<b>NADPH</b>	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
<b>ORAC</b>	Oksijen radikal absorban kapasitesi
<b>SOD</b>	Süperoksit dismutaz
<b>TBHQ</b>	Tersiyer bütillhidroksikion
<b>TEAC</b>	Troloks eş değer antioksidan kapasitesi
<b>TRAP</b>	Radikal tutuklama antioksidan parametrisi

## 1.BÖLÜM

### GİRİŞ

Biyolojik sistemdeki en önemli serbest radikalin oksijenden oluşan serbest radikal olduğu çalışmalar sonucu ortaya çıkmıştır [1]. Oksijenden oluşan serbest radikal organizmada var olan yada gıdalardan alınan antioksidan ile dengelenmediği durumlarda oksidatif stres görülmektedir. Oksidatif stres biyolojik yapılarda oksidatif hasara neden olabilir. Bu hasarlar kronik kalp, kanser, bağışıklık sistemi rahatsızlığı, hücrel yaşlanma gibi hastalıklara neden olur. Antioksidanlar ise meydana gelen bu olumsuz etkileri engellemede önemli bir yere sahiptir. Antioksidanlar, yapılarında buldukları elektronları radikallere vererek nötralize olmalarını sağlar diğer taraftan antioksidanlar kararlı yapılarının bulunması nedeniyle elektron verdikleri halde serbest radikale dönüşmezler [2]. Fakat bu tepkime canlı hücrenin tüm savunma sistemini hasarlardan koruyacağı anlamına gelmemektedir. Doğal antioksidanlar bu aşamada önemli bir rol almaktadır [2].

Yapılan çalışmalar sonucu 400' den fazla fermente gıda bulunmakta, bu gıdalar önemli besin kaynakları olarak tüketilmekte ve içerdikleri probiyotiklerin ise sağlık açısından faydalı gıdalar olduğu bilinmektedir. Gıda ürünlerinin işlenmesi nedeniyle kullanılan sentetik antioksidan kullanımında artış besin değerlerinde ise hızlı bir düşüş görülmektedir. Sentetik antioksidan kullanımının nedeni ise besinlerin korunması ve raf ömrünün uzun olması içindir [2].

Son yıllardaki çalışmaların önemli bir kısmını, insan besinlerinde antioksidanların serbest radikalleri uzaklaştırma yada yok etme olduğu yönündedir. Besinlerin uzun zaman bozulmadan kalmaları için işlemlerden geçirildiği bilinmektedir. Bu işlemlerle besinlere doğal ve sentetik antioksidan eklenmektedir. Besinlere ilave edilen sentetik antioksidan bileşikler BHA ve BHT olduğu gibi bitkilerden elde edilen doğal bileşikler olan katekol, rutin olabilir. Bu bileşiklerin özellikleri hem gıdaları koruma hemde vücuda girdikten sonra antioksidan gibi davranıp hücreyi diğer zararlı maddelere karşı korumaktır [3].

Doğal ve sentetik antioksidan arasında yapılan karşılaştırmada daha kolay ve ucuz elde edilmesi nedeniyle gıda endüstrisinde fazla kullanılan sentetik antioksidan yerine doğal antioksidanların keşfedilmesinin daha etkili olacağı düşünülmektedir. Sentetik antioksidan kullanımının akciğer, bağırsak ve karaciğer hasarlarını ortaya çıkardığı belirtilmiş bu nedenle doğal antioksidanlara karşı ilgi artmıştır [3]. Sentetik antioksidan yerine doğal antioksidan ürünlerin keşfedilmesi için çalışmalar artmış ve bitkiler ile olan çalışmalarında artmasına neden olmuştur [3]

İçeriğinde antioksidan kaynağının fazla olduğu gıdaları şöyle sıralaya biliriz: Algler, havuç, kereviz, yeşil çay, tahıllar, kakao, baklagiller, biber, soğan, sarımsak, kereviz, bahartlar, maydanoz, keçiboynuzu, turunçgiller, yer fıstığı, keten tohumu, tohum kabukları gibi sayılabilir. Besin içeriklerinde yer alan antioksidanlar arasında en fazla C vitamini pek çok sebze ve meyvede, E vitamini ise tohumlarda bulunduğu için insan sağlığında önemli yer tutmaktadır.

Antioksidanların kanserler üzerinde % 80-90' ını kontrol edebildiğini bunun ise % 30-35' inin beslenme ile doğrudan alakalı olduğu düşünülmektedir. Yaşadığımız çevre, aldığımız gıdalar nedeniyle karsinojenik maddelere maruz kalmaktayız. Kansere neden olan etmenler çevresel faktörler, beslenme, süperoksit ve aktif oksijen diye bilinen radikal üretme kapasitesidir. Bu etkileri en aza indirmek veya ortadan kaldırmak için antioksidan çalışmalarına daha fazla önem verilmelidir [3].

Gıda sanayisinde alkollü içki, ekmek mayası, tek hücre proteini, maya ekstraktı başta olmak üzere çeşitli üretimlerde çok sıklıkla kullanılan mayaların antioksidan etkileride incelenmektedir [4]. Mayaların en çok bilinen türünden olan *Saccharomyces cerevisiae*'de katalaz (CAT), süperoksitdismutaz (SOD), glutasyon peroksidaz (GPX) serbest radikallerine karşı savunma gerçekleştiren enzimatik savunma sistemi vardır. Bunların yanında mayalarda bulunmakta olan trehaloz dissakkarite de antioksidan özellik göstermektedir [5].

Sentetik antioksidanların doğal antioksidanlarla yer değiştirmesi insan sağlığı açısından yararlı olacaktır. Bu nedenle güvenilir kaynaklardan alternatif antioksidanların keşfine ihtiyaç duyulmaktadır. Mayalarda hem zengin besin içermesi hemde güçlü antioksidan mekanizmalarına sahip olmaları nedeniyle araştırılmaya değer antioksidan

kaynaklarıdır. Antioksidan kaynağı olarak maya kullanımının bitkiler gibi yüksek yapılı organizmaların kullanımına karşı; gelişim süreçlerinin daha kolay olması, değişen mevsim ve iklim şartlarından etkilenmemeleri ve kısa sürede çok miktarda üretilibilmeleri gibi üstünlükleri bulunmaktadır. Günümüzde gıdalarda doğal katkı maddesi olarak kullanılan mayaların bahsedilen bu özelliklerinden dolayı aynı zamanda doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılması da mümkün olduğu görülmektedir.

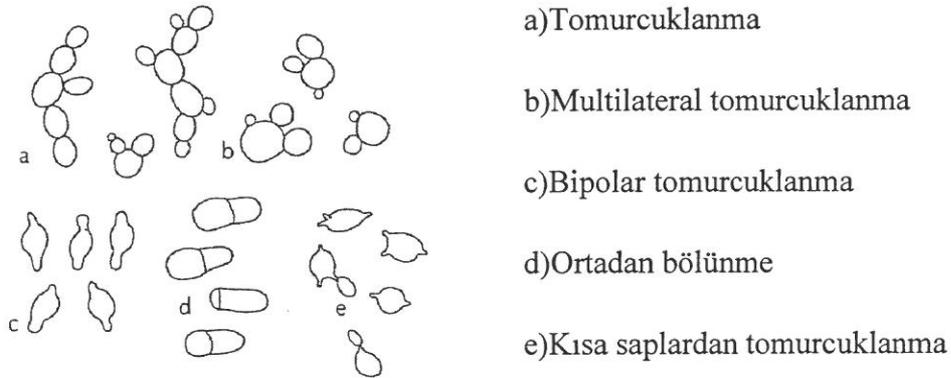
Bu çalışmanın amacı çeşitli gıdalardan izole edilen mayaların parçalanmış ve parçalanmamış hücrelerinin antioksidan aktivitesinin araştırılması ve yüksek antioksidan aktivitesi gösteren izolatların seçilip kültür koleksiyonlarının oluşturulmasıdır. Bu sayede oluşturulan kültür koleksiyonundan faydalanılarak yüksek antioksidan aktiviteye sahip olan izolatların gıda takviyesi olarak kullanılması ve ticari olan ve kimyasal yapıdaki antioksidanların yerine alternatif yeni bir doğal antioksidan kaynağı olması söz konusu olacaktır.

## 2.BÖLÜM

### 2.1. Mayalar

Mayalar mantarlar ailesinin geniş bir bölümünü kaplayan tek hücreli mikroorganizmalardır. Hücre yapısının büyük bir bölümü lipit, protein, polisakkarit ve nükleik asitlerden oluşmaktadır. Genel olarak maya hücrelerinin % 75' ini su, geri kalanı ise peptidler, proteinler, karbonhidratlar, yağlar, aminoasitler, vitaminler ve enzimler oluşturmaktadır [6].

Mayalar vejetatif çoğalmalarını tomurcuklanma veya bölünme ile gerçekleştiren ökaryotik mikroorganizmalardır. Bölünerek çoğalan maya hücreleri, hücre ortasından ikiye bölünerek aynı büyüklükte iki yavru hücreyi oluşturur. Tomurcuklanma ile çoğalan maya hücreleri ana hücre geliştikten sonra üzerinde çıkıntı oluştururlar. Uygun ortam koşulları sağlandıktan sonra çıkıntılar ana hücreden ayrılarak yeni hücreleri oluştururlar. Resim 2.1' de gösterilmiştir. [7].



Resim 2.1. Mayalarda Üreme

Maya hücreleri, oval, küresel, silindirik, elipsoidal biçiminde bir görünümde olup tek hücrelidirler. Örneğin *S.cerevisiae* türü küresel ve elipsoidal, *Saccharomyces ellipsoideus* elipsoidal şekiller görünmektedir. Bakterilere göre morfolojik olarak daha büyük mikroorganizmalardır. Mayaların hücre çaplarında bütün türlerinde farklılık göstermesine karşın ortalama olarak 1-10 µm aralığında değişkenlik göstermektedir [8].

Mayalar, diğler mikroorganizmalara göre farklı hücre duvar yapısına sahiptirler. Maya hücre duvarı kitin, glukan ve mannopteinden oluşmaktadır. Duvar yapısının büyük kısmı  $\beta$ -Glukanlar' dan oluşur.  $\beta$ -Glukanlarda  $\beta$ 1,6 Glukan,  $\beta$ 1,3 Glukan olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Maya hücrelerinin yapısında  $\beta$ -Glukanlar birlikte yada ayrı ayrı bulunmaktadır. Mayalarda hücre duvarının sağlam ve dayanıklılığını glukanlar sağlamaktadır. Tabakanın dış kısmında ise mannopteinler bulunmaktadır. Kitin hücre duvarının sadece % 2-4 kadarının oluşturmaktadır. Kitin miktarı pseudohifsel özellik gösteren örneğin *Candida albicans* gibi mayalarda daha fazladır [8].

Hücre yüzeyinin dış yüzeyini kaplayan mannopteinler hücre tanıma olaylarından sorumludur. Bu tabaka yabancı enzimlere ve hücre duvarını parçalayan enzimlere karşı plazma membranını korur, hücre duvarının iç kısma ulaşmasına engel olmaktadır [9].

Tablo 2.1. *S.cerevisiae* 'de Hücre Duvarı

Makromoleküller	Sentez Bölgesi
Kitin	Plazma membranı
$\beta$ 1,3 Glukan	Plazma membranı
$\beta$ 1,6 Glukan	Plazma membranı
Mannoprotein	Salgı yolu

### Kitin

Maya hücrelerinin tomurcuklanarak bölünmesinde kitinin büyük rolü vardır. Tomurcukla üremede ana maya hücresinden oluşan yavru hücre kitinden meydana gelen bölme ile birbirinden ayrılır. Antifungal çalışmalarda kitin sentezi hedef durumdadır [10].

### $\beta$ 1,6 Glukan

Yaklaşık 130 glukoz monomerin bir araya gelmesiyle oluşmuştur. Bu polimer suda kolaylıkla çözünür. Stres durumunda  $\beta$ 1,6 glukan kitin bağlayıcı olarak görev yapmaktadır.  $\beta$ 1,6 glukan sentezi endoplazmik retikulumda başlar ve plazma membranında gerçekleşmektedir [9,10].

## **$\beta$ 1,3 Glukan**

$\beta$ 1,3 Glukan hücre duvarının dayanıklılığını ve mekanik gücünü sağlar. Maya gelişiminde  $\beta$ 1,3 Glukanın dallanma derecesine bağlıdır. Mayaların ergin ve durağan fazlarında  $\beta$ 1,3 glukan zinciri dallanmaktadır [9].

## **Mannoproteinler**

Hücre duvarının en dış kısmını oluştururlar. Mannoproteinler iç kısımda bulunan fibriler tabakadan daha az geçirgen özelliğe sahiptir. Hücre duvarının az geçirgen özelliği disülfid köprüsü, asparjin kökleri, uzun karbonhidrat yan zincirlerine bağlıdır [11,12].

## **2.2. Mayaların gelişimine etki eden faktörler**

Sterilize ve pastörize edilemeyen gıdalarda mikroorganizmaların olduğu mikrofloralara sahiptir. Maya hücrelerinin gelişim aktivitelerini tamamlayabilmeleri için gerekli ortam şartlarına uygun besinlere ihtiyaç duymaktadırlar.

Maya hücrelerinin gelişimi için en önemli etkenler:

- Su
- Sıcaklık
- Oksijen ve karbondioksit
- pH
- Uygun besi ortamı [13].

### **2.2.1. Su**

Tüm organizmalarda olduğu gibi mayalarda suyun varlığından oldukça etkilenmektedirler [13]. Mayalar bakterilere göre azalan su seviyesine daha dirençlidir [14].

### **2.2.2. Sıcaklık**

Maya hücreleri 0-50 °C arasında üreme göstermektedir. Mayalar arasında üreme sıcaklıklarında farklılık olmasına karşılık en iyi aktiviteyi 25-27 °C arasında

göstermektedir. Mayaların gelişimi için gereken sıcaklık, çevresel faktörlerden etkilenmektedir [15].

Tablo 2.2.Örnek maya türlerinin üreme sıcaklığı

Örnek Maya Türleri	Minumum Sıcaklık İsteği (°C)	Optimum Sıcaklık İsteği (°C)	Maksimum Sıcaklık İsteği (°C)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0	6-15	47
<i>Candida mycoderma</i>	1-2	22	28-30
<i>S.cerevisiae</i>	1-3	25-30	40

### 2.2.3. Ortam pH

Maya hücreleri en iyi gelişimini asidik ortamlarda göstermektedir. Ortam pH' sı mayaların ısı kapasitesini ve farklı kimyasallara karşı dayanıklılığını etkilemektedir [16].

Tablo 2.3.Maya türleri için uygun pH ortamları

Maya Cinsi	Uygun pH Ortamı
<i>S. cerevisiae</i> (bira mayası)	3,4-3,9
<i>S.cerevisiae</i>	4,4-4,8
<i>Zygosaccharomyces</i> sp.	4,5
<i>Candida stella</i>	4,5

### 2.2.4. Oksijenve karbondioksit

Maya hücreleri, hem oksijenli ortamda hemde oksijensiz ortamlarda yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilirler. Oksijenli ortamlarda enerjilerini solunum ile karşılarken, oksijensiz ortamlarda enerjisini fermantasyon olayı ile sağlarlar. Saccharomyces ve Zygosaccharomyces türleri atmosferdeki karbondioksit basıçları altında fermantasyon

yapabilme özellikleri vardır. Bu özellikleri nedeniyle çeşitli içecek ve ekmek yapımında kullanılırlar [13].

Maya hücreleri solunum yaptığında şeker molekülünü parçalamaktadır:



Maya hücrelerinin fermantasyonu ise:



### 2.2.5. Besi yeri uygunluğu

Mayaların gelişiminde etkisi olan diğer bir faktörde besin kaynaklarıdır. Heterotrof bir mikroorganizma olan mayaların en önemli besin maddesi ve üremesini kısıtlayan, kontrol eden karbonhidratlardır. Karbonhidrat kaynağı glikoz, fruktoz, sakkaroz, laktoz, yada mannoz olabilir. Mayaların üremesi üzerine etki eden diğer bir madde ise azottur. Potasyum, kalsiyum, magnezyum, fosfor gibi maddelerde maya gelişimleri için önemli yapı taşlarıdır [6,14].

Tablo 2.4.Mayalar için gerekli azotlu bileşikler

Azotlu Bileşik	Görülme Sıklığı
Lizin, etanollamin	Mayaların tümünde
Aminoasitler, peptidler	Mayaların hemen hemen tümü
Nitrat tuzları	Bazı mayalar
Amonyum tuzları	Mayaların tümünde
Üre	Mayaların tümünde

### 2.3. Mayaların sınıflandırılması

Mayaların geleneksel ve filogenetik sınıflandırmaları mevcut olmakla birlikte, son yıllarda moleküler biyolojinin sınıflandırma üzerindeki etkileri görülmektedir [6].

Tablo 2.5. Mayaların sınıflandırılması

SINIF, TAKIM, AİLE	CİNS
Endomycetes	
Endomycetales	
Saccharomycetaceae	Saccharomyces
Endomycetaceae	Pichia
Saccharomycopsidaceae	Saccharomycopsis
Lipomycetaceae	Lipomyces
Dipodascaceae	Lodderomyces
Metschnikowiaceae	Metschnikowia
Saccharomycodaceae	Hanseniaspora
Schizosaccharomycetales	
Schizosaccharomycetaceae	Schizosaccharomyces
Ustomycetes	
Ustilaginales	
Sporidiaceae	Leucosporodium
Basidiomycetes	
Filobasidiales	Filobasidium
Filobasidiaceae	
Tremellales	
Tremellaceae	Tremella
Deuteromycetes	
Blastomycetales	
Candidaceae	Candida
Cryptococcaceae	Cryptococcus
Sporobolomycetaceae	Rhodotorula

#### 2.4. Mayaların biyoteknolojide uygulama alanları

İnsanlar bilerek veya bilmeyerek mikroorganizmaların doğal aktivitelerini gıda üretiminde uzun yıllardır kullanmaktadırlar. Bira, ekme, peynir, şarap üretimine ilişkin tarihsel kaynaklar binlerce yıl öncesine gitmektedir. Günümüzde ise sözü edilen

gıdaların üretiminde temel süreçler biraz değişmiş olsa da, biyoteknolojik verimin artmasını sağlayan bir araç olmuştur. Bunların yanında, biyoteknoloji uzmanları tarafından geliştirilen yeni teknolojiler kullanılarak, yeni ve yararlı gıdalar üretilmiştir. Biyoteknoloji modern gıda endüstrisinin gelişiminde çok önemli rol oynamıştır [17]. Mayalar gıda biyoteknolojisi dışında genetik mühendislerinde ilgilendikleri mikroorganizmalardır. Genetik mühendisliği ile geliştirilen mayalar hastalıkların tedavisinde yada önlenmesinde kullanılan pek çok farmasotik ajanın üretilmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca rekombinant DNA teknolojinde mayaların önemli rolü bulunmaktadır [18].

## **2.5. Serbest radikaller**

Radikaller son yörüngelerinde çiftlenmemiş elektron bulunduran atom veya moleküllerdir. Bu atom veya moleküller yapılarındaki çiftlenmemiş elektrondan dolayı zararlıdır. Biyolojik sistem için en önemli radikal oksijenden oluşan serbest radikallerdir [19].

## **2.6. Serbest radikallerin oluşması**

Bulduğumuz ortam ve koşullar nedeniyle sürekli bir radikal yapımı söz konusudur. Hücresel koşullarda azımsanmayacak derecede radikal üretimi olmaktadır. Radikallerin nasıl ve nerede üretildiklerine bakılmaksızın 3 temel mekanizmada oluşurlar [20].

### **2.6.1. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi**

Radikal özellik taşımayan bir molekülün elektron kaybı sırasında son yörüngesinde elektron kalır ve radikal özellik gösterir. Örneğin Glutasyon (GSH) serbest radikalleri indirgerken, kendisini ise tiyil radikali oluşturmaktadır [20].

### **2.6.2. Kovalent bağların homolitik kırılması**

Yüksek sıcaklık (500-600 °C) ve yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar kimyasal bağların kırılmasına yol açar. Kırılma anında bağ yapısında bulunan iki elektron farklı

atomlar üzerinde kalıyorsa, bu kırılmaya homolitik kırılma denir. Heterolitik kırılma sonucunda ise zıt yüklü iyon çiftleri görülür, bu türler de reaktif özellik gösterir [20].

### 2.6.3. Normal bir moleküle elektron transferi

Serbest radikal özelliği bulunmayan molekül tek bir elektron transferi ile dış yörüngesinde paylaşılmamış elektron bulunduruyorsa bu olay serbest radikal oluşumuna neden olabilir. Bu mekanizma ile radikal oluşumu biyolojik sistemlerde karşımıza çıkmaktadır ve canlılar için çok büyük önem taşımaktadır [20].

Biyolojik sistemde de radikal yada radikal özellik göstermeyen reaktif türler vardır. Bunlar arasında önemli reaktif azot türleri (RNS) ve oksijen türleri ise (ROS) şeklinde adlandırılır ve Tablo 2.6' da belirtilmiştir [20].

Serbest radikaller yapılarında ortaklanmamış elektron bulundurlar. Ortaklanmamış elektron varlığı bu moleküllerin kimyasal reaktivitesinin yüksek olmasına neden olmaktadır.

Tablo 2.6. Reaktif oksijen ve azot türleri

Radikaller	Nonradikaller
<b>Oksijen Türleri (ROS)</b>	
Hidroksil	Hipokloröz sit
Süperoksit	Hidrojen peroksit
Alkoksil	Ozon
Hidroperoksil	Hipobromöz asit
Peroksil	Singlet oksijen
<b>Azot Türleri (RNS)</b>	
Azot dioksit	Diazot tetroksit
Nitrik asit	Diazot trioksit
	Nitröz asit
	Peroksi nitrit

## 2.7. Serbest radikal kaynakları

Serbest radikal kaynakları iki genel başlık altında toplanabilir. Bunlar endojen kaynaklar ve eksojen kaynaklar olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Sınıflandırma Tablo 2.7’de gösterilmiştir.

Tablo 2.7. Serbest radikal kaynakları

Endojen Kaynaklar	Eksojen Kaynaklar
Mikrozomal E- Transport Zinciri	Anestezikler
Kloroplast E- Transport Zinciri	İlaçlar
Mitokondriyal E- Transport Zinciri	Çözücüler
Proteinler	X- Işını
Peroksizomlar	Ozon
Oksidatif Stres	Isı Şoku
Oksidan Enzim	İyonize Radyasyon
Araşidonik Asid Döngüsü	Güneş Işığı
Plazma Membranı	Sigara Dumanı
Transizyon Metalleri	Kirleticiler
Egzersiz	Metal İyonları
Fagositik Hücreler	Egzos Gazları
Endojenik Bileşiklerin Otooksidasyon Reaksiyonları	Asetaminofen, Kokain

## 2.8. Serbest radikallerin metabolizma üzerine etkileri

Serbest radikallerin oksijen türlerinin artması ile sağlıklı hücrelerde kontrolsüz hücre bölünmeleri, inflamasyon, hücresel işlevlerde bozukluklar ortaya çıkmaktadır. Bu olayların olması Alzheimer, Ateroskleroz, Parkinson gibi hastalıkları meydana getirmektedir.

Serbest Radikaller;

- DNA hasar
- Nükleotid koenzim aktivitesi tahribatı
- Enzimlerde tiyol-bağlı yapılarda karışıklık
- Disülfit bağlarının bozulması
- Lipid ve Protein kovalent bağlanması
- Lipid metabolizması ve enzim aktivitesinde değişiklikler
- Proteinlerde hasar sonucu, protein turnover'ı artar
- Lipid peroksidasyonu, membran yapı ve fonksiyonunda değişiklikler
- Membran proteinlerde hasar, membran transportunu bozması,

gibi durumlarda serbest radikaller hasar oluşturabilir [21,22,23].

## 2.9. Antioksidan

Antioksidanlar serbest radikallerin oluşmasını engelleyerek yada mevcut halde bulunan radikalleri süpürerek hücrenin hasara uğramasını engelleyen ve yapısında genellikle fenolik fonksiyon taşıyan moleküllerdir [24,25].

Vücutta kalkan görevini üstlenen bu kimyasal bileşiklerin özelliği, kendi elektronlarını vererek serbest radikalleri nötralize etmeleri ve bu sırada serbest radikal halini almamalarıdır [26].

Canlı sisteminde gerçekleşen tüm fizyolojik süreçler; enzim, hormon ve iz elementleri gibi farklı ajanlar tarafından yönetilen oksidasyon ve indirgenme tepkimelerinin karışık kombinasyonlarını içerir. Canlılarda indirgenme ve yükseltgenme dengesi kurulurken meydana gelen değişiklik, hücrelerin doku aktivitelerinin değişmesine neden olmaktadır. Antioksidan maddeler dokularda doğal olarak bulunarak oksidasyon reaksiyonlarını düzenler [24].

Antioksidan maddelerden yada antioksidan savunma sistemindeki bileşiklerin endojen sentezinde meydana çıkabilecek bir yetersizlik, farklı hastalıklara neden olabilir. Antioksidanlar etkilerini iki şekilde gösterebilirler. İlk olarak başlatıcı reaktif türevleri uzaklaştırıcı etki, oksijeni uzaklaştırıcı yada konsantrasyon azaltıcı etki, katalitik metal

iyonlarını uzaklaştırıcı etki. İkinci olarak ise meydana gelen serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesidir. Antioksidanın vücut içersindeki aktivitesini ortamdaki oksijen miktarına, sıcaklığa, konsantrasyon miktarına ve substrat çeşitlerine göre değişmektedir [28].

Normal koşullarda hücreler, serbest radikal ürünleri ve peroksitler gibi moleküllerin neden olacağı oksidatif hasara karşı, antioksidan savunma sistemi tarafından korunmaktadır. Antioksidan savunma sistemi enzimatik ve enzimatik olmayan iki kategoride incelenebilir [26,27].

Antioksidanların etki tipleri 4 ayrı şekilde görülmektedir;

- 1. Toplayıcı Etki:** Serbest oksijen radikallerini daha zayıf yeni moleküle çevirme yada bu radikalleri etkileyerek tutma işlemidir.
- 2. Bastırıcı Etki:** Serbest radikaller ile etkileşip onlara hidrojen vererek aktivitesini inaktif hale getiren olaydır.
- 3. Onarıcı Etki:** Serbest radikallerin meydana getirdiği hasarların onarılması düzeltilmesi işlemidir.
- 4. Zincir Kırıcı Etki:** Serbest Radikalleri kendilerine bağlayarak zincirleri kırıp reaksiyonu engelleyici etkidir.

## 2.10. Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidanlar içerdikleri özellikler nedeniyle enzimatik, enzimatik olmayan doğal, enzimatik olmayan sentetik olarak üç gruba ayrılmaktadır.

Tablo 2.8. Antioksidanların sınıflandırılması

<b>Enzimatik antioksidanlar (Doğal)</b>	<b>Enzimatik olmayan antioksidanlar (Doğal)</b>	<b>Enzimatik olmayan antioksidan (Sentetik)</b>
Süper Dismutaz (SOD)	A Vitamini	Tersiyer Bütilhidrokinon (TBHQ)
Selenyum Bağımlı Glutasyon Peroksidaz (GPx)	C Vitamini	BHA ve BHT
Glutasyon-S-Transferaz (GST)	E Vitamini	Gallatlar

Katalaz	Karotenidler	NDGA
Glutasyon Redüktaz (GR)	Polifenolik Bileşikler	

## 2.11. Gıdalardaki doğal antioksidanlar

### 2.11.1. Enzim sistemleri

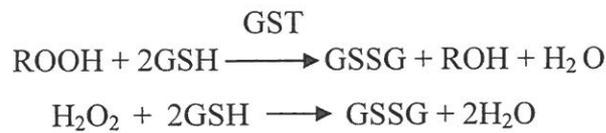
Vücudun korunmasını sağlayan en önemli etkenlerdendir. Enzimlerin etki mekanizmaları ve özellikleri;

#### 2.11.1.1. Superoksit dismutaz (SOD) enzimi

Bu enzim oksijen radikallerinin hidrojen peroksite dönüşümünü katalizlemekte görevlidir. Oluşan hidrojen peroksit daha sonra katalaz enziminin etkisiyle su molekülüne dönüşmektedir. Yaş artışı ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Vücutta SOD aktivitesinin azalması sonucunda plazma proteinlerindeki hasarların arttığı izlenmiştir, bunun yanında SOD' ler fagosite edilmiş bakterilerin öldürülmesinde görevlidir [1].

#### 2.11.1.2. Glutasyon redüktaz enzimi

Bir bölümü GSSG' yi yeniden GSH' ye dönüştürür. Bu dönüşümün nedeni vücudun GSH' ye olan sürekli ihtiyacıdır. GSH glutasyon peroksidaz enziminin yer aldığı metabolik tepkimekerde elektron vermektedir. GST enziminde karaciğerde yabancı bileşiklerin merkapturik asitlere dönüşümünde görev almaktadır. Katalitik olan yada olmayan çok fazla fonksiyona sahiptir [28]. GSH-Px enzimi yapısında bulundurduğu selenyum ile eritokritleri hemoglobin oksidasyonuna karşı korumaktadır.



### 2.11.1.3. Katalaz (CAT) enzimi

Hücre içerisinde oluşan hidrojen peroksiti suya dönüştürebilen katalaz enzimi bu özelliği ile hücrede hidrojen peroksitin birikmesine engel olur. Katalaz bir organizmanın tüm hücrelerinde özellikle peroksizomda bulunmaktadır [29,30].

Katalaz enzimi böbrek, karaciğer, miyokard, eritrositler ve çizgili kaslar olmak üzere vücutta en aktif olarak buldukları yerdir. Sitozolde % 20 oranında, eroksizomda ise % 80 oranında bulunmaktadır [31].

### 2.11.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar (Doğal)

#### 2.11.2.1. Vitaminler

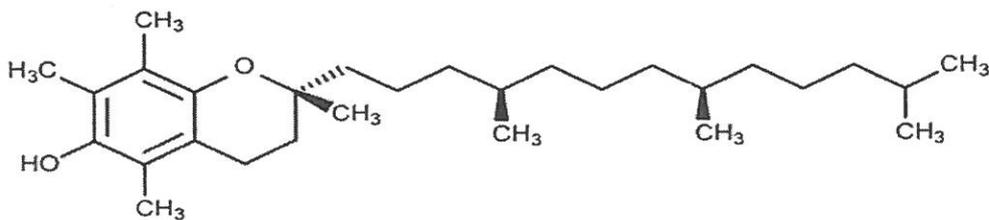
Enzimlerden sonra vücudun ikinci savunma sistemini oluştururlar.

##### 2.11.2.1.1. E vitamini

Yağda eriyen vitamin türüdür. Şu anda bilinen 8 tane izoformu bulunmaktadır. 4'ü tokotrienol ( $\alpha$ -tocotrienol,  $\beta$ -tocotrienol,  $\gamma$ -tocotrienol ve  $\delta$ -tocotrienol) diğer 4'ü ise tofoferol ( $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -tocopherol,  $\gamma$ -tocopherol ve  $\delta$ -tocopherol) yapısındadır. En aktif türü  $\alpha$ -tokoferol'dür. E vitamininin antioksidan özelliğinin olması yapısındaki fenolik hidroksil gruplu aromatik halka ve vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturmasıdır. Zincir kırıcı olarak görev alır. E vitamini plazma, kırmızı hücre ve dokularda bulunmaktadır [32].



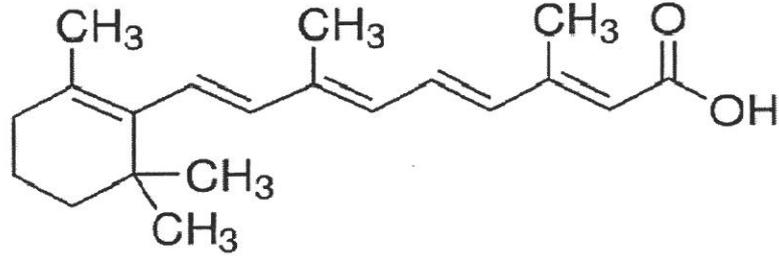
Yukarıdaki tepkimede  $\alpha$ -tokoferol,  $\alpha$ -tokoferol-O<sup>-</sup>'e dönüşmüştür.



Resim 2.2. E vitamini kimyasal yapısı

#### 2.11.2.1.2. A vitamini

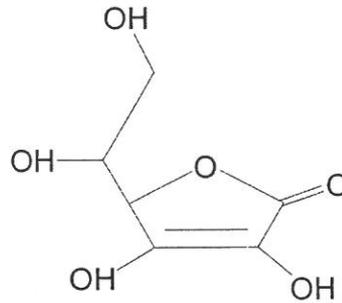
$\alpha$ -tokoferol ile kıyaslandığı zaman daha düşük etki göstermektedir. Ancak  $\alpha$ -tokoferoller bittiğinde A vitamini kullanılmaktadır.



Resim 2.3. A vitamininin kimyasal yapısı

#### 2.11.2.1.3. C vitamini (Askorbit asit)

Suda çözünebilen vitamin olarak C vitamini yeşil bitkilerde bol miktarda bulunmaktadır. Antiproteazların oksidan maddeler ile aktifleşmesini sağlamaktadır. Güçlü bir indirgeci olan C vitamini tokoferoksil radikalinin tokoferole indirgenmesini sağlamaktadır. LDL oksidasyonunu önlemektedir. Ayrıca, doku yapımında onarımında görevlidir. Bağışıklık sistemini güçlendirir, kansere karşı savaşır, demirin vücutta kalmasına katkı sağlamaktadır [32].

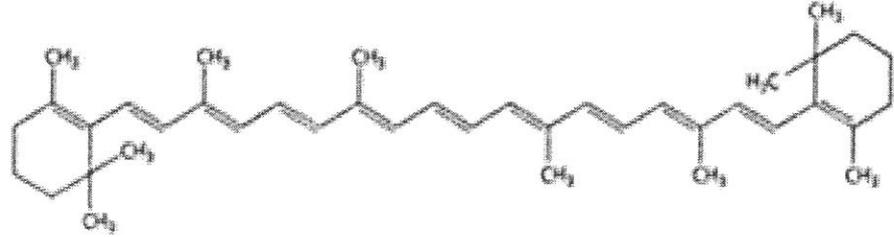


Resim 2.4. C vitamininin kimyasal yapısı

#### 2.11.2.1.4. Karotenoidler

Yağda çözünebilen doğal antioksidan grubunda yer almaktadır. 600' den fazla çeşidinin olduğu bilinmektedir. Karotenoidlerin çoğunun temel yapısı poliizoprenoid'den

oluşmaktadır. Sarı, turuncu, kırmızı renkleri bulunmaktadır. Karotenoidler oldukça güçlü reaktif oksijenleri süpürücülerdir. Karotenoidlerin aktifliği yapısında bulunan konjuge bağ çiftlerinden kaynaklanır [33,34,35].



Resim 2.5. β karotenoid kimyasal yapısı

#### 2.11.2.1.5. Polifenolik bileşikler

Polifenolik bileşikler birden fazla hidroksil grubunu içeren aromatik yapılarıdır. Fenolik bileşiklerin 8000 çeşidinin bitkilerde bulunduğu tahmin edilmektedir. Polifenollerin serbest radikal süpürücü aktivite için ideal kimyasal yapıya sahip olduğundan E vitamin ve C vitaminin' den daha etkili antioksidan özelliği gösterdiği bilinmektedir [27].

Polifenoller güçlü antioksidan özelliğe sahip bileşiklerdir. Yapılarında bulunan antioksidan özellikleri kimyasal yapılarına göre değişiklik gösterir. Bitkilerde bulunan Polifenollerin çok fazla işlevsel özelliği bulunmaktadır. İlk olarak hidrojen ve elektron-donör aracı, indirgeme ajanı olmakla birlikte bir bölümü ise metal iyonu şelatlama özelliğine sahiptirler. Fenolik bileşikler genellikle taninler olarak bilinen fenolik polimerler, flavonoidler ve fenolik asit içermektedir [35].

#### 2.11.2.1.6. Fenolik asitler

En fazla bitkilerde karşımıza çıkan Fenolik asitler (Fenil propanoidler) iki gruptan oluşmaktadır. Hidroksisinnamik ve Hidroksibenzoik asitler olarak gruplandırılırlar. Fenolik asitler genellikle Hidroksisinnamiklerden meydana gelmektedir. L-fenil alanin yada L- tirozinden p-kumarik, ferulik, kafeik, sinapik ve klorojenik asit oluşmaktadır.

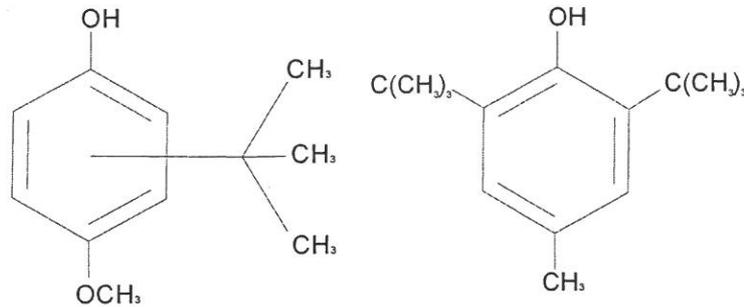
Fenolik asitler hidroksinamik ve hidroksibenzoik asitleri içeren grupları olurtururlar. Hidroksinamik asitler fenilpropan C6-C3 yapısındadırlar. En sık rastlanılanları ferulik asit, kafeik asit, *o*- kumarik asit ve *p*- kumarik asitdir. Hidroksibenzoik asitler ise C6-C1 yapıdadır ve gıdalarda çok az miktarda bulunmaktadır. Bu tür asitler vanilik asit ve gallik asittir. Flavonoidlerin en çok karşılaşılan sınıfı flavonollerdir. En önemli bileşenleri ise kaempferol, kuersetin ve mirisetinlerdir [36].

Flavon sınıfının temel bileşenleri krisin, apigenin ve luteolindir. Yüksek derişimde bitkiye renk vermektedir. Kereviz, zeytin, maydanozda bol miktarda bulunmaktadır [36]. Flavonun izomeri olan izoflavonlar soya fasülyesinde ve baklagillerde, dihidro türevi olan flavanonlar ise portakal, greyfurt gibi turunçgillerde bol miktarda bulunmaktadır [36].

### 2.11.3. Enzimatik olmayan antioksidanlar (Sentetik)

#### 2.11.3.1. Bütillenmiş hidroksianisol (BHA) ve bütillenmiş hidoksitoluen (BHT)

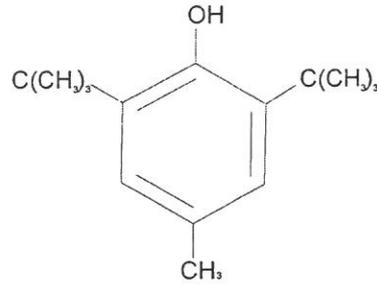
BHA, 3-terşiyer bütıl-4-hiroksianisol ve 2-terşiyer bütıl-4-hidroksianiol izormerlerinin karışımıdır. Beyaz mumsu bir yapıdadır. BHT ise beyaz kristal yapıdadır. BHA ve BHT olan iki bileşik yağda çok iyi çözünür ancak suda hiç çözölme göstermezler. BHA genellikle tahıllı ve şekerli ürünler de fazla miktarda kullanılır. Bu iki bileşik fazla miktarda vücuda alındığında aşırı hassasiyet ve alerjilere yol açmaktadır [37].



Resim 2.6. BHA ve BHT kimyasal yapısı

### 2.11.3.2. Tersiyer bütüldenrokinon (TBHQ)

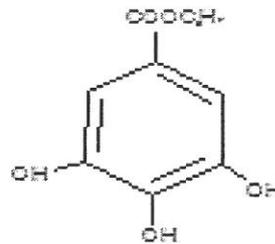
Kızartma yağlarına karşı korunmak için en iyi antioksidan olarak bilinmektedir. TBHQ, toz bir yapıya sahip olup katı ve sıvı yağlarda çözünebilmektedir. Bitkisel yağlar için en etkili sentetik antioksidandır. Yüksek sıcaklıklara dayanıklı yapısı bulunmaktadır [38]. Tek başına kullanıldığı gibi BHA/BHT ile birlikte kullanımında vardır. Eğer sitrik asit ile kullanılırsa sabitleyici özellik kazanmaktadır.



Resim 2.7. TBHQ kimyasal yapısı

### 2.11.3.3. Gallatlar

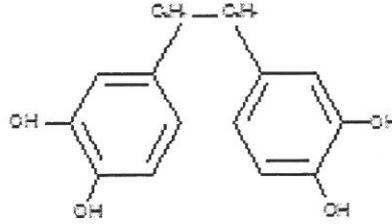
Gallatlar suda çözünmezler, yağda ise sadece oktil ve dodesil gallatlar iyi çözünürler. Gıdalarda 1947' den sonra kullanımını giderek yaygınlaşan sentetik antioksidandır. Gallatların kullanılmasında toplum sağlığı ve gıda hijyeni açısından hiçbir olumsuz bilgi bulunmamaktadır [39].



Resim 2.8. Propil Gallat kimyasal yapısı

#### 2.11.3.4. Nordihidroguareyetik asit (NDGA)

NDGA, toksik etkisi yüksek bir antioksidandır. Yağlarda çözünürlüğü çok azdır. Pişirilmiş besinlerde bile etkisini korumaktadır gıdalara sadece % 0,01 oranında eklenir [38].



Resim 2.9. NDGA kimyasal yapısı

#### 2.12. Doğal ve sentetik antioksidan özellikleri

Kullanılan besinler tüketildiklerinde canlı sistem içerisinde oluşan radikaller nedeniyle antioksidanlar insan beslenmesinde ve sağlığında önemli yer tutmaktadır.

Tüketilen gıdalarda bulunan antioksidanın şu özellikleri göstermesi gerekmektedir;

- Az miktarlarda kullanılıp ekonomik yönden maliyetin artmaması,
- Kullanılan antioksidan gıdada herhangi bir koku görünüş ve tadında bozulma gerçekleştirmemesi,
- İnsan sağlığı için zararsız olması,
- Yüksek sıcaklıkta gerçekleşen üretimlerde yapısının bozulmaması,
- Ayrıca antioksidanın, koruyacağı madde içerisinde iyi çözünmüş olması gerekmektedir.

Antioksidan maddeler, lipid oksidasyonunu geciktirerek gıdaların kalitesini korur ve raf ömrünü uzatmaktadır [40].

Isıtma, depolama ve sindirimin artması ile lipid serbest radikallerinde miktarlarda artış meydana gelmektedir. Antioksidanlar ise oluşan bu lipid oksidasyonunu geciktirmektedir. Bu olayların gerçekleşmesi için gıdalara tersiyer bütillhidroksikinon

(TBHQ), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA) gibi sentetik antioksidanlar eklenmektedir [41].

Günümüzde yapılan çalışmalar doğrultusunda elde edilen sonuçlar sentetik antioksidanların toksite özellik gösterebileceği, fazla maliyetli olup ayrıca doğal antioksidanlara göre daha az etkisinin olduğu ortaya çıkmıştır.

### **2.13. Antioksidan mineraller**

Antioksidan mineraller olan bakır, çinko, selenyum ve demir; SOD, katalaz ve GSH-Px gibi enzimlerin yapısında bulunmaktadır.

#### **Çinko**

Bağışıklık sisteminde önemli rol oynamaktadır. T hücrelerinin hastalıklarla savaşında etkilidir. B hücrelerinin antikör salgılamasında görevlidir [42].

#### **Demir**

Limfosit ve nötrofillerin aktif olabilmesinde ribonüklotil redüktaz ve miyeloperoksidaz enzimlerinin etkisi vardır [42].

#### **Bakır**

Bakırın antioksidan aktivitesi üzerine etkisi daha yeni ortaya çıkmıştır. Canlı sisteminde antioksidan etkisinin yanı sıra prooksidan etkiside bulunmaktadır. Bu özelliği nedeniyle ideal düzeyde alınması şarttır. Vücut sadece normal beslenme koşullarında bakır emilimi, atımını ve birikimini önleyecek şekilde ayarlamaktadır. Bakır alınımı eğer eksiklik gösterirse vücutta lipid peroksidasyonu, hücre tahribi, hücre ölümü, antioksidan dengesinde bozulmalar artmaktadır [42].

#### **Selenyum**

Selenyum'un kansere karşı savaşta sürekli adımı duymaktayız. Yüksek düzeyde deney hayvanlarına selenyum verildiğinde kanser oluşumunu engellediği görülmüştür. Selenyum antikarsinogenik etkisinin birkaç farklı mekanizması sonucu ortaya çıkmıştır.

Fakat bu mekanizmalar tüm kanser tipleri için aynı sonucu vermemektedir. Kanser türüne göre selenyum etkisi farklılık göstermektedir. En önemli selenyum besin kaynakları deniz ürünleri ve sakatatlardır [42].

### **Ürik asit**

Pürin metabolizmasını yan ürünü olarak bilinen ürik asit biyolojik bir aktivitesi olmayan artık bir madde olduğu bilinmektedir. Ürik asit oldukça aktif bir oksidandır. Ürik asit demir ve bakır minerallerini bağlandığında radikal reaksiyonları engeller. Çok önemli bir antioksidan olmasının nedeni GSH 'de bulunmasından kaynaklanır [42].

### **2.14.Antioksidanların hastalıklar üzerine etkileri**

Günümüzde antioksidanların bir çok hastalığa karşı direnç gösterdiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda doğal antioksidanların geneli antiviral, antialerjik, iltihap sökücü, antibakteriyel gibi birçok yararları sayılabilir. Günümüzde sıkça rastlanılan ve üzerinde antioksidan etkisi görülen hastalıkların bazıları şöyle sıralanabilir;

### **Kanser üzerine etkisi**

Tüm kanser türlerinin % 80-90' ının potansiyel olarak kontrol edilebilir nedenlerden, % 30-35' inin ise direkt olarak besinlerden kaynaklı olduğu düşünülmektedir [47, 48]. Yaşam ortamı ve besinler karsinojenik maddelerin vücuda girmesine neden olmaktadır. Bazı gıda ve bileşikler risk grubunu oluşturmaktadır. Örneğin; kahve, sigara, alkol, doymuş yağlar, pestisitler, nitritler olarak sayılabilir. Bir kanser hücresi başlangıç, gelişme ve son aşama olmak üzere üç aşamadan oluşmaktadır. Kanseri oluşturan beslenme ve çevresel etkiler aktif oksijen ve süperoksit olarak adlandırılan radikalleri üretme kapasitesindedir. Nitrozaminler karsinojen bileşikler olup nitritlerden kaynaklanmaktadır. E vitamini ve C vitamini güçlü bir nitrit yok edici olduğu bilinmektedir [43,44,45]. Sigara içen kişiler üzerinde yapılan araştırmalarda yeşil çay tüketimi DNA hasarını azalttığı gözlenmiştir [46]. E vitaminnin mutajen oluşumuna engel olduğu ve DNA' yı onardığı bilinmektedir. C vitamininin ise kanserin önlemedeki esas etki antioksidan olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bağışıklık sistemini kuvvetlendirip, mutajen ve nitrozamin oluşumuna engel olmaktadır. Yüksek dozda C vitamini alınımı ile hormona bağımlı olmayan kanser tiplerinde

koruyucu olduğu ve ağız, yemek borusu, mide kanserlerinin oluşum risklerinin azaldığı görülmüştür. Ayrıca  $\beta$ -karoten alımının radyasyon ve kimyasalların oluşturduğu kanser türlerini engellediğı görülmüştür. Çok fazla sigara tüketen kişilere  $\beta$ -karoten takviyesi kanser risk'ini % 18 kadar azalttığı görülmüştür.

### **Kardiyovasküler hastalıklar üzerine etkisi**

İnsan ölümlerinin ilk nedenlerinden biri olan kardiyovasküler hastalıkların nedeni kan damarlarının iç kısımlarının kalınlaşmasıdır. Koroner kalp hastalıklarına neden olan etkenler yüksek kolesterol, yüksek tansiyon ve fazla sigara tüketimidir. Düzenli ve dengeli beslenmenin, koroner ölüm oranında azalmaya sebep olmuştur. Sarımsak ve soğan içeren besinlerle beslenen deney hayvanlarının plazma lipid derişiminin düştüğü [49], yeşil çay tüketilmesi sonucu total kolesterol ve trigliserit oranının azalttığı görülmüştür. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sırasında oluşan radikallerin zararına karşı doğal antioksidanlar koroner kalp damar hastalıklarına karşı koruyucu etki göstermektedir [50]. Bunların yanında yapılan araştırmalar sonucu E vitamininin fazla alınması koroner kalp hastalığını azalttığını göstermektedir [51,52].

### **Bağışıklık sistemi üzerine etkisi**

Bağışıklık sistemi, vücut hücrelerinin kanserli hücrelere değışimlerine engel olmaktadır. Bu sistemde, yapısı değışmiş hücreler işgalci olarak tanınır ve yok edilmektedir. İnsan bağışıklık sisteminin iyi etki göstermesi antioksidanların vücuda alınımına bağılıdır. Çevresel faktörlerin bazıları bağışıklık etkilerini azaltabilir. Bunlar UV ışık, sigara dumanı, bazı ilaçlar ve ksenobiyotiklerin metabolizması gibi sayılabilir. E vitamini ve C vitamini bağışıklık sistemi üzerinde çok etkilidir. E vitamini takviyesi yapıldığında hastalıklara direncin arttığı gözlenirken, C vitamininin ise bağışıklık sisteminde salgı yapmasında ve nötrofillerin fonksiyonlarının geliştirilmesinde öne taşımaktadır. Ayrıca antioksidan ilaçların yan etkilerinin bulunduğu bilinmektedir fakat doğal olarak vücuda alınan antioksidanların fazla alınması durumunda vücut bunu tolere etmektedir. Bağışıklık sistemi üzerine en fazla etkinin E vitamini ve C vitamininin olduğı gözlemlenmiştir [45,53].

### Yaşlanma üzerine etkisi

Yaşlanmaya karşı vücut savunmasında en önemli görevi SOD enzimi almaktadır. SOD enzimi zararlı oksijen radikallerinin hidrojen peroksit'e dönüşmesine sağlamaktadır. Antioksidanlar arasında yaşlanmayı azaltmada en çok ürik asidin etkili olduğu belirtilmiştir, fakat bu bileşik normal bir beslenmenin parçası değildir. Dengeli ve düzenli beslenme sonucu DNA ve sitozolik savunma sistemi az zarar görek, yaşlanmanın yavaşladığı gözlemlenmiştir [54,55].

### Metabolizma bozuklukları üzerine etkisi

Oksijen radikallerinin artması ile akdeniz anemisi, orak hücreli anemi gibi metabolizma bozukluğundan meydana gelen hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Serbest radikallerin kanda lipo proteinini artırması damarlarda hasarlanmaya ve damar içi birikimi meydana getirmektedir. C vitamini, E vitamini ve karotenoid uygulamaları tedavide yararlı sonuç vermektedir [54,58].

### Toksikantlar üzerine etkisi

İnsanlar çevre kirliliği, duman, alkol tüketimi, ilaç yan etkileri, gıda zehirleri gibi sürekli olarak toksikantlarla karşı karşıya kalmaktadırlar. Bu zararlı etkilerin serbest radikallerden kaynaklandığı bilinmektedir. Antioksidan tedavisinin bu etkileri azalttığı ön görülmektedir. Örneğin C vitamininin Cypermethrin adlı tarım ilacının toksikantların azaltılmasında etkisi olduğu görülmektedir [56,57].

Tablo 2.9. Vitaminlerin hastalıklar üzerine etkisi

HASTALIK	C VİTAMİNİ	E VİTAMİNİ	β-KAROTEN
Kardiyovasküler	+	+++	+
Kanser	++	++	+
Katarakt	++	++	++
Bağışıklık	++	+++	++
Alzheimer	-	++	-

(- ;hiç etkisi yok, +; kısmen etkili, ++; etkili ,+++; önemli etkisi var)

## 2.15. Antioksidan tayin yöntemi

Antioksidan tayin yönteminde kullanılan kimyasal reaksiyon açısından temel olarak iki sınıfa ayrılabilir:

- Tek elektron transferi reaksiyonuna dayananlar (ET)
- Hidrojen atomu transferi reaksiyonuna dayananlar (HAT)

HAT yöntemi genellikle oksitlenebilen prob, bir antioksidan ve sentetik radikalden oluşur. ET yöntemler reaksiyon sonunun indikatörü olarak bir oksidan indirgenme reaksiyonu içermektedir. Bunun yanında tepkimeleri takip için prob kullanılır.

ET ve HAT yöntemleri genellikle antioksidan kapasitesi ölçmek yerine radikal süpürücü kapasitesi ölçmeye yöneliktir.

HAT dayanan etki mekanizması:



ET mekanizmasında gerçekleşen tepkimeler ise:



HAT yöntemi ET yöntemine göre daha hızlı gerçekleşir ve pH ve çözücü faktörlerinden etkilenmektedir [59].

HAT analiz yöntemleri: HAT analiz yöntemlerinin büyük bir kısmı azo bileşiklerinin bozulup oluşan peroksil radikalının antioksidan ile yada substrat tarafından giderilmesine dayanır.

- Başlamış düşük yoğunluklu lipoprotein otooksidasyonu,
- ORAC
- TRAP
- Crocin bleaching deneyleri olarak söylenebilir.

ET esaslı analiz yöntemi: Bu yöntem antioksidan özellikteki maddenin indirgenmesi ile renk değiştiren oksidan maddenin indirgenme kapasitesinin ölçümüne dayanır.

- FCR ile total fenolik madde analizi
- TEAC ölçümü
- FRAP ölçümü
- Bakır (II) yapısının oksidan olarak kullanılarak “toplam antioksidan potansiyeli” ölçümü
- DPPH yöntemi
- CUPRAC yöntemi

Bu yöntemlerden FCR’ın antioksidan kapasitesinin ölçülmesinde ve ORAC’ ın antioksidan radikal süpürücü kapasitesinin ölçülmesinde kullanılması önerilmektedir [60].

#### **2.15.1. Oksijen radikal absorpsiyon kapasitesi (ORAC) yöntemi**

İlk kez Alessio, Cao ve Cutler tarafından önerilmiş olan bu yöntem peroksil radikalleri ile oksitlenen hedef molekülün bir antioksidan tarafından nasıl ve ne kadar korunduğu, hedef molekülün absorbans takibi yada hedef molekülün bozulması izlenerek bozulma kinetiği eğrisi altında kalan alan ile ölçülebilir. ORAC yöntem ölçümleri için floresans spektrofotometre gerekmektedir [61].

#### **2.15.2. TRAP (Toplam radikal tutma potansiyeli) yöntemi**

Wayner tarafından geliştirilen toplam radikal tutma potansiyeli yöntemi, toplam antioksidan kapasitesini ölçmek için kullanılır. TRAP yöntemi antioksidan bileşiklerinin ABAP yada AAPH ve hedef molekül arasındaki tepkimenin engellemesi bağlıdır. Bu yöntemin en büyük sorunu oksijen elektrodunun bitiş noktası ile ilgilidir.

#### **2.15.3. Crocin bleaching assay (krosin beyazlatma yöntemi)**

Karotenoidler ve krosin beyazlatılması otooksidasyon, ışık merkezli AAPH veya yükseltgeyici lipidler yükseltgenme ile olur. Krosinin tepkimeleri sadece radikal yükseltgenme yolu ile beyazlatılır. Renk değişimi 443 nm’de gözlenir.  $\beta$  – karoten ise

hedef molekül olarak kullanıldığında 470 nm’de renk değişiminin birçok nedeni olduğundan yorumlanması zordur [62].

#### **2.15.4. FRAP (Demir (III) indirgeme antioksidan gücü) yöntemi**

Bu yöntem ilk olarak Benzie ve Strain tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem ile 0,7V’den daha küçük redoks potansiyeli olan bileşiklerin aktiviteleri belirlenir. Yöntemin hızlı ve basit olmasının yanı sıra dezavantajları bulunmaktadır. Bunlar, fizyolojik pH’ da bir aktivite göstermemesi, glutatyon gibi tiyol tipi antioksidanları ölçememesi gibi sıralanabilir [63].

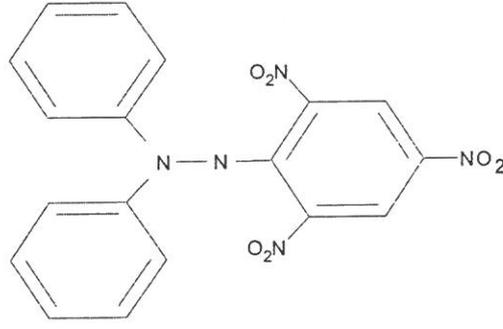
#### **2.15.5. DPPH radikali indirgenmesi**

Bu yöntem ilk kez Blois (1958) tarafından 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikallerinin antioksidan tayinlerinde kullanılabileceğini ortaya çıkarması ile kullanılmaya başlanılmıştır. Brand-Williams ve arkadaşları bu yöntemi farklılaştırarak geliştirmiş ve bir çok araştırmacı tarafından referans olarak kullanılmasını sağlamıştır.

Yöntemin esas amacı DPPH içeren çözelti ile hidrojen atomu verme eğilimi olan bir antioksidan çözeltinin karıştırılması ile DPPH radikali indirgenir ve çözelti de ilk görülen mor rengin kaybolmasına neden olur. Oluşan mor rengin 520 nm’ de absorbansının değişiminin ölçülmesi ile tepkimeye dikkat edilir [64].

DPPH yöntemi basit fakat dezavantajları bulunan bir yöntemdir. Dezavantajı ise büyük antioksidan molekülünün sterik engellemeye maruz kalmaları nedeniyle etkisiz olarak test edilmeleridir. Bazı antioksidan çeşitleri lipid peroksidasyonunda rol oynayan peroksil radikalleri ile çok fazla tepkime vermektedir, fakat DPPH ile çok yavaş tepkime vermektedir. DPPH ile antioksidan molekül arasında gerçekleşen tepkime aşağıda verilmiştir:





Resim 2.10. DPPH kimyasal yapısı

### 2.15.6. FCR ile total fenolik madde analizi

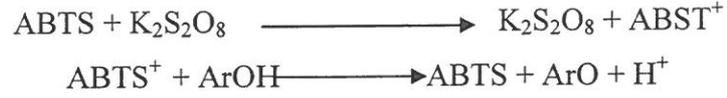
Bu yöntem 1965’de Singleton ve Rossi tarafından bulunmuş ve daha sonra araştırmacılar tarafından geliştirilmiştir. Yöntem test edilen materyalin reaktifin oksidasyonunu yok etmesi için gerekli olan miktarı ölçmektedir [65]. Fakat bu reaktif sadece total fenolik bileşiğin miktarını ölçmediği için, örneklerde bulunan tüm indirgen maddelerle reaksiyon vermektedir. Folin-Ciocalteu reaktifi ile total fenolik bileşiği miktar analizi antioksidan çalışmalarda kullanılan standart bir yöntemdir. Folin-Ciocalteu reaktifi ilaç analizlerinde [66], idrar örneklerinde [67] ve gıda ürün analizlerinde [68] fenolik bileşiklerinin indirgenme kapasitelerinin ölçümleri için genişletilmiştir.

### 2.15.7. Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite analizi (TEAC)

TEAC yöntemi ilk olarak 1993 yılında Miller vd. tarafından bulunmuştur. Bu yöntem ile hidrojen peroksit varlığında metmiyoglobinin peroksidaz aktivitesi ile ABTS radikalleri oluşturulur ve antioksidan etkisi ile radikal oluşumdaki azalma 734 nm’ de ölçülmektedir [69].

TEAC yöntemi 1999 yılında Re vd. tarafından geliştirilmiştir. Bu yeni yöntem, ABTS ve potasyum persülfat arasında gerçekleşen tepkimenin sonunda mavi/yeşil  $ABTS^+$  kromoforumunu meydana getirmektedir. Geliştirilen yeni yöntemde orjinalinden farklı olmasının nedeni hem lipofilik hem hidrofilik antioksidanlarla uygulanabilmesidir [70].

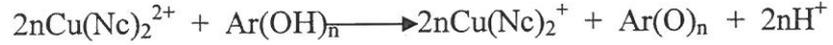
ABTS radikal katyonunun oluşumu ve ortalama antioksidan eklenmesi ile gerçekleşen tepkime şu şekildedir [70];



### 2.15.8. Bakır(II) indirgeyici antioksidan kapasite analizi (CUPRAC)

1991 yılında Tütem et al. tarafından çeşitli indirgen ajanların tayini için kullanılabileceği önerilen bakır (II) klorür reaktifi [71], E vitamini ve askorbik asit' in tespitinde kullanılmıştır [72]. Bu yöntem daha sonra geliştirilerek insan serumunda ve bitki ekstralarında total antioksidan kapasite analizleri için geliştirilerek, bakır iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi olarak adlandırılmıştır (CUPRAC). Bu yöntemle hidrofilik ve lipofilik toplam antioksidan kapasitesi kolaylıkla bulunabilmektedir [73].

Yeni geliştirilen CUPRAC yöntemi ise aşağıda verilen tepkimede olduğu gibi gerçekleşmektedir.



Bu tepkimede iki proton açığa çıkmakta ve  $\text{Ar}(\text{OH})_n$  yapısında bulunan hidroksil grubu kinon yapısına dönüşmektedir. Bu tepkimede, n-OH grubu içeren antioksidan yapıları bileşikler, 2n-e donörü olarak hareket eder [73].

### 3.BÖLÜM

#### MATERYAL- YÖNTEM

##### 3.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların toplanması

Çalışmada kullanılan 42 izolat, Nevşehir ilinden temin edilen peynir, yoğurt, salça, pekmez, şarap, zeytin suyu, turşu suyu, kombü, üzüm mayası, acılı ve kefirde izole edilmişlerdir.

##### 3.2. Maya üretiminde kullanılan besiyerleri

Peynir, yoğurt, salça, pekmez, şarap, zeytin suyu, turşu suyu, kombü, üzüm mayası, acılı ve kefirde izole edilen izolatların tanımlanması değerlendirilmesi için besiyerleri belirtilen oranlarda hazırlanarak kullanılmıştır.

##### YPD (Yeast Ekstrakt Peptone Dextrose)

Ticari olarak üretilen ve satın alınan, YPD içeriği olan Yeast ekstrakt'ın 20 g'ı, Meat ekstrakt'ın 10 g'ı, Dextrose'mın 10 g'ı 1000ml distile suda çözülerek steril tüplere eşit miktarda dağıtılarak 121 °C'de 1 saat otoklavlanarak steril hale getirilmiştir.

##### YPD Besi içeriği

Ticari olarak üretilen ve satılan YPD besiyeri içeriği olan Yeast ekstraktan 20 g, Meat ekstrakt 10 g, Dextroseden 10 g ve agar agardan ise 15 g'ı 1000 ml distile suda çözülerek 121 °C'de 1 saat otoklavlanarak steril hale getirilip, steril petri kaplarına dökülmüştür.

Tablo 3.1. YPD broth karışım oranı

YPD Besiyeri	Karışım Oranı
Yeast Ekstrakt	20 g/1000 ml
Meat Ekstrakt	10 g/1000 ml
Dextrose	10 g/1000 ml

Tablo 3.2. YPD agar karışım oranı

YPD Agar	Karışım Oranı
Yeast Ekstrakt	20 g/ 1000 ml
Meast Ekstrakt	10 g/ 1000 ml
Dextrose	10 g/1000 ml
Agar Agar	15 g/ 1000 ml

### 3.3. İzolatların saklanması

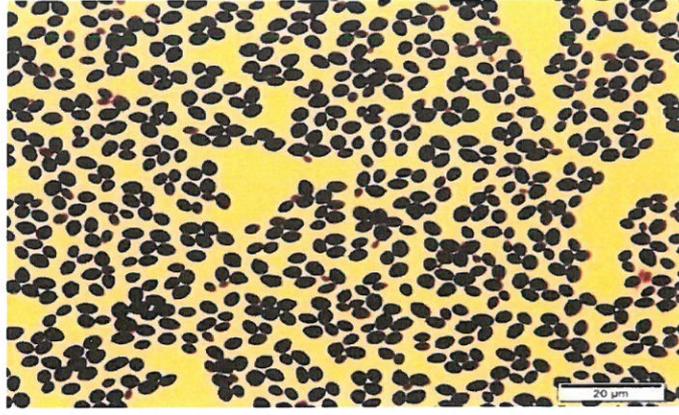
Gıda maddelerinden elde edilen izolatlar YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) Broth besi yerinde 25 °C' de bir gün çoğaltılmıştır. Çoğaltılan kültürlerden YPD agar besi yerinde çizgi ekimi yapılmış ve aynı koşullarda çoğaltılmıştır. Petriden tek koloni alınarak gram boyama ile hücre morfolojisi saptanmıştır. Seçilen koloniler YPD yatık besi yerinde çoğaltılarak ileri çalışmalarda kullanılmak üzere +4 °C'de saklanmıştır.

### 3.4. Gram boyama

Gram boyama; mikroorganizmaların hücre duvarının kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre (gram pozitif, gram negatif) ayırmak için kullanılan bir yöntemdir. Hazırlanan preparat ateşte fikse edildikten sonra gram boyamanın ilk boyası olan kristal viyole uygulanıp 1 dakika sonra sudan geçirilmiştir. İkinci boya olan lugol uygulanmış, 1 dakika bekletildikten sonra tekrar sudan geçirilmiştir. % 96' lık etil alkol renk giderme işlemi için kullanılmış, 30 saniye sonra su ile yıkanmıştır. Gram boyamanın en son boyası olan safranin ile preparatlar boyanmış, 45 saniye sonra sudan geçirilmiştir. Gram boyama ve süreleri Tablo 3.3'de verilmiştir.

Tablo 3.3. Gram boyalar ve süreleri

Gram boyalar	Süre
Kristal viyole	1 dk
Lugol	1 dk
%96'lık Etil alkol	30 sn
Safranin (Sulu fuksin)	45sn



Resim 3.1. D12 izolatu

### 3.5. API 20C AUX (biomerieux) testi ile tanımlama

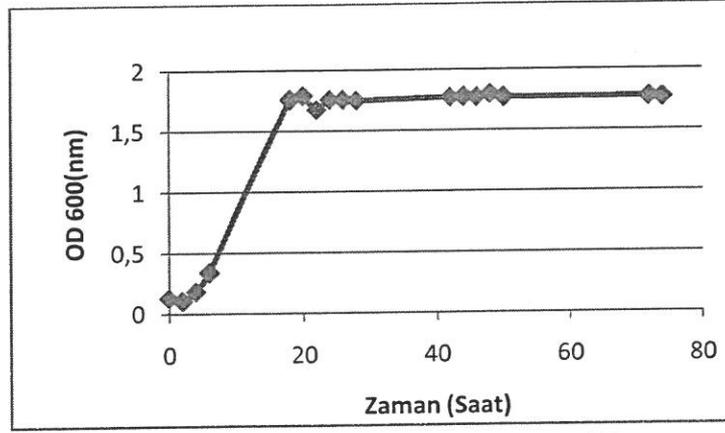
Üremiş olan izolatlardan tek koloni alınarak, API 20C AUX (biomerieux) testi solüsyonunda çözünmesi için bırakılmıştır. API 20C AUX (biomerieux) testi solüsyonunda çözünen izolatlar, her şerite ayrı ayrı pipetlenmiştir. 25 °C' de 24 saat inkübasyondan sonra, 19 şeritteki bulanıklık kontrol edilmiştir. Kontrol şeritinden daha bulanık olan şeritler pozitif olarak değerlendirilmiştir ve bilgisayar ortamındaki web programına girilip, sonuçlar alınmıştır.

### 3.6. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

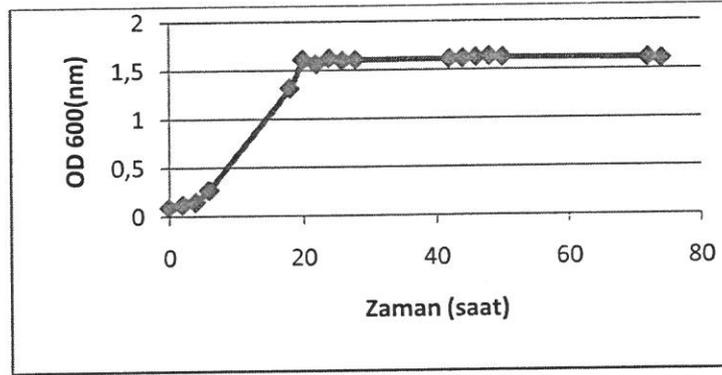
Yapılan çalışmalarda kullanılan tüm kimyasal maddeler analitik kalitededir. Deneylerde kullanılan su ise distile sudur. Sodyum klorür(NaCl) (Merck), Sodyum karbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (Merck), folin-Ciocalteus phenol reagent (Merck), Metanol (Merck), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (Aldrich), FeCl<sub>2</sub> (Sigma – Aldrich), Aseton ve Hekzan (Merck ) ve 1,2,4-triazine (ferrozine) (Merck) marka kimyasallar kullanılmıştır.

### 3.7. Üreme ve büyüme eğrileri

Yatık agardan (YPD) tek koloni alınan izolatlardan, YPD Broth' a ekim yapılmıştır. İzolatlar iki kez aktifleştirilerek 600 nm' de OD değerleri ölçülen izolatların konsantrasyonları 1,2' ye eşitlenmiştir. 100 ml YPD broth içeren 250 ml' lik erlenlere % 1' lik ekimler yapılmıştır. İzolatlar 25 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. Belirli zaman aralıklarıyla OD' leri spektrofotometrede ölçülmüştür. Değerlere göre büyüme eğrileri belirlenmiştir.



Şekil 3.1. D8 izolatının büyüme eğrisi



Şekil 3.2. D9 izolatının büyüme eğrisi

Her deneyden önce YPD Broth'da iki kez aktifleştirilen izolatlar, 25 °C de 24 saat çoğaltılmıştır. İzolatların optik yoğunlukları spektrofotometrede 600 nm' de ölçülmüştür. OD 600 nm değerleri 1,2' ye sabitlendikten sonra deneylere başlanmıştır. Eşit optik yoğunluktaki maya kültürlerinin 1 ml'si santrifüj ile (12000 rpm de 5 dakika) hasat edilmiştir.

Bu çalışmada iki ayrı metot uygulanmıştır: İlk olarak maya hücrelerinin doğrudan antioksidan aktivite tayini, ikinci olarak ise maya hücrelerinin parçalanarak antioksidan aktivitesi tayininin belirlenmesidir. Parçalanmamış maya hücreleri ile yapılan çalışmada elde edilen pellet steril serum fizyoloji ile iki kere yıkanmış, yıkanan pellet 1 ml serum fizyolojide çözülmüş ve deney aşamasına geçilmiştir.

Maya hücrelerinin parçalanarak antioksidan aktivite tayini metodunda ise hasat edilen maya hücreleri serum fizyolojide iki kez yıkanmış ardından 1ml etanol ve hasat edilen

hücre miktarı kadar glass beads eklenmiştir, -20 °C' de 5 dk beklenmiş ardından 3 kez Ultrasonik parçalayıcı ile 5 dakika parçalanarak deneylere başlanmıştır.

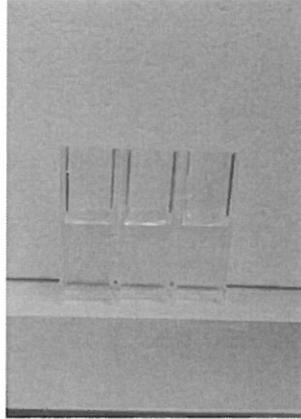
### 3.8. DPPH radikali indirgenmesi

Serbest radikal süpürme etkisi in vitro olarak bazı modifikasyonlarla Hatano vd. (1988) metoduna göre 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) testi ile ölçülmüştür. Final konsantrasyonu 2 mg olarak hesaplanmıştır. Hasat edilen izolatlar üzerine 1 ml 0,1 mM DPPH eklenerek tüpler 30 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İzolatların spektrofotometrede 517 nm' de ölçümleri yapılmıştır. Çalışmada kullanılan her konsantrasyon için DPPH içermeyen pozitif kontrol ve izolat içermeyen negatif kontrol hazırlanmıştır. Temizlenen DPPH radikali yüzdesine göre temizleme aktivitesi aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır. DPPH radikalini süpürme etkisi aynı protokolün çeşitli konsantrasyonlardaki sentetik antioksidan olan trolox standartlarına uygulanmasıyla elde edilen radikal süpürme etkisine göre belirlenmiştir.

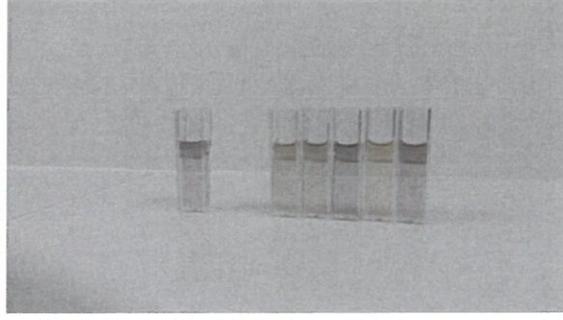
$$\text{DPPH:} \frac{(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}})}{A_{\text{kontrol}}} * 100$$

A örnek: Abs örnek – Abs Pozitif kontrol

A Kontrol: Negatif Kontrol (Blank)



Resim 3.2. Pozitif kontrol

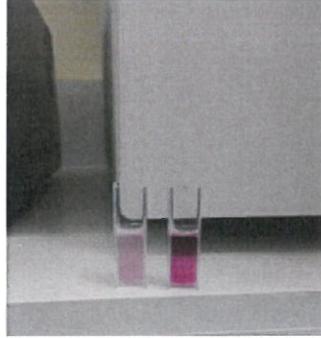


Resim 3.3. Negatif kontrol ve izolatlar

### 3.9. Metal iyonları şelatlama aktivitesi

Her izolat için final konsantrasyonu hesaplanmıştır. İzolatlar üzerine 50 µl 2 mM FeCl<sub>2</sub> çözeltisi ve 100 µl 5 mM Ferrozin çözeltisi eklenmiş, 10 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 10 dakika inkübasyon sonunda spektrofotometrede 562 nm'de izolatların ölçümleri yapılmıştır. Çalışmada kullanılan her konsantrasyon için FeCl<sub>2</sub> ve ferrozin içermeyen pozitif kontrol ve izolat içermeyen negatif kontrol hazırlanmıştır. Metal iyonlarının şelatlama yüzdesine göre antioksidan aktivitesi aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır. Metal iyonlarının şelatlama aktivitesi aynı protokolün çeşitli konsantrasyonlarındaki sentetik antioksidan olan trolox standartlarına uygulanması ile elde edilen şelatlama aktivitesine göre belirlenmiştir.

$$\text{Hesaplamalar: Şelatlama: } \frac{(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}})}{A_{\text{kontrol}}} * 100$$



Resim 3.4. D8-D9 izolatu

### 3.10. Total Fenol miktarı

Çalışma dört kontrollü olarak yapılmıştır. 0,1 ml hasat edilen hücre üzerine 0,2 ml % 50 folin ile karıştırılmış 3 dakika bekledikten sonra karışıma 1 ml % 2 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklenmiş ve vortekslenmiştir. 45 dakika karanlık ve oda sıcaklığında inkübe edilen izolatlar 760 nm'de spektrofotometrede ölçümleri yapılmıştır. Total fenolik miktarı tespitinde aynı protokolün çeşitli konsantrasyonlardaki gallik asit standardına uygulanması ile elde

edilen absorbans konsantrasyon grafiğine göre eş değer gallik asit (GAE) miktarı mg/ml olarak saptanmıştır.

$$\text{Total fenol: } y=0,0063x-0,0101 \quad x=(y+0,0101)/0,0063$$

Y:okunan abs deęeri

X:µg cinsinden fenol miktarı



Resim 3.5. D12 - D13izolatı

## 4.BÖLÜM

### BULGULAR

#### 4.1.İzolatların bulunması ve izolatların tanımlanması

Çeşitli gıdalardan izole edilen mayalar Nevşehir ilinden temin edilmiştir. YPD besi yerinde üreyen kolonilerden izole edilen maya izolatlarına ilk gram boyaları yapılmıştır. Gram boyama sonucunda maya olduğu düşünülen izolatlar stok kültür için YPD yatkı agar besi yerine ekimleri gerçekleştirilmiştir.

Gram boyaması tamamlanan preparat mikroskop ile incelenmek için kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlar üzerine 1 damla inversiyon yağı damlatılarak görüntü 100X objektifte incelenmiştir. İzolat kodlar, orjinleri Tablo 4.1' de verilmiştir. DPPH, metal iyonları şelatlanması ve total fenol miktarı yüksek olan izolatlara API 20C AUX (biomerieux) testi uygulanmıştır. API 20C AUX(biomerieux) testi sonucunda D17, D41 ve D42 izolatlarının *S.cerevisiae* olduğu saptanmıştır.

Tablo 4.1. İzolat kodları, orjinleri

İzolat Kodları	Orjin	İzolat Kodları	Orjin
D1	Yoğurt	D22	Üzüm Mayası
D2	Yoğurt	D23	Acılı
D3	Turşu Suyu	D24	Acılı
D4	Turşu Suyu	D25	Salça
D5	Peynir	D26	Salça
D6	Peynir	D27	Yoğurt
D7	Kombu	D28	Yoğurt
D8	Kombu	D29	Yeşil Zeytin Suyu
D9	Tereyağı	D30	Yeşil Zeytin Suyu
D10	Tereyağı	D31	Yeşil Zeytin Suyu
D11	Şarap	D32	Yeşil Zeytin Suyu
D12	Şarap	D33	Yeşil Zeytin Suyu
D13	Pekmez	D34	Yeşil Zeytin Suyu
D14	Pekmez	D35	Yoğurt
D15	Kefir	D36	Yoğurt
D16	Kefir	D37	Yeşil Zeytin Suyu
D17	Peynir	D38	Yeşil Zeytin Suyu

<b>D18</b>	Peynir	<b>D39</b>	Yeşil Zeytin Suyu
<b>D19</b>	Acılı	<b>D40</b>	Turşu Suyu
<b>D20</b>	Acılı	<b>D41</b>	Yoğurt
<b>D21</b>	Üzüm Mayası	<b>D42</b>	Yoğurt

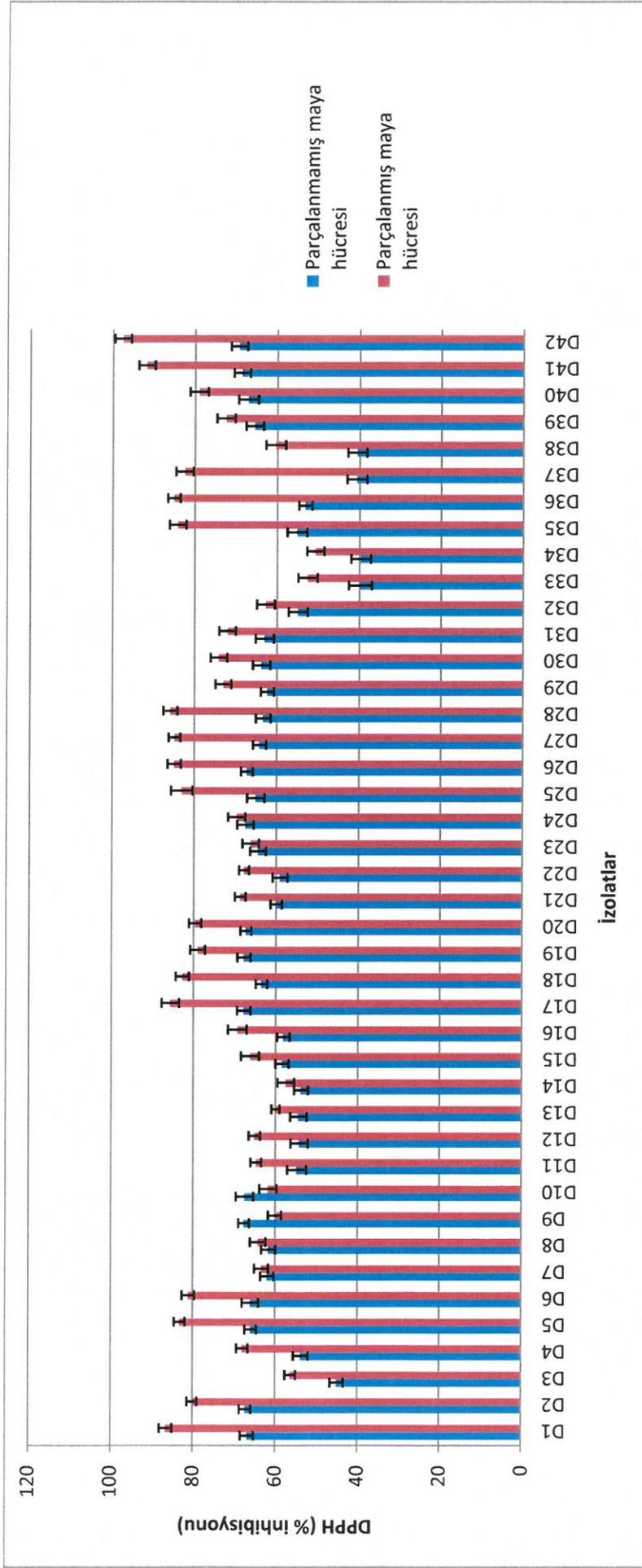
#### 4.2. DPPH radikali indirgenmesi

DPPH radikali indirgenmesi deneyinde parçalanmış ve parçalanmamış maya hücrelerinin antioksidan sonuçları % inhibisyonları Tablo 4.2. de gösterilmiştir. 30 dakika inkübasyon işlemi sonucunda izolatların parçalanmamış maya hücrelerinde en yüksek DPPH radikali indirgenmesi yoğurttan izole edilen *S. cerevisiae* D42 (%69,34) izolatında iken, parçalanmış maya hücrelerinde en yüksek DPPH radikali indirgenmesinin *S. cerevisiae* D42 (% 97,57) izolatında olduğu saptanmıştır.

Tablo 4.2. DPPH radikali indirgeme yüzdesi

İzolat Kodları	Parçalanmamış Maya Hücrelerinin DPPH Radikalini İndirgemesi	Parçalanmış Maya Hücrelerinin DPPH Radikalini İndirgemesi
D1	66,89±1,6	86,60±1,5
D2	67,34±1,4	80,24±1,2
D3	45,06±1,6	56,36±1,3
D4	53,82±1,8	68,06±1,4
D5	66,02±1,4	83,25±1,3
D6	66,10±2,0	81,18±1,5
D7	62,03±1,6	63,41±1,7
D8	61,70±1,7	64,27±1,9
D9	67,68±1,3	60,19±1,6
D10	67,51±2,1	61,82±2,1
D11	54,85±2,3	64,78±1,3
D12	54,23±2,1	65,15±1,4
D13	54,44±2,0	60,03±1,0
D14	53,82±1,7	57,52±2,0
D15	58,46±1,6	66,26±2,2
D16	58,17±1,5	69,37±2,3

D17	67,82±1,6	85,65±2,1
D18	63,53±1,4	82,77±1,6
D19	67,80±1,6	62,08±1,8
D20	67,39±1,3	62,71±1,5
D21	60,01±1,4	68,79±1,3
D22	59,09±1,8	67,86±1,2
D23	64,48±1,9	66,26±2,0
D24	67,55±2,0	69,68±2,1
D25	65,09±2,1	83,05±2,6
D26	67,26±1,4	84,90±1,6
D27	64,23±1,6	84,85±1,4
D28	63,36±1,8	85,87±1,7
D29	62,38±1,6	73,06±1,9
D30	63,82±2,1	74,17±2,0
D31	63,03±2,2	72,09±2,0
D32	54,94±2,3	62,77±2,2
D33	39,83±2,8	52,57±2,3
D34	39,67±2,4	50,71±2,1
D35	55,19±2,4	84,13±2,0
D36	53,17±1,6	85,08±1,5
D37	40,66±2,4	82,52±2,1
D38	40,58±2,3	60,44±2,4
D39	65,54±2,1	72,57±2,2
D40	67,10±2,4	79,08±2,2
D41	68,63±2,0	91,75±2,0
D42	69,34±2,0	97,57±2,0



Şekil 4.1. Parçalanmamış ve parçalanmış maya hücrelerinin DPPH radikalinin indirgenmesi.

Tablo 4.3. Maya izolatları ve troloxun DPPH radikalini indirgemesi

Parçalanmamış	T.E*	İzolatlar
<% 45	29,80' den 31,08	D33, D34 ,D37, D38
% 45-55	36,80' den 49,65	D3, D4, D11, D12, D13, D14, D32, D36
% 55-65	49,97' den 62,05	D7, D8, D15, D16, D18, D21, D22, D23, D27, D28, D29, D30, D31, D35
% 65-70	62,84' den 68,37	D1, D2, D5, D6, D9, D10, D17, D19, D20, D24, D25, D26, D39, D40, D41, D42
Parçalanmış		
<% 65	44.15' den 62,44	D3, D7, D9, D14, D32, D33, D34, D37, D38, D11,D13,D10,D8
% 65-70	62,92' den 68,81	D4, D12, D15, D22, D23,D21,D16,D24
% 70-80	71,94' ten 81,85	D19, D20, D40, D29, D30, D31, D39
% 80-100	82,54' ten 100	D2, D1,D28, D5, D6, D17, D18, D25, D26, D27, D35,D36,D37, D41, D42

(T.E\* Trolox eşleniği (mM))

#### 4.3. Metal iyonların (demir) şelatlama

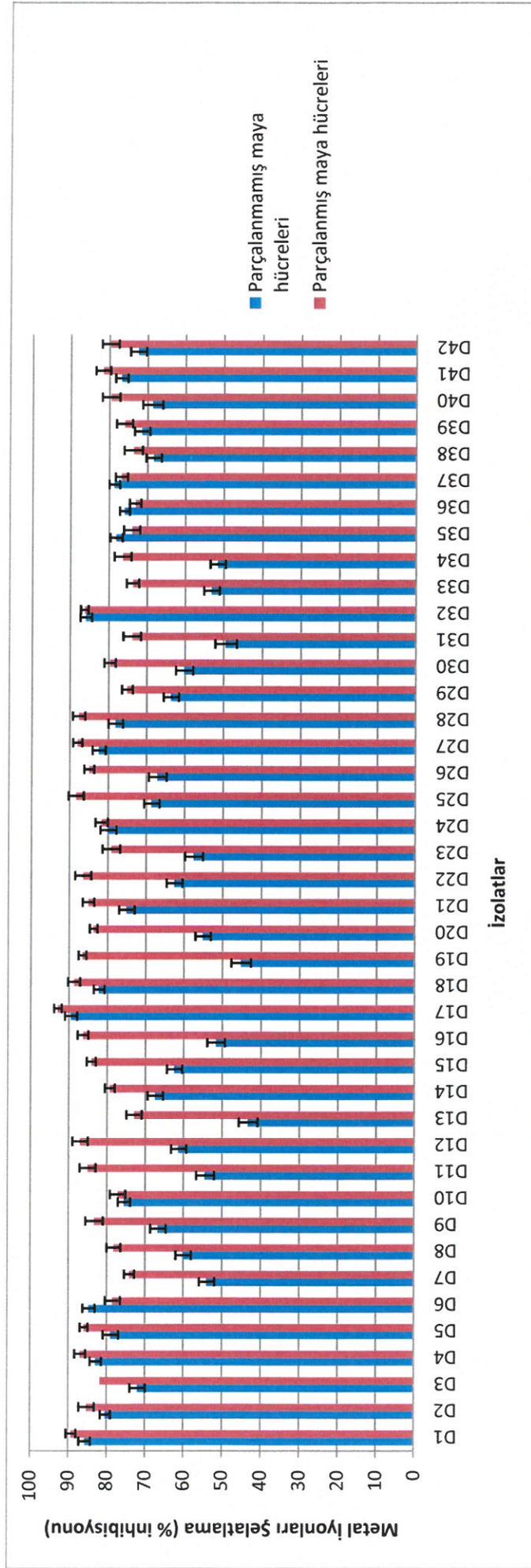
Metal iyonların şelatlama tayininde maya hücrelerinin parçalanmış ve parçalanmamış antioksidan aktivitesi % inhibisyonu Tablo 4.4'de verilmiştir. 10 dakika inkübasyon süresi sonunda parçalanmamış maya hücrelerinde en yüksek metal şelatlama aktivitesi peynirden izole edilen *S.cerevisiae* D17 (% 89,51) izolatında gözlemlenmişken, parçalanmış maya hücrelerinde en yüksek metal şelatlama aktivitesinin *S.cerevisiae* D17 (% 92,97) izolatında olduğu rapor edilmiştir.

Tablo 4.4. Metal iyonları şelatlama aktivitesi

İzolat kodları	Parçalanmamış Maya Hücrelerinin Metal Şelatlama Aktivitesi	Parçalanmış Maya Hücrelerinin Metal Şelatlama Aktivitesi
D1	85,74 ± 1,5	89,31 ± 1,3
D2	80,36 ± 1,3	85,26 ± 2,0
D3	72,00 ± 2,0	81,73 ± 1,0
D4	82,88 ± 1,5	86,96 ± 1,4
D5	78,97 ± 2,0	85,98 ± 1,0
D6	84,73 ± 1,6	78,49 ± 2,0

D7	53,98 ± 2,0	74,18 ± 1,3
D8	60,07 ± 2,0	78,25 ± 1,8
D9	66,68 ± 2,0	83,34 ± 2,3
D10	75,57 ± 1,6	77,23 ± 2,0
D11	54,44 ± 2,3	85,05 ± 2,1
D12	61,31 ± 2,0	87,04 ± 2,0
D13	43,29 ± 2,4	72,99 ± 2,0
D14	67,48 ± 2,0	79,32 ± 1,3
D15	62,45 ± 2,0	84,17 ± 1,2
D16	51,65 ± 2,3	86,35 ± 1,4
D17	89,51 ± 1,6	92,97 ± 1,0
D18	82,19 ± 1,4	88,73 ± 1,6
D19	45,20 ± 2,5	86,58 ± 1,0
D20	55,11 ± 2,0	83,66 ± 1,0
D21	75,05 ± 2,0	85,03 ± 1,5
D22	62,60 ± 2,1	86,44 ± 2,1
D23	57,54 ± 2,3	79,13 ± 2,3
D24	79,91 ± 2,1	81,68 ± 1,6
D25	68,65 ± 2,0	88,39 ± 2,0
D26	67,12 ± 2,3	84,97 ± 1,3
D27	82,40 ± 1,7	88,01 ± 1,2
D28	78,13 ± 1,9	87,69 ± 1,6
D29	63,64 ± 2,0	75,15 ± 1,4
D30	60,23 ± 2,2	79,64 ± 1,5
D31	49,43 ± 2,8	73,91 ± 2,3
D32	85,90 ± 1,5	86,32 ± 1,0
D33	53,15 ± 2,0	73,77 ± 1,6
D34	51,55 ± 2,0	76,40 ± 2,2
D35	78,11 ± 1,6	74,05 ± 2,1
D36	75,94 ± 1,3	73,19 ± 1,5
D37	78,62 ± 1,4	76,77 ± 1,6
D38	68,39 ± 2,0	73,72 ± 2,4
D39	71,43 ± 2,0	76,03 ± 2,1

D40	$68,70 \pm 2,6$	$79,55 \pm 2,3$
D41	$76,79 \pm 1,6$	$81,61 \pm 1,9$
D42	$72,46 \pm 2,1$	$79,71 \pm 2,2$



Şekil 4.2. Parçalanmamış ve parçalanmış maya hücrelerinin metal iyonlarının şelatlama aktivitesi

Tablo 4.5. Maya izolatları ve troloxun metal iyonları şelatlama aktivitesi

Parçalanmamış	T.E*	İzolatlar
>% 50	23,33'den 28,54	D13, D19, D31
% 50-60	30,24'den 35,03	D34, D16, D33, D7, D11,D20,D23,
% 60-70	37,06'dan 43,96	D8,D30, D12, D15, D22, D29, D26, D9, D38, D25, D40,
% 70-85	46,14'den 56,78	D39,D3,D42,D21,D10,D36,D41,D35,D28,D 37,D5,D24,D2,D18,D27,D4,D6
% 85-90	57,59'dan 60,61	D1, D32, D17
Parçalanmış		
>% 75	47,39' dan 48,34	D13,D36,D38,D33,D31,D35
% 75-80	49,12'den 52,77	D29,D39,D34,D37,D10,D8,D6, D7, D23,D14,D40,D30,D42
% 80-86	54,29'dan 57,78	D41,D24,D3,D9,D20,D15, D26,D21,D11,D2
% 86-95	58,06'dan 63,38	D32,D16,D22,D19,D4,D12, D28,D27,D25,D18,D1,D17

(T.E\* trolox eşleniği(mM))

#### 4.4.Total fenol miktarı

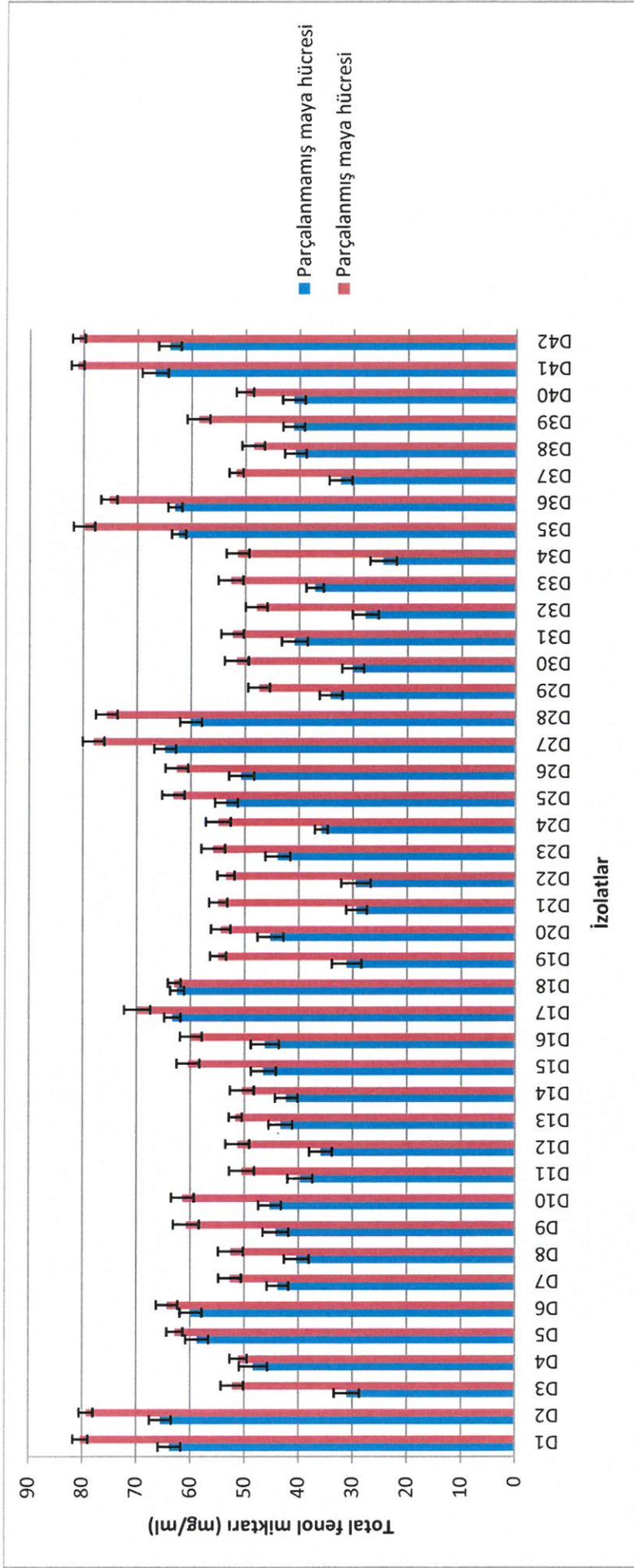
Total fenol miktarı maya hücrelerinin parçalanmamış ve parçalanmış antioksidan aktivitesi mg/ml olarak Tablo 4.6' de verilmiştir. 45 dakikalık inkübasyon süresi sonunda total fenol miktarı parçalanmamış maya hücrelerinde total fenol miktarı en yüksek olan izolat *S.cerevisiae* D42 ( 64,05 mg/ml) iken, parçalanmış maya hücrelerinde total fenol miktarı en yüksek olan izolatın *S.cerevisiae* D42 ( 80,86 mg/ml) olduğu saptanmıştır.

Tablo 4.6. Maya izolatlarının total fenol miktarları

İzolatlar kodları	Parçalanmamış maya hücrelerinin Total Fenol miktarı	Parçalanmış maya hücrelerinin Total Fenol miktarı
D1	63,82 ± 2,1	80,32 ±1,4
D2	65,52 ± 2,0	79,27 ±1,3
D3	31,05 ± 2,3	52,22 ± 2,1
D4	48,35 ± 2,6	51,11 ±1,6
D5	58,75 ± 2,1	62,86 ±1,5
D6	59,89 ± 2,0	64,29 ±2,0
D7	43,83 ± 2,0	52,70 ±2,1

D8	40,33 ± 2,3	52,54 ± 2,3
D9	44,22 ± 2,4	60,79 ± 2,4
D10	45,33 ± 2,1	61,43 ± 2,1
D11	39,70 ± 2,3	50,51 ± 2,3
D12	35,89 ± 2,1	51,30 ± 2,2
D13	43,35 ± 2,2	51,68 ± 1,2
D14	42,28 ± 2,1	50,48 ± 2,2
D15	46,52 ± 2,3	60,44 ± 2,1
D16	46,25 ± 2,6	59,92 ± 2,0
D17	63,35 ± 1,5	69,84 ± 2,4
D18	62,48 ± 1,3	63,02 ± 1,2
D19	31,13 ± 2,7	54,92 ± 1,5
D20	45,25 ± 2,4	54,44 ± 1,8
D21	29,34 ± 1,9	54,92 ± 1,7
D22	29,46 ± 2,7	53,49 ± 1,6
D23	43,90 ± 2,3	55,87 ± 2,2
D24	35,85 ± 1,2	54,92 ± 2,3
D25	53,43 ± 2,1	63,25 ± 2,1
D26	50,66 ± 2,3	62,62 ± 2,1
D27	64,79 ± 2,0	78,02 ± 2,0
D28	60,00 ± 2,0	75,60 ± 2,0
D29	34,14 ± 2,1	47,46 ± 2,0
D30	30,06 ± 2,0	51,59 ± 2,2
D31	40,85 ± 2,4	52,38 ± 2,1
D32	27,79 ± 2,4	47,94 ± 2,0
D33	37,12 ± 1,6	52,70 ± 2,3
D34	24,54 ± 2,4	51,43 ± 2,1
D35	62,33 ± 1,3	79,83 ± 2,0
D36	63,02 ± 1,3	75,22 ± 1,5
D37	32,40 ± 2,1	51,73 ± 1,3
D38	40,75 ± 2,0	48,56 ± 2,1
D39	41,09 ± 2,0	58,71 ± 2,1
D40	41,05 ± 2,1	50,14 ± 1,6

D41	$66,76 \pm 2,4$	$81,11 \pm 1,2$
D42	$64,05 \pm 2,1$	$80,86 \pm 1,2$



Şekil 4.3. Parçalanmamış ve parçalanmış maya hücrelerinin total fenol miktarı.

## 5.BÖLÜM

### TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Antioksidanlar serbest radikalleri engelleyerek hastalıkları önlemede önemli bir yere sahiptir. Antioksidanların insan sağlığı açısından önemi yapılan çalışmalar ile ortaya çıkarılmıştır yapılan çalışmalarda vücudun antioksidan savunma mekanizmasının serbest radikallerin meydana getirdiği hasarların hepsini önleyemediği ortaya çıkmıştır. Bu nedenle gıdalarda bulunan antioksidanlar ve önemleri araştırılmaktadır [74]. İşlenmiş ürünlerde ise sentetik antioksidanların gıdaların bozulmasını engellediği ve raf ömrünü uzattığı bulunmuştur. Gıda maddelerinde katkı maddesi olarak kullanılmıştır. Fakat bu sentetik antioksidanların toksik etkisi ortaya çıkması ile doğal antioksidanlara karşı ilgi ve araştırmalar artmıştır [75,76].

Doğal antioksidan olarak kabul edilen insan besinlerinde önemli yer tutan meyve ve sebzeler en iyi kaynaklardır. Sebze ve meyvelerin en iyi kaynak olarak belirtilmesinin nedeni içeriğinde bulunan fenolik bileşikler, karotenoidler, askorbit asit' dir. Son yıllarda yapılan çalışmaların amacı, antisiyaninlerin lipit peroksidasyonunu inhibe etme ve serbest radikalleri tutma özelliğinin olduğunu, antisiyanince zengin olan sebze ve meyvelerin yüksek antioksidan kapasiteleri ile birçok hastalığın engellenmesinde önemli görevlerinin olduğunu ortaya çıkartmaktadır [77].

Yapılan çalışmalar sonucunda doğal kaynaklı antioksidan özellik gösteren besinlerin başında bitkiler geldiği belirtilmiştir. Doğal antioksidan özelliği bitkilerin tohum, gövde, yaprak olmak üzere tüm dokularında gözlemlenmektedir [78]. Bol miktarda meyve ve sebze tüketimi sonucu, hastalıklara yakalanma riskinin azaldığı, kanser, kalp ve damar hastalıklarından kaynaklanan ölümlerin önemli derecede azaldığı yapılan çalışmalarda belirtilmektedir [79].

Probiyotikler ise insan sağlığı açısından önemli yere sahip canlı mikroorganizmalardır. Probiyotik besinlerin besleyici değerinin yanı sıra kolay sindirilebilirliği, içerdiği çeşitli vitamin, mineral ve mikroorganizmaların sağlığa olumlu yönde etkileri araştırmalar sonucunda ortaya çıkmıştır. Günlük yaşantımızda bu besin grubu insanların her öğünlerinde yer almaya başlamıştır. Probiyotik gıdaların mikrobiyal florası ve sağlık

üzerinde olumlu etkilerini inceleyen bir çok çalışma olmasına karşılık antioksidan özelliklerinin değerlendirilmesi çalışmaları oldukça azdır. Antioksidan kapasiteye sahip maddeler, metabolizma üzerindeki zararlı olan hücre ve DNA' yı oksidatif hasara neden olan serbest radikallerin olumsuz etkilerinin en aza indirdiği bilinmektedir [80].

Probiyotik özellikteki gıdaların içeriğinde bulunan mayaların antioksidan özellikleri ile ilgili yok denecek kadar az çalışma bulunmaktadır. Çalışmada kullanılan materyalin gıda mayalarından seçilmesinin nedenleri ekonomik açıdan kolay ve kısa sürede üretilebilmeleridir. Ayrıca probiyotik olmaları da sağlık açısından önem arz etmektedir. Hastalıkların gelişim riskinin düşmesi için oksidatif hasarın da azaltılması gerekmektedir, bu nedenle doğal antioksidan çalışmalarına karşı artan bir ilgi vardır

Son zamanlarda mayalarda ve maya özütünün, hücre duvarında bulunan çeşitli maddeler (süperoksit dismutaz, katalaz, karatenoid, resveratrol, oktakosanol) ve  $\beta$  glukozların çok önemli görevleri olduğu için antioksidan aktiviteye sahip oldukları belirtilmiştir [81].

Bu çalışmada çeşitli probiyotik gıdalardan izole edilen mayaların antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır ve elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir. Peynir, yoğurt, turşu suyu, zeytin suyu, şarap, kombu, tereyağı, salça, kefir, acılı, üzüm mayası ve pekmezden izole edilen mayaların antioksidan aktiviteleri, DPPH radikali, metal şelatlama kapasitesi, total fenol miktarı gibi yöntemlerle incelenmiştir.

Bu çalışmada peynir, yoğurt, turşu suyu, zeytin suyu, kefir, acılı, üzüm mayası, kombu, şarap, tereyağı, salça ve pekmezden toplam 42 maya izole edilmiş ve antioksidan aktivitesi en yüksek olan izolatların tanımlamaları API 20C AUX (biomérieux) göre yapılmıştır. Tanımlama sonuçlarına göre D17, D41 ve D42 izolatları *S.cerevisiae* olarak saptanmıştır.

*Saccharomyces* cinsleri, diğer mantarlarda olduğu gibi, insana karşı patojenik bir etkisi bulunmadığı bildirilmiştir [89].

Bu çalışmada maya hücrelerinin parçalanmadan direkt olarak ve parçalanarak antioksidan aktiviteleri mukayese edilerek incelenmiştir.

Toplamda 42 izolatın DPPH radikali indirgenmesi özelliği incelenmiştir. Parçalanmamış izolatlar içerisinde en yüksek DPPH radikali temizleme aktiviteye sahip yoğurttan izole edilen *S.cerevisiae* D42 (% 69,34) iken parçalanmış izolatlar içerisinde DPPH radikali indirgenmesi aktivitesi en yüksek yine *S.cerevisiae* D42 (% 97,57) izolatı olduğu saptanmıştır. Parçalanmamış izolat içerisinde en düşük DPPH indirgenmesi aktivitesine sahip zeytin suyundan izole edilen D34 (% 39,67) iken parçalanmış izolatlar içerisinde en düşük DPPH radikali indirgenme aktivitesi D34 (% 50,71) izolatı olduğu saptanmıştır. Parçalanmış maya hücrelerinin DPPH radikalinin indirgenmesi daha yüksek olduğu görülmektedir.

Farvin ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan çalışmada: Yoğurdun DPPH radikalinin indirgeme aktivitesini % 94,47 olarak tespit etmişlerdir ve yoğurdun yüksek antioksidan özelliğinin olduğunu bildirmişlerdir [82].

Amirdivani ve Baba tarafından 2011 yılında yapılan çalışmada: Sütten yoğurt eldesi süresinin sonunda DPPH radikali indirgeme aktivitesinin süte göre artmış olduğunu belirtmiştir, nedeninin ise yoğurta bulunan mikroorganizmaların düşük sıcaklıkta metabolik olarak aktif kalabilmesi ve devam eden mikrobiyal gelişiminin antioksidan aktivitenin ve bazı fenolik bileşenlerin etkilenmesi olarak açıklanmışlardır [83].

Naylin ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada: Mayaların antioksidan aktivitesinin incelediği çalışmada, *S.cerevisiae* maya türlerinin saptadığı DPPH radikali indirgenmesi % 17,1 iken [84], bu çalışmada parçalanmamış DPPH radikali indirgenmesi *S.cerevisiae* D42 % 69,37 iken, D42 izolatının parçalanmış hücrelerinde ise % 97,57 olduğu saptanmıştır.

*S.cerevisiae* (yoğurt) izolatlarının DPPH radikali süpürme aktiviteleri standart antioksidan olan trolox ile kıyaslanmıştır. Parçalanmamış maya hücrelerinin DPPH radikalinin süpürme etkisi en yüksek yoğurt'dan izole edilen *S. cerevesiae* D42 (% 69,34) iken, çeşitli konsantrasyon setleri ile trolox'un etkisi ise % 68 olduğu tespit edilmiştir. Parçalanmış maya hücrelerinde en yüksek DPPH radikalinin indirgenmesi *S. cerevesiae* D42 izolatı (% 97,57) iken, trolox eşleniği ise % 100 olarak tespit edilmiştir. *S. cerevesiae*' nın antioksidan etkisi sentetik antioksidan olan trolox kadar etkili olduğunu söyleyebilir.

Wanasundra ve arkadaşları tarafından 1998 yılında yapılan çalışmada: Sentetik antioksidanların karsinojik etkiye sahip olduğunu bu nedenle doğal antioksidanlara olan ilginin arttığını bildirmişlerdir. [85].

*S.cerevesiae*, iyi bir probiyotik olduğu için bağırsaklara yardımcı olmaktadır ve sağlıklı bir metabolik aktivitenin oluşmasına neden olmaktadır. *S.cerevisiae*' nin diğer bir özelliği ise fazla antibiyotik kullanımı veya günlük yaşantının getirdiği koşullara bağlı olarak bozulan bağırsak mikroflorasının tekrar düzelmesine yardımcı olmaktadır. Gelişmesinin istenmediği diğer mikroorganizmaları kontrol altında tutarak doğal bağırsak florasını bozulmasına engel olmaktadır [86]. Yapılan bu çalışmada da en yüksek aktivite gösteren yoğurt, peynir izolatları probiyotik olan *S. cerevesiae* olarak tanımlanmıştır.

Metal iyonları şelatlama aktivitesinde 42 izolat kullanılmıştır. 42 parçalanmamış izolat içerisinde en yüksek aktiviteyi gösteren peynirden izole edilen *S.cerevisiae* D17 (% 89,51) izolatiiken, parçalanmış maya hücrelerin de en yüksek aktiviteyi gösteren *S.cerevisiae* D17 (% 92,97) izolatu olduğu tespit edilmiştir. Parçalanmamış metal iyonları şelatlama aktivitesinde en düşük aktiviteyi gösteren izolat pekmezden izole edilen D13 (% 43,29) iken, parçalanmış maya hücrelerinde en düşük aktiviteyi gösteren D13 (% 72,99) izolatu olduğu saptanmıştır. Parçalanmış maya izolatlarının metal iyonlarının şelatlama aktivitesinin parçalanmamış hücrelere nazaran daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Pihlanto tarafından 2006 yapılan çalışmada: Süt ve süt ürünlerinin proteolitik enzimler ile elde edilen peptitlerin antioksidan aktivite gösterdiklerini bildirmişlerdir. Kazeinler, demir, çinko, kalsiyum ile kompleks oluşturabilen fosforlanmış parçacıklar içeren özelleşmiş dizilimindeki polar bir kısma sahiptir. Kazeinler bu fosforlanmış özelliği ile ferrik iyonunu bağlayarak ferro demir oksidasyonunu hızlandırabilmektedirler. Kazein alt birimi olan  $\alpha$ -kazein,  $\beta$ -kazeinlerin antioksidan özellikleri lipozomal modelle incelenmiş ayrıca tüm alt birimlerin multilameler lipozomların içine yerleşmiştir ve Fe ile uyarılmış olan arşidonik asit peroksidasyonunu inhibe edildiği belirtilmiştir. En fazla etkiyi gösteren alt birim ise fosfor içeriğine sahip olan  $\alpha$ -kazein olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte kazein hidrolizatlarının eşit fosfor'a sahip zenginleştirilmiş kazein fosfopeptidlerden daha etkili bir lipit oksidasyon engelleyici

olduğu saptanmıştır. Dolayısıyla kazeinlerin lipit peroksidasyonunu inhibe etme mekanizması demir bağlama özelliklerinden dolayı ile süperoksit ve hidrojen hidroksil gibi oksijen radikal oluşumlarını önleyebilme yeteneğini olduğu düşünülmektedir [89]

Farvin ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada: Süt ve süt ürünleri ile yaptığı antioksidan aktiviteleri ile yaptığı çalışmada, süt ürünlerinin metal şelatlama aktivitesi için bulduğu değer % 7,77 [83], iken bu çalışmada peynir' den izole edilen maya izolatu, parçalanmamış hücrelerin metal iyonları şelatlama aktivitesi *S.cerevisiae* D17'de % 89,51 iken, parçalanmış maya hücrelerinde ise en yüksek *S.cerevisiae* D17 (% 92,97) izolatu olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda endüstriyel kaynaklı olmayan maya hücrelerinin antioksidan aktivitesinin daha yüksek olduğu görülmektedir.

*S.cerevisiae* peynir izolatu metal iyonlarının şelatlama aktivitesi standart antioksidan olan trolox ile kıyaslandığında parçalanmamış maya hücreleri ile yapılan çalışma sonunda en yüksek değer peynirden izole edilen *S.cerevisiae* D17(% 89,51) iken trolox eşleniği % 60,61 olduğu saptanmıştır. Maya hücrelerinin parçalanması ile yapılan çalışmada ise *S.cerevisiae* D17' de % 92,97 iken trolox eşleniği ise % 63,38 olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda *S.cerevisiae*' nin kuvvetli metal iyonları şelatlama aktivitesinin olduğu söylenebilir. Bu sonuçlara göre trolox ile izolatların metal iyonlarının şelatlama aktivitesi arasında pozitif korelasyon olduğu görülmektedir.

Total fenol miktarının belirlenmesi için kullanılan 42 izolat arasından parçalanmamış izolatlar içerisinde en yüksek total fenol miktarına sahip yoğurttan izole edilen *S.cerevisia* D42 (64,05 mg/ml) iken, parçalanmış izolatlar içerisinde total fenol miktarı en yüksek olan izolat yine *S.cerevisiae* D42 (80,86 mg/ml) olduğu saptanmıştır. İzolatlar içerisinde en düşük total fenol miktarına sahip zeytin suyundan izole edilen D29 (34,14 mg/ml) iken, parçalanmış izolatlar içerisinde en düşük izolat D29 (47,46 mg/ml) olduğu tespit edilmiştir. Tüm izolatlarda, parçalanmış maya hücrelerinin total fenol miktarının parçalanmamış hücrelere nazaran daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Taşkın tarafından 2011 yılında yapılan çalışmada: Piyasadan satın alınan farklı markalara ait yoğurtlarda toplam fenolik madde içeriğini en yüksek 20,81 mg/ml olduğunu tespit etmişlerdir [88], bu çalışmadaki ev yapımı yoğurtlarından izole edilen

mayaların total fenol miktarlarının daha yüksek olmasının nedeni, izolatların ev yapımı yoğurt orijinli olduğundan kaynaklanmaktadır.

Amirdivani ve Baba tarafından 2011 yılında yapılan çalışmada: Çalışmaların birinde süte nane, fesleğen gibi aromatik otlar katarak yapılan yoğurdun hem fermantasyon hemde depolama süreci sonunda sade yoğurda göre daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca çalışmada sade yoğurdun depolama süresi boyunca toplam fenolik bileşiğinin arttığı belirtilmiştir. Sade yoğurdun fenolik içeriğinin süt proteinlerinin parçalanmasından ileri geldiğini rapor etmişlerdir. Bununla birlikte proteinlerin parçalanması sonucu serbest kalan triozin aminoasidinin fenolik yan zincirinin bu artışa neden olduğu ve fermantasyon boyunca ve asitleşme sonrasındaki ferulik ve p-kumarik asit gibi bazı fenolik asitlerin mikrobiyal kullanımı aromatik yapı parçalanmadan önce vanilik ve p-hidroksibenzoik asit gibi fenolik bileşenlerin ortaya çıktığı düşünülmektedir. DPPH aktivitesi ise depolama sürecinin başlarında en yüksek seviyede iken, 7 günlük depolama süresinden sonra azalma göstermiştir. Çalışmada aromatik bitki içeren yoğurdun sade yoğurda göre daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olmasının nedeni yoğurda takviye edilen aromatik bitkilerin fitokimyasal bileşenlerinden (flavonoid, ferulik asit, tanin gibi) ve bazı mikrobiyal metabolik aktivitelerden kaynaklandığını rapor etmişlerdir [83].

Taşkın tarafından 2011 yılında yapılan çalışmada: Total fenol miktarı ve DPPH radikalini indirgemesi arasında bir korelasyon olduğunu istatistiksel olarak önemli olduğunu tespit etmiştir ( $p < 0,01$ ) [89]. Bu çalışmada da total fenol miktarı ve DPPH radikali indirgemesi arasında pozitif korelasyon olduğu saptanmış ( $p < 0,01$ ) ve Taşkın'ın yaptığı çalışma ile paralellik göstermiştir.

Bu çalışmada hücrelerin parçalanması ile daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun nedeni mikroorganizmalarda bulunan super oksitdismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin yanı sıra askorbat ve eritro askorbatlardır. Parçalanmamış hücrelerin ise antioksidan özellikleri hücre duvarında bulunan  $\beta$  glukoz,  $\alpha$  mannan, mannoproteinleri, lipitler ve kitinden kaynaklanmaktadır [81].

Bu çalışmada çeşitli gıdalardan izole edilen mayaların antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Parçalanmış 42 izolatın gıdalara göre DPPH radikali indirgeme potansiyeli yüksekten düşüğe doğru; yoğurt, peynir, salça, kefir, tereyağı, zeytin suyu, turşu suyu, üzüm mayası, kombu, pekmez, acılı ve şarap'da görülmüştür. Metal iyonları şelatlama aktivitesinde yüksekten düşüğe doğru; peynir, yoğurt, acılı, üzüm mayası, kefir, salça, şarap, zeytin suyu, kombu, pekmez, tereyağı görülmüştür. Gıdaların total fenol miktarı ile DPPH aktivitesi arasında pozitif korelasyon olduğu tespit edilmiştir.

Chen ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptığı çalışmada: Maya hücrelerini parçalamadan ve parçalayarak antioksidan aktivitelerini incelemiştir fakat bu çalışmada maya türleri sadece çiğ süttten izole edilen mayaların sadece DPPH radikali indirgenmesi incelenmiştir [81].

İlk defa yapılan bu çalışma ile farklı ev yapımı gıdalardan izole edilen 42 izolatın parçalanmadan ve hücreleri parçalanarak DPPH radikali indirgenmesi, metal iyonları şelatlama aktivitesi ve total fenol miktarı tespit edilmiştir. Çalışma sonuçları doğrultusunda DPPH radikalini indirgenmesi ve total fenol miktarı arasında pozitif korelasyon olduğu belirtilmiştir.

Doğal antioksidanların ticari olarak satılan antioksidanlardan daha etkili olduğu ve insan sağlığı için patojen etki yaratmadığı çalışmalar ile rapor edilmiştir.

Yapılan deneysel sonuçlara göre probiyotik olarak bilinen, antioksidan aktivitesinde yüksek olan *S. cerevesiae*, herhangi bir alerjen etkisi ve patojenik etkisi bulunmadığı için bebek mamaları ve çeşitli gıdalarda katkı maddesi olarak kullanımı öngörülebilir.

## KAYNAKÇA

1. Akkuş, İ., (1995). Serbest Radikaller Ve Fizyopatolojik Etkileri, 5. *Sağlık Dizisi, Mimoza Yayınları*, Konya.
2. Halliwell, B. Ve Aruoma, O. I., (1991). "DNA Damage By Oxygen-Devired Species: Its Mechanisms nd Measurement In Mammalian Systems", *FEBS Letters*, 281:9-19.
3. Wanasundara, U.N., Shahidi, F.1998. "Antioxidant And Pro-Oxidant Activity Of Green Tea Extracts İn Marine Oils, *Food Chemistry*", 63:335-342.
4. Reed. G.,Nagodawithana, T. W., 1991. "Yeast Technology,"*2nd Edition. Publishng*, New York.
5. Da Costa Morato Nery D, Da Silva CG, Mariani D, Fernondes PN, Pereina MD, Penek AD,(2008). Eleutherio EC
6. Deak, T. Ve Beauchat, L. L. (1996). "Handbook Of Food." *Spoilage Yeast*. Florida: CRC Press.
7. Samson, R. A., Hocking, A. D., Pitti, J. I. Ve King, A. D. "Modern Methods İn Food." *Mycology. Elsevier*, 1992. Amsterdam.
8. Molina M., Gil C., Pla J., Arroyo J., Nombela C., 2000. "Protein Localization Approaches For Understanding Yeast Cell Wall Biogenesis." *Microscopy Research And Technique*, 51:601-612.
9. Klis F.M., Mol P., Helling Werf K., Brul S., 2002. "Dynamics Of Cell Wall Structure İn *Saccharomyces Cerevsiae*." *FEMS Microbiology Reviews*, 26(3):239-256.
10. Montijn, R. C., Vink, E., Muller, W. H., Verkleij, A. J. Van Den Ende, H., Henrissat, B., Klis, F. M., 1999. " Localization Of Synthesis Of Beta 1,6 Glukan İn *Saccharomyces Cerevisiae*." *J. Bakteriöl.*, 181:7414-7420.
11. Perez, P., Ribas, J. C., 2004. "Cell Wall Analysis." *Methods*, 33(3):245-251.
12. Montijn, R. C., Van Rinsum, J. Van Schagen, F. A., Klis, F. M., 1994 "Glucmannoproteins İn The Cell Wall Of *Saccharomyces Cerevisiae* Contain A Novel Type Of Carbonhydrate Side Chain." *J. Bial. Chem*, 269(30):19338-19342.
13. Pitt, J. I. Ve Hacking, A. D. (1997). " Fungi And Food Spoilage" *Cambridge: University Press*.

14. Gervais P. Ve Marechal P. A. (1994). “ Yeast Resistance To Higt Leves Of Osmotic Pressure: Influence Of Kinetics.” *Journal Of Food Engineering*, 22:399-407.
15. Van Uden, N. (1984). “Temperature Profiles Of Yeast” *Adv. Microbiology Physiolog*, 25:195-254.
16. Deak, T., (1991). “ Foodborne Yeasts.” *Advances In Applied Microbiolog*, 36:179-278.
17. Mehta, M.D., and Gair, J.J. (2001), “ Social, political, legal and ethical areas of inquiry in biotechnology and genetic engineering” *Tecnology in Society*, 23 (2):241-264
18. TÜSİAD (2000). “Uluslararası rekabet stratejileri biyoteknoloji”, TÜSİAD yayın no:12/289, İstanbul.
19. Altınışık. M., (2000). “Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar,” *Adnan Menderes Üniversitesi*, Aydın.
20. Kılınç K., Ve Kılınç A., (2002). “Oksijen Toksisitesinin Aracı Molekülleri Ortak Oksijen Radikalleri.” *Hacettepe Tıp Dergisi*, 33(2):110-118.
21. Golden, T., Hinerfeld, D.A. Ve Melov, S.,(2002). “Oxidative Stress And Anging: Beyoncorrelation”, *Aging Cell*, 1:117-123.
22. Dizdaroğlu, M., Jaruga, P., Birincioğlu, M. Ve Rodriguez, H., (2002). “ Free Radical- İnduced Damage To DNA: Mechanisims And Measurement”, *Free Radical Biology & Medicine*, 32:1102-1115
23. Staller, T. F., Cheeseman, K. H., Dovies, M. J. Proudfood, K. Ve Xin, W., (1987). “Free Radical Mechanisms İn Relation To Tissue İnjury”, *Proceedings Of The Nutrition Society*, 46:1-12
24. Kahkoren, M. P., Hopia, A. I. Heikki, J. V., Rouha, J. P., Pihlaja K., Kujala, T. S., Heinonen, M., 1999, “Antioxidant Activity Of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds”, *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 47,3954-3962.
25. Nagai, T., Myoda, T. And Nagashima T. 2005. “Antioxidative Activities Of Water Extract And Ethanol Extract From Field Horsefail Equisetum Arvense.” *Food Chemistry* 91:389-394
26. Cao, G., Prior R. L., 1999, “ In Vivo Antioxidant Capacity: Comparison Of Different Analytical Methods”, *Free Radical Biology & Medicine* 27,1173-1182.

27. Rice-Evens, C. A, Miller, N. J. And Paganga G. 1997. "Antioxidant Proferties Of Phenolic Compounds." *Trends In Plant Science*, 2:152-159
28. Pektaş, İ.,(2009). "Bitki Gelişim Düzenleyicilerinin Antioksidan Enzimler Üzerindeki Etkisinin Araştırılması." *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, Balıkesir.
29. Mccord, J., (2000). " The Evolution Of Free Radicals And Oxidative Stress" *American Journal Of Medicine*, 108:652-659.
30. Altınışık, M., (2008), Serbest Oksijen Radikalleri Ve Antioksidanlar.
31. Özkan, A. Gündüz, G., Çıplak, B., Fışkın, K. 2000. "Kimyasal Mücadele Uygulanmış Daciostaurus Marroccanus Epidemik Populasyonundan Alınan Örneklerde Antioksidan Enzim Aktiviteleri." *Turkish Journal Of Biology*, 24:141-149.
32. Antmen, E. 2005. "Beta Talosemide Oksidatif Stress." *Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, Adana
33. Perera CO, Yen GM. "Functional Properties Of Carotenoids In Human Healt". *Interrational Journal Of Food Properties* 2007; 10:201-230.
34. Gök V, Serteser A. "Doğal Antioksidanların Duyarlılığı" 3. *Gıda Mühendisliği Kongresi*, 2-4 Ekim, 2003, Ankara.
35. Çöllü, Z. 2007. "Utica Pilulifera L. Bitkisinin Antioksidant Aktivitesinin Araştırılması," *Ondokuzmayız Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, Samsun.
36. Peterson, J.,Dwyer, J. 1998.Flavonoids: "Dietary Occurrence And Biochemical Activity". *Nutrition Research*, 18: 1995-20018.
37. Eken, S. 2007. "Bazı Materyallerde Antioksidan Tayinleri." *Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul.
38. Keskin, H. Ve Erkmen G. 1987. "Besin Kimyası." *Güryay Matbaacılık İstanbul Beşinci Basım*: 25-35.
39. Çakmakçı, J Ve Çelik, I. 2000. "Gıda Katkı Maddeleri", *Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi*, 249. S., Erzurum.
40. Sezgin, N. 2006 "Adaçayı (*Salvia Spp.*) Bitkisinde Antioksidan Maddelerin Araştırılması," *İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul.

41. Wanasundara, U. N., Shahidi, F. 1998. "Antioksidant And Pro-Oxidant Activity Of Green Tea Extracts In Marine Oils," *Food Chemistry*, 63: 335-342.
42. Hughes, K. And Choon, N. O. 1998. Vitamins, Selenium, Iron And Coronary Heart Disease Risk In Indians, Malays, And Chinese In Singapore. *J. Epidemiol. Commun. H.* 52(3): 181-185.
43. Thurnham, D. I. 1993. Chemical Aspects And Biological Mechanisms Of Anticancer Nutrients In Plant Foods. In "Food And Cancer Prevention: Chemical And Biological Aspects. (Eds: K. W. Waeldron, J. T. Johnson, G. R. Fenwick)". *The Royal Society Of Chemistry*. P. 461.
44. Williams, G. M. 1993. Food: Its Role In The Etiology Of Cancer. In "Food And Cancer Prevention: Chemical And Biological Aspects.(Eds: K. W. Waeldron, J. T. Johnson, G. R. Fenwick)". *The Royal Society Of Chemistry*. P:3-11.
45. Chen, L. H., Bossonneault, G. A. And Glauert, H. P. 1988. "Vitamin C. Vitamin E And Cancer (Review)". *Anticancer Res.* 8: 739-748.
46. Lathia, D. And Blum, A. 1991. "Role Of Vitamin E As Nitrite Scavenger And Nitrosamine Inhibitor". *Fett-Wiss. Technol.* 93(6): 271-274.
47. Byers, T. Lachance, P. And Pierson, H. 1990. "New Directions. The Diet-Cancer Link." *Patient Care* 24:34-48
48. Klaunig, J. E., Yong, X., Chi, H., Kamendulis, L. M. Chen, J. S., Heiser, C., Gordon, M. S. Mohler, E. R., Xu, Y., Han, C., Chen, J. S. And Weisburger, J. H. 1999. "The Effect Of Tea Consumption On Oxidative Stress In Smokers And Non-Smokers". *Proceedings Of The Soc. For. Exp. Biol. And Medicine* 220(4):249-254.
49. Yao, L. L., Meng, S. S., Hsing, C. And Ming, J. S. 1999. "The Effects Of Garlic And Onion On Lowering The Plasma Lipid Level And Antioxidative Function In Hamsters." *Food Sci. -Taiwan* 26(1): 97-108.
50. Nestel, P. J., 1995. "The Role Of Antioxidants In Preventing Coronary Heart Disease." *Food Australia* 47(3): 28-29.
51. Jacob, R. A. And Burri, B. J. 1996. "Oxidative Damage And Defence ". *Am. J. Clin. Nutr.* 63(6): 985-990
52. Hercberg, S., Galan P., Preziosi, P. Alvarez, M. And Vasquez. C. 1998. "The Potential Role Of Antioksidant Vitamins In Preventing Cardiovascular Disease And Cancers". *Nutrition* 14: 513- 520.

53. Siegel, B. V. And Klurfeld, D. M. 1993. Vitamin C And The Immune Response In Health And Disease. In "Nutrition And Immunology Human Nutrition: A Comprehensive Treatise Volume 8" *Plenum Publ.* New York, P. 167-196.
54. Weindruch, R. 1996. "Caloric Restriction And Aging." *Sci. Am.* 274(1): 32- 38.
55. Byung, P. Y. 1994. "How Diet Influence The Aging Process Of The Rat". *Proceedings Of The Society For Experimental Biology And Medicine* 205(2): 97-105.
56. Werman, M. J., Mokady, S., Neeman, I., Auslaender, L. And Zeidler, A. 1989. "The Effect Of Avocado Oils On Some Liver Characteristics In Growing Rats". *Food Chem. Toxicol.* 27(5): 279-282.
57. Bermond, P. 1990. Biological Effect Of Food Antioxidants In "Food Antioxidants"(Ed: B. J. F. Hudson). *Elsevier Sci. Barking. England.* P. 193-252
58. Dickerson, J. W. T. 1995. "Pharmacological Effect Of Food Ingredients". *Food-Sci & Tech. Today* 9(3): 167-173.
59. Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Çelik S. E., Bektaşoğlu B., Berker K. I., Özyurt, D. 2007. "Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the cuprac assay". *Molecules*, 12: 1496-1547.
60. Lopez-Alarcon, C. And Lissi, E. 2005. "Interaction Of Pyrogallol Red With Peroxyl Radicals. A Basis For A Simple Methodology For The Evaluation Of Antioxidant Capabilities". *Free Radical Research*, 39(7): 729-736.
61. Cao, G., Alessio H. M. And Cutler, R. G. 1993. "Oxygen-Radical Absorbance Capacity Assay For Antioxidants". *Free Radical Biology And Medicine*, 14: 303-11
62. Bors, W., Michel, C., Saran, M., 1984, "Inhibition Of The Bleaching Of The Carotenoid Crocin. A Rapid Test For Quantifying Antioxidant Activity", *Biochimica Et Biophysica Acta*, 796, 312-319.
63. Benzie, I. F. F., Strain, J. J., 1996, Ferric Reducing Ability Of Plasma (Frap) As A Measure Of "Antioxidant Power"; Frap Assay, *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
64. Brand-Williams, W., Cavalier, M. E. And Berset, C., 1995. "Use Of Free Radical Method To Evaluate Antioxidant Activity". *Food Science And Technology* 28(1): 25-30.

65. Vinson, Zubik, L., Bose, P., Sammon, N. And Proch, J. 2005. "Dried Fruits: Excellent In Vitro And In Vivo Antioxidants". *Journal Of The American College Of Nutrition*, 24(1): 44-50.
66. Rao, G. R., Konjilal, G. And Mohan, K. R. 1978. "Extended Application Of Folin-Ciocalteu Reagent In The Determination Of Drugs". *The Analyst*, 103: 993-994.
67. Roura, E., Anders-Lacuera, C., Estruch, R. And Lamueala-Rasentos, R. M. 2006. "Total Polyphenol Intake Estimated By A Modified Folin-Ciocalteu Assay Of Urine". *Clinical Chemistry*, 52:749-752.
68. Mogalhaes, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., Lima, L. L. F. C. And Rangel, O. S. S. 2006. "Automatic Method For The Determination Of Folin-Ciocalteu Reducing Capacity In Food Products". *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 54(15):5241-5246.
69. Van Den Berg, R., Haenen, R. M. M., Van Den Berg, H. And Bast, A. 1999. "Applicability Of And Improved Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (Teac) Assay For Evaluation Of Antioxidant Capacity Measurement Of Mixtures". *Food Chemistry*, 66:511-517.
70. Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Çelik S. E., Bektaşoğlu B., Berker K. I., Özyurt, D. 2007. "Comparative Evaluation Of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied To Phenolic Compounds With The CUPRAC Assay". *Molecules*, 12: 1496-1547.
71. Tütem, E. And Apak, R. 1991. "Simultaneous Spectrophotometric Determination Of Cystine And Cysteine In Amino Acid Mixtures Using Cupper (II) – Neocuproine Reagent". *Analytica Chimica Acta*, 255: 121- 125.
72. Güçlü, K., Sözgen, K., Tütem, E., Özyürek, M. And Apak, R. 2005. "Spectrophotometric Determination Of Ascorbic Acid Using Copper (II)-Neocuproine Reagent In Beverages And Pharmaceuticals". *Talanta*, 65: 1226-1232.
73. Apak, R, Güçlü, K, Özyürek, M. And Kandemir, S. E. 2004. "A Novel Total Antioxidant Capacity Index For Dietary Polyphenols, Vitamin C And E Using Their Cupric Ion Reducing Capacity In The Presence Of Neocuproine: CUPRAC Method". *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 52: 7970-7981.

74. Albayrak S., Sağdıç O., Aksoy A. "Bitkisel Ürünlerin Ve Gıdaların Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler,"*Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2010, 26(4),401-409.
75. Akıllıoğlu H.G., Yalçın E. (2010) "Tahıl Protein Hidrolizatlarının Antioksidan Aktiviteleri ", *Gıda*, 35(3) 227-233.
76. Orman, S. Ve Bağdatlıoğlu, N. (2005) "Gıdalardaki Antioksidanlar Ve Sağlık Üzerine Etkileri". *Standart Dergisi*. 52-61.
77. Ardađ, A., (2008), "Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri Analitik Açıdan Karşılaştırılması,"*Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın, Türkiye* 15-24.
78. Ramarathnam, N., Osawa, T., Namıkı, M. And Kawakıshı, S., " Chemical Studies On Novel Rice Hull Antioxidants. 1. Isolation, Frctionation, And Partial Characterization ". *J. Agric.Food Cem.*, 1988; 36, 732-737.
79. Ak T., Curcumin " Antioksidan ve antiradikal Özelliklerinin İncelenmesi, *Yüksek Lisasn Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü, Erzurum*, 2006.
80. Özpınar A., "Kefir Ve Bozanın İn Vitro Antioksidan Aktivitelerinin Araştırılması", *Yüksek Lisans Tezi,Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul*, 2012.
81. Lı-Shui Chen, Ying Ma, Jean-Louis Maubois, Lı-Jun Chen, Qıao-Hong Liu and Jı-Ping Guo. 2009. " Identification of yeasts from raw milk and selection for some specific antioxidant properties". *International journal of dairy technology* 1471-0307.
82. Farvin, K.H.S., Baron, C.P., Nielsen, N.S., Jacobsen, C., 2010, " Antioxidant activity of yoghurt peptides: part 1- in vitro assays and evaluation in  $\omega$ -3 enriched milk". *Food Chermistry* 123:1081-1089.
83. Amirdivani, S., Baba, A.S., 2011, "Changes in yogurt fermentatıon characteristics and antioxidant potential and in vitro inhibition of angiotensin-I converting enzyme upon the inclusion of peppermint, dill and basil." *LWT-Food science and technology* 1-7.
84. Naing Naylin, OK Taing, Fumio Hashinaga, Yasushi Toshima., "Antioxidant activity of Sugar-Tolerant yeast zygosaccharomyces Rouxii," *Food biotechnology*. 200519:2, 107-120.

85. Wanasundara, U.N., Shahidi, F. 1998. "Antioxidant and pro- oxidant activity of green tea extracts in marine oils", *Food chermistry*, 63: 335-342.
86. Seyidođlu Nilay,(2015) "tavşanlarda *Spirulana Platensis* ve canlı maya kültürü *Saccharomyces cerevisiae*'nin bağışıklık sistemi ve büyüme performansı üzerine etkisi", *Uludađ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilimdalı, Doktora tezi*, Bursa.
87. Filhanto A., 2006, Antioxidative peptides derived from milk proteins. *Int Dairy J* 2006; 16: 1306-1314.
88. Taşkın B., 2011. Bazı fermente süt ürünlerinin antioksidan özelliklerinin araştırılması. *Celal Bayar Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisasn. Tezi.* Manisa
89. Periti P, Tonelli F. Preclinical and clinical pharmacology of biotherapeutic agents:*Saccharomyces boulardii*. *J Chemother*, 2001;13(5):473-93.

## ÖZGEÇMİŞ

Didem BAĞIŞLIYAN 1989 yılında Ankara'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Ankara'da tamamladı. 2010'da kazandığı Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2014 yılında mezun oldu. Aynı yıl Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalında Yüksek Lisansa başladı. 2017 yılında yüksek lisansını tamamlamıştır.

Adres: Emek mah.Gülvezir Sok. Hilal Apt. Kat.1 Daire 1- Nevşehir

Telefon: (0384) 212 16 14

e-posta: didembagisliyan@hotmail.com

