



Geliş(Received) :30/07/2018
Kabul(Accepted) :03/04/2019

Araştırma Makalesi/Research Article
Doi:10.30708mantar.449309

***Pleurotus ostreatus* alfa- ve beta- glukan polisakkaritlerinin izolasyonu ve biyoyumluluklarının yüzey kaplaması sonrasında incelenmesi**

Leyla KAYIŞ¹, Gökhan DURUKSU*²

*Sorumlu yazar: gokhan.duruksu@kocaeli.edu.tr

¹ Kocaeli Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre AD, İzmit, Kocaeli, TÜRKİYE

Orcid ID: 0000-0002-0119-3065/ leyla-kayis@hotmail.com

² Kocaeli Üniversitesi, Kök Hücre ve Gen Tedavileri AUM, İzmit, Kocaeli, TÜRKİYE

Orcid ID: 0000-0002-3830-2384/ gokhan.duruksu@kocaeli.edu.tr

Öz: Glukanlar mantarların hücre duvarında bulunan O-glikozidik bağlar ile bağlanmış glikoz monomerlerinin oluşturduğu polisakkaritlerdir. Glukanların birçok tıbbi uygulamalarının yanı sıra en öne çıkan özelliklerinden biri ise beta-1,3 ve -1,6 glikozidik bağlarıyla birleşmiş glikoz zincirinin oluşturduğu beta-glukanların bağışıklık sistemi üzerindeki uyarıcı etkisidir. Bu çalışmada *Pleurotus ostreatus* 'tan (istiridye mantarı) sıcak su ve sıcak kostik çözelti ile ekstraksiyonu sonrasında alfa- ve beta-glukan izolasyonu gerçekleştirilerek elde edilen polisakkaritlerin hücre canlılığı ve çoğalması üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Toplam glukan miktarları fenol-sülfürik asit metoduyla ve alfa/beta-glukan saflıkları enzimatik yöntemle analiz edilmiştir. Kültür kapları glukanla kaplandıktan sonra toksisite ve hücre çoğalma analizleriyle mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkileri incelenmiştir. İşlemler sonucunda %97.87 ±1.45 saflıkta alfa-glukan ve %97.79 ±0.28 saflıkta beta-glukan *P. ostreatus* 'tan elde edilmiştir. Hücre tutunma analizinde alfa-glukanların tutunmayı desteklediği (%88.10-95.75) gözlemlenmişken beta-glukan kaplı yüzeylerde tutunma oranının %61.26 ±8.04 değerine düştüğü belirlenmiştir. Alfa-glukan kaplı yüzey üzerindeki hücreler beta-glukan kaplı yüzey üzerindeki hücrelere göre 1.44 kat, kaplı olmayan yüzey üzerindeki hücrelere göre 1.56 kat daha hızlı çoğalmışlardır. Sonuç olarak sıcak su/kostik işlemleriyle elde edilen alfa- ve beta-glukanların hücreler üzerinde toksik etkisinin olmadığı ve her iki glukanın biyoyumlu bir malzeme olduğu in vitro testlerle gösterilmiştir. Ancak beta-glukan kaplı yüzeylerde hücre tutunması düşük olduğu gözlemlenmiştir. Alfa-glukanın hücre tutunmasını ve çoğalmasını desteklediği görülmüştür. Bu özellikleri ile hücre kültürü ve doku mühendisliği çalışmaları alfa-glukanın potansiyel uygulama alanlarının olabileceği ortaya konmuştur.

Anahtar kelimeler: Biyomalzeme, Mantar, Polisakkarit, Glukan, Yüzey Kaplama



Isolation of polysaccharides alpha- and beta-glucans of *Pleurotus ostreatus* and evaluation of their biocompatibility after surface coating

Abstract: Glucans, which are polysaccharides in the fungal cell wall, are formed by glucose monomers linked by O-glycosidic bonds. Besides of their medical applications, one of the most promising features of glucans is the stimulatory effect on the immune system of beta-glucans, in which glucose units are linked by beta-1,3 and -1,6 glycosidic bonds. In this study, it was aimed to investigate the effect of alpha- and beta-glucans on the cell viability and proliferation, which were derived from *Pleurotus ostreatus* by hot water/caustic extraction. Total glucan was quantified by the phenol-sulphuric acid method, and alpha/beta-glucan purity was determined by the enzymatic method. After coating the surface of culture flask with the glucans, their effects on mesenchymal stem cells were examined by toxicity and cell proliferation assays. Alpha- and beta-glucans from *P. ostreatus* were obtained with a purity of 97.87% \pm 1.45 and 97.79% \pm 0.28, respectively. In cell adhesion analysis, alpha-glucans were found to support the attachment (88.10-95.75%), while the adhesion ratio on beta-glucan-coated surfaces decreased to 61.26% \pm 8.04. The cells on alpha-glucan-coated surfaces were proliferated 1.44 times faster than those on beta-glucan, and 1.56 times faster than those on the uncoated surface. As a result, alpha- and beta-glucan, obtained by hot water/caustic extraction processes, have been shown to have no toxic effects on the cells, and both glucans were demonstrated to be biocompatible biomaterials by in vitro tests. However, the cell adhesion on beta-glucan coated surfaces was observed to be low. Alpha-glucan was shown to promote both cell adhesion and proliferation. Therefore, alpha-glucan may have potential applications in cell culture and tissue engineering studies.

Key words: Biomaterials, Fungi, Polysaccharides, Glucan, Surface Coating

Giriş

Pleurotus cinsi mantarların 200'den fazla türü Index Fungorum'da tanımlanmış olup bitkisel artık ve çürümüş ağaç gövdelerinde yetişmektedir (Correa ve ark. 2016). Bu türler arasında en çok bilineni ve insanlar tarafından en yaygın kültürü yapılanı istiridye mantarı olarak da bilinen *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. (phylum Basidiomycota) olup çok eski zamanlardan beri bu türün tıbbi özelliklerinden faydalanılmaktadır (Piska ve ark., 2017; Doğan ve ark., 2014). *P. ostreatus* ile ilgili hücre kültürü ve canlı hayvan çalışmaları sonucunda bu mantarın kanser önlemeden, kolesterol düşürmeye kadar birçok hastalığın tedavisine etkin rol oynayabileceği gösterilmiş ve bu medikal etkilerinde glukanların önemli bir rol oynayabileceği bildirilmiştir (Deepalakshmi ve Mirunalini, 2014).

Mantarlardan elde edilen beta-glukanlar günümüzde çoğunlukla ilaç üretiminde ve gıda sanayisinde kullanılmalarına rağmen gösterdikleri farklı özellikler göz önüne alındığında sağlık ve biyomalzeme alanlarında potansiyel uygulamaları mevcuttur (El Enshasy ve Hatti-Kaul, 2013; Papaspyridi ve ark. 2018). Önceki çalışmalarda nutrasötik olarak kullanılan beta-glukanların anti-oksidant, anti-kanser, anti-enflamatuar, anti-mikrobiyel özelliklerinin gösterilmesinin yanı sıra kalp ve damar hastalıklarını önlediği ve karaciğeri koruduğu da ortaya konmuştur (Chen ve Seviour, 2007;

Wasser, 2010; Higashi ve ark., 2012; Du ve ark., 2015). *P. ostreatus* kaynaklı beta-glukan olan pleuranın kullanılmasıyla humoral ve hücresele immünitenin kontrol altına alınabileceği ve çocuklarda ölümle sonuçlanan solunum yolu enfeksiyonlarının azaltılabileceği gösterilmiştir (Jesenak ve ark., 2013). Kozmetik sektöründe yaygın olarak yaşlanma karşıtı (anti-aging) etkilerinden dolayı kullanılmaktadırlar (Hyde ve ark., 2010). Beta-glukanların immünmodulasyon, anti-inflamatuar ve anti-tümör etkileri tanımlanmış olmasına karşın alfa-glukanlar üzerine olan çalışmalar sınırlıdır (İşsever ve ark., 2018). *Pleurotus albidus* 'tan izole edilen α -1,6- and β -1,3-D-glukanların makrofajları modüle ettikleri ve böylece lipid kaynaklı inflamasyonun önlenebileceği bildirilmiştir (Castro-Alves ve Nascimento, 2018).

Doku mühendisliğiyle üretilebilecek canlı doku ve organlar günümüzde çözümü zor ya da mümkün olmayan sağlık sorunlarının düzeltilmesinde büyük potansiyele sahiptirler. Ancak bu alanda kullanılacak malzeme ve bunların işlenmesinde bir takım zorluklarla karşılaşmaktadır. Metal ya da seramik gibi abiyotik malzemelerin olumsuzluklarına karşın biyolojik kökenli biyomalzemeler nakil sonrasında dokular içerisinde daha iyi uyum göstermektedirler (Fontana ve ark., 2017). Her biyolojik malzeme bu uyumu sağlamadığından mutlaka gerekli analizlerinin yapılması gerekmektedir (Jantova ve



ark., 2015; Mukhopadhyay ve ark., 2017). İnsan ya da hayvan kökenli biyomalzemelerin kullanımı taşıyabilecekleri potansiyel kontaminantlardan dolayı tercih edilmemektedir. Daha çok bitki kaynaklı biyomalzemeler kullanılsa da mantar kaynaklı olanlar da tercih edilmektedirler (Nwe ve ark., 2008; 2011; Fontana ve ark., 2017). *P. ostreatus* kaynaklı beta-glukan (pleuran) başka bir malzemeye (coladerm) karıştırılmış ve üretilen bu membranın fibroblast hücreleriyle yara iyileştirilmesinde kullanılabileceği gösterilmiştir (Jantova ve ark., 2015).

Bu çalışmada *P. ostreatus* kullanılarak sıcak su ve sıcak kostik çözelti ardışık yıkama işlemleri sonrasında alfa- ve beta-glukanların izolasyonlarının gerçekleştirilmesi ve bu fungal polisakkaritlerin kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerinde hücre canlılığı ve çoğalmasına olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmayla *P. ostreatus* 'tan izole edilen alfa- ve beta-glukanların kök hücre kültüründe toksik etki yaratmadan güvenle kullanılabileceği ve doku mühendisliği çalışmalarında kaplama materyali olarak yararlanılabilecek biyomateryaller olduğu hipotez edilmiştir.

Materyal ve Metot

Alfa- ve beta-glukan izolasyonu

Alfa- ve beta-glukan izolasyonu için lokal marketlerden *P. ostreatus* temin edilerek Palacios ve ark. (2012) tarafından oluşturulan glukan izolasyon yöntemi kullanılmıştır. İzolasyon için paketlenmiş ve ticari olarak satılan beş farklı *P. ostreatus* örneği (n=5) kullanılmıştır. Bu protokole göre distile su ile yıkandıktan sonra mantarlar küçük parçalara ayrılmış ve 40°C'de kurutularak içerdiği su mantardan uzaklaştırılmıştır. Katı parçalar öğütülerek saf metanol (1:10) içerisinde 60°C'de, 100 rpm hızda 24 saat çalkalanmıştır. Katı parçalar süzildükten sonra distile suyla (20-25°C) 1:5 oranında karıştırılarak 100 rpm hızda 24 saat inkübe edilmiştir. Karışım oda sıcaklığında 3800g hızda 20 dakika santrifüj edilerek (Eppendorf R5801, Mannheim, Almanya) çözünmeyen parçalar çöktürülmüştür. Katı parçalar toplanarak 1:10 oranında sıcak distile su ile karıştırılarak 95°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Karışım 6000g'de 5 dakika boyunca santrifüj sonrası alfa-glukan içeren sıvı kısım ayrı kaba aktarılmıştır. Katı kısım alınarak 1:10 oranında 2M NaOH (Merck, Darmstadt, Almanya) ile 95°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Karışım 3800g'de 20 dakika boyunca santrifüj edilerek beta-glukan içeren sıvı ayrılmıştır.

Alfa- ve beta-glukan içeren sıvılar santrifüj işlemi sonrasında 40 µm'lik naylon filtreye süzülerek tekrar 6000g'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Sıvı kısım alınarak

2:1 oranında etanol ile karıştırılmış ve polisakkaritlerin çökmesi için ekstraksiyon sıvıları 4°C'de gece boyu bekletilmiştir. Çöken katı maddeler 8000g'de 30 dakika santrifüj edilerek toplanmış ve %20 trikarboksilik asit (TCA; Merck) içeren 10 mL distile su içerisinde çözdürülmüştür. 24 saat inkübasyon ve 8000g'de 30 dakika santrifüj sonrasında çöken proteinler uzaklaştırılmıştır. Sıvı kısım son konsantrasyonu %1 olacak şekilde NaCl (Merck) çözeltisi eklenmiş ve 2:1 oranında etanol ilave edilerek 4°C'da polisakkaritler çöktürülmüştür. Çöken glukanlar 8000g'de 30 dakika santrifüj işlemi sonrasında toplanmış ve eklenen 5 mL saf asetonun (Merck) oda sıcaklığında uçması ile kuru bir ekstrakt elde edilmiştir.

Alfa-glukan içeriğindeki safsızlığın yüksek olmasından dolayı örnek tekrar 1:10 oranında sıcak distile su ile karıştırılarak 95°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiş ve alfa-glukan saflaştırma prosedürü tekrar edilmiştir. Alfa-glukan ve beta-glukan izolasyonu sonuçları 5 ayrı örnek (parti) için ortalama değer alınarak standart sapma hesaplanarak sunulmuştur.

Fenol-sülfürik asit metodu

Toplam polisakkarit miktarını ölçmek için polimerik yapılar sıcak sülfürik asit içerisinde monomerlerine ayrıştırılarak fenol ile reaksiyona sokulmuştur (DuBois ve ark., 1956). Analiz edilecek örneğe 0.05 mL %80'lik fenol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya) çözeltisi ve 5mL sülfürik asit (Merck) eklenerek 25-30°C su banyosunda 10-20 dakika su banyosunda bekletilmiştir. Örnekten 200 µL alınarak spektrofotometre (VersaMax microplaka okuyucu, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, ABD) kullanılarak 480 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçülmüştür. Her örnek için analiz beş kez tekrar edilmiştir. Kantitatif veri için glukoz standart eğrisi hazırlanmıştır. Distile su içerisinde çözülmüş glukoz (0.02-0.1 mg/mL) çözeltisi yöntemin aynı basamakları kullanılarak fenol ile reaksiyona sokulmuş ve renk değişimi sonrası optik yoğunluk ölçülmüştür. Analiz sonrasında hesaplanan polisakkarit ve toplam glukan miktarları içinde çözüldüğü sıvının hacmiyle çarpılarak kütlesi hesaplanmıştır.

Alfa- ve beta-glukan miktarının belirlenmesi

Ekstraksiyon işleminden önce kurutulmuş mantar örneklerinde ve ekstraksiyon sonrasında her fraksiyonda glukan miktarlarının ölçümü için β-Glucan Yeast & Mushroom Assay Kit (K-YBGL, Megazyme, Belfast, İrlanda) kullanılmıştır (Sari ve ark., 2017). Test üretici firmanın belirtmiş olduğu protokol uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Kit sıvı örneklerde çözünür toplam



glukan ve beta-glukan miktarlarını ayrı deney aşamalarında enzim reaksiyonuna göre farklı glikozidik bağların kesimi ve ortaya çıkan monomerlerin miktarının ölçülmesi esasıyla çalışmaktadır. Polisakkaride özgün enzimlerin reaksiyonu sonucunda renk değişimi spektrofotometre kullanılarak 560 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçülmesiyle glikoz standartına karşı hesaplanmıştır. Toplam glukan tayini için ekzo-1,3-β-glukanaz ve β-glukosidaz ve alfa glukan için amiloglukosidaz ve alfa-amilaz kullanılmıştır. Glukan kitinin üretici firma (Megazyme) tarafından sağlanan kullanım kılavuzunda yer alan hesaplama yöntemiyle toplam glukan, alfa-glukan ve beta-glukan miktarları analiz başlangıcındaki toplam madde miktarına göre kütle oranı (w/w) hesaplanmıştır. Toplam glukan ve alfa-glukan miktarları arasındaki fark alınarak beta-glukan miktarı belirlenmiştir.

İzolasyon veriminin ve saflık değerlerinin hesaplanması

İzolasyon veriminin belirlenebilmesi için ilgili izolasyon sonrasında elde edilen alfa-glukan ya da beta-glukan miktarı ekstraksiyon öncesinde kuru mantar kütleindeki alfa- ya da beta-glukan miktarına oranlanmasıyla bulunmuştur (Temelli, 1997; Symons ve Brennan, 2004). Alfa- ve beta-glukan miktarları kit (Megazyme) kullanılarak ölçülmüştür. Verim hesabı için aşağıdaki formüller kullanılmıştır:

$$\text{Verim}_{\text{alfa-glukan}} (\%) = \frac{[\text{alfa-glukan miktarı}]_{\text{ekstraksiyon sonrası}}}{[\text{alfa-glukan miktarı}]_{\text{kuru mantar}}} \times 100$$

$$\text{Verim}_{\text{beta-glukan}} (\%) = \frac{[\text{beta-glukan miktarı}]_{\text{ekstraksiyon sonrası}}}{[\text{beta-glukan miktarı}]_{\text{kuru mantar}}} \times 100$$

Saflık derecesi aseton ile kurutulan örneğin tekrar çözülmesinden sonra belirlenmiştir. Bu aşamada analizde kullanılan toplam polisakkarit miktarı fenol-sülfirik asit yöntemiyle tekrar ölçülmüş ve bu polisakkarit karışımı içerisinde ne kadar alfa- ve beta-glukan bulunduğu kit (Megazyme) kullanılarak ölçülmüştür. Saflık değerlerinin hesaplanabilmesi için aşağıdaki formüller kullanılmıştır:

$$\text{Saflık}_{\text{alfa-glukan}} (\%, w/w) = \frac{[\text{ekstraksiyon sonrası alfa-glukan miktarı}, (w/w)]}{[\text{toplam polisakkarit miktarı}]} \times 100$$

$$\text{Saflık}_{\text{beta-glukan}} (\%, w/w) = \frac{[\text{ekstraksiyon sonrası beta-glukan miktarı}, (w/w)]}{[\text{toplam polisakkarit miktarı}]} \times 100$$

Kaplanan yüzeylerdeki glukan miktarının ölçümü ve kaplama süresinin optimizasyonu

Alfa-glukan %3'lük asetik asit (1:1; Merck) içinde, beta-glukan %3'lük asetik asit (1:1) ve DMSO (20:1; Sigma-Aldrich) içinde çözülerek 100 µg/mL olacak miktarda seyreltilmiştir. Polistren malzemesinden üretilmiş hücre kültürü kabını (SPL Life Sciences, Pocheon-si, Güney Kore) kaplamak için 0.16 mL/cm² sıvı eklenmiş ve inkübatörde 37°C'de farklı sürelerde bekletilerek kaplama gerçekleştirilmiştir. Kaplama süresinin optimizasyonu için literatürde tercih edilen kaplama süreleri dikkate alınarak 1 saat, 8 saat, 16 saat, 24 saat, 48 saat ve uzun sürenin etkisinin gözlemlenmesi için 72 saat inkübasyonlar tercih edilmiştir. Negatif kontrol olarak kaplanmamış yüzey kullanılmıştır. Hücre kültürü öncesinde kültür kapları DPBS (Gibco, Paisley, İngiltere) ile 2 kez yıkanmıştır. Yüzeyi kaplayan glukanın miktar tayini için fenol-sülfirik asit metodu kullanılmıştır.

Hücre kültürü ve canlılık, çoğalma ve hücre adezyonu

Çalışma için KÜ-GOKAEK 2016/20.3 no.lu etik kurul onayı alınmış ve çalışmada KÖGEM hücre arşivinden insan kemik iliği kök hücreleri kullanılmıştır (Erdem ve ark., 2013). Hücreler DMEM-F12 besiyeri (%10 FBS, %1 Antibiyotik) içerisinde 37°C, %5 CO₂ kontrollü atmosfer ortamında kültüre edilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları sırasında kullanılan tüm sarf malzemeler Thermo/Gibco'dan (Paisley, İngiltere) alınmıştır. Yüzeyi kaplanmamış kültür kabının kullanıldığı grup kontrol olarak çalışmada yer almıştır. Hücre canlılığı, çoğalması ve tutunması çalışmalarında literatürle karşılaştırma yapabilmek için kolajen kaplı yüzeyler kullanılmıştır. Yüzeylerin kolajen tip 1 (C3867, Sigma-Aldrich) ile kaplanması için stok solüsyon PBS ile sulandırılarak 100 µg/mL çözelti elde edilmiştir. Kaplamak için 0.16 mL/cm² sıvı kültür kabına eklenmiş ve inkübatörde 37°C'de 1 saat bekletilerek kaplama gerçekleştirilmiştir.

Hücre canlılığı için WST-1 (Roche) analizi kullanılmıştır. Test üretici firmanın talimatları doğrultusunda önce hücreler DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, Gibco) ile yıkanmış ve her bir kuyucuğa 100 µL WST-1/DMEM-F12 solüsyonu (%10, v/v) eklenmiştir. 37°C %5 CO₂ inkübatörde 1 saat inkübe edilmiş ve spektrofotometrede 480 nm'de ölçüm yapılarak canlı hücrelerin sayısı belirlenmiştir. Hücre çoğalma analizi için 96 saat süre içerisinde hücre sayılarındaki artış WST-1 ile belirlenmiştir.

Hücre tutunma (adezyon) analizi için hücreler aynı koşullar altında 48 saat boyunca kültüre edilmiş ve sonra



iki kez DPBS ile yıkanarak yıkanma sonrası yüzeyde asılı kalan hücreler WST-1 yöntemiyle sayılmıştır (Duruksu ve Aciksari, 2018).

LDH toksisite testi

Glukanların hücre üzerindeki toksik etkisinin ölçülmesinde LDH Cytotoxicity Detection Kit Plus (Roche, Mannheim, Almanya) kullanılmıştır. Kit sıvı besiyeri ortamında laktat dehidrogenaz enzim aktivitesinin ölçülmesi temeline dayanmaktadır. 48 saat kültür sonrasında kültür ortamından 300 µL örnek alınarak substrat çözeltisiyle karıştırılmış ve karışım 30 dakika 37°C inkübe edildikten sonra spektrofotometrede 490 nm'de ölçüm yapılarak toksisite oranı belirlenmiştir. Kaplanmamış yüzey üzerinde kültür edilen hücreler negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanmak ve %100 toksisite optik soğurma değerini belirlemek için kit ile birlikte gelen lizis solüsyonu ile hücre membranı tamamen sindirilmiştir. Açığa çıkan LDH enzim aktivitesi aynı yöntemle belirlenmiştir. Ölçümler en az beş kez tekrar edilmiştir.

İstatistiksel analiz

Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir. Çoklu gruplar, çift yönlü varyans analizi ve ardından post-hoc karşılaştırmalar için Student-Newman-Keuls metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her deney eğer belirtilmediyse en az üç kez tekrar edilmiş ve deney ve kontrol grupları arasındaki fark $p < 0.05$ olduğunda anlamlı olarak değerlendirilmiştir. Sonuçların istatistiksel analizleri için SPSS10.0 (SPSS, Chicago, ABD) programı kullanılmıştır.

Bulgular

Alfa- ve beta-glukan izolasyonu ve saflık oranı

Sıcak su ekstraksiyonu sonucunda alfa-glukan ve sıcak kostik çözeltisi ekstraksiyonundan sonra beta-glukan polisakkaritleri elde edilmiştir. İzolasyon beş farklı parti halinde tekrarlanmış olup sırasıyla 34 g, 31 g, 30 g, 30 g ve 35 g kuru mantar kütlesi kullanılmıştır. Elde edilen toplam glukan miktarı her parti başına ortalama başlangıç miktarının $\%2.66 \pm 0.19$ 'ü seviyesinde olup parti başına ortalama 55.25 mg ± 8.50 alfa-glukan (n=4) ve 789.91 mg ± 33.71 beta-glukan (n=5) elde edilmiştir. İlk sıcak su ekstraksiyonu sonrasında elde edilen örneğin alfa-glukan miktarının bu örnekteki toplam polisakkarit miktarına oranlanmasıyla alfa-glukanın $\%68.29 \pm 28.30$ saflıkta olduğu hesaplanmıştır. Bu örnekte beta-glukan miktarının ölçülmesiyle alfa-glukan ekstraksiyonu sonrasında örneğe yüksek oranda beta-glukanın ($\%31.71 \pm 28.30$) karıştığı belirlenmiştir. Alfa-

glukan için aynı işlem basamakları tekrar edilerek daha saf örnek $\%97.87 \pm 1.45$ olan alfa-glukan elde edilmiştir. Her iki saflıktaki alfa-glukan örnekleri saklanarak sonraki deney aşamalarında kullanılmıştır.

Beta-glukanın saflaştırılmasında tek bir ekstraksiyon basamağı kullanılmış olup işlem sonrasında beta-glukanın saflık oranı $\%97.79 \pm 0.28$ olarak bulunmuştur (Tablo 1).

Kaplanan kültür yüzeylerindeki glukan miktarı

Alfa- ve beta-glukanlar ayrı polistren yüzeylerin kaplanması kullanılmış olup optimum kaplama süresinin yaklaşık 24 saat olduğu bulunmuştur. 24 saatten kısa sürelerde alfa- ve beta-glukan kaplamalarının belirgin olarak daha az miktarda gerçekleşirken 48. saatten sonra kaplanan beta-glukan miktarının azaldığı görülmüştür. 24 saat sonunda kaplanan alfa-glukan miktarı $32.55 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm 5.83$ ve beta-glukan miktarı $32.33 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm 3.85$ olarak ölçülmüştür. Alfa- ve beta-glukan kaplama oranları arasında belirgin bir farkın olmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$).

Hücre toksisitesi

Hücrelerin alfa- ve beta-glukan kaplı yüzeyler üzerinde kültürü sonrasında hücre morfolojilerinde belirgin bir farklılık gözlemlenmemiştir (Şekil 1 A-E). Sağlıklı mezenkimal kök hücrelerde gözlemlenen fibroblasta benzeyen hücre morfolojisine sahip tek çekirdekli hücrelerin kültür kabını kapladığı gözlemlenmiştir. 48 saat sonunda gerçekleştirilen toksisite analizi sonucunda toksik oranların %1'in altında ölçülerek alfa- ve beta-glukanların yol açtığı bir toksisitenin olmadığı belirlenmiştir (Şekil 1 F; Tablo 1).

Hücre tutunması (adezyonu)

Hücre tutunması (adezyonu) ölçüldüğünde alfa-glukan ($\%97.87$ saflıkta) kaplı yüzeylerde tutunma kontrole göre $\%95.75 \pm 6.70$ oranında olduğu hesaplanmıştır. Saflık oranı $\%68.29$ olan alfa-glukan kullanıldığında hücre tutunması $\%88.10 \pm 2.04$ oranına kadar indiği görülmüştür (Şekil 2). Alfa-glukanın içindeki beta-glukan kirliliğinin artmasıyla hücre tutunmasının düştüğü gözlemlenmiştir. Beta-glukan kaplı yüzeylerde ise hücre tutunmasının ciddi oranda azaldığı ve $\%97.79$ saflığa sahip beta-glukan üzerinde kültüre edilen hücrelerin kaplanmamış yüzey (kontrol) üzerindeki göre $\%61.26 \pm 8.04$ oranında olduğu ölçülmüştür. Kolajen kaplı yüzey üzerinde hücrelerin tutunması kontrole göre $\%107.34 \pm 3.14$ olup alfa-glukan ve beta-

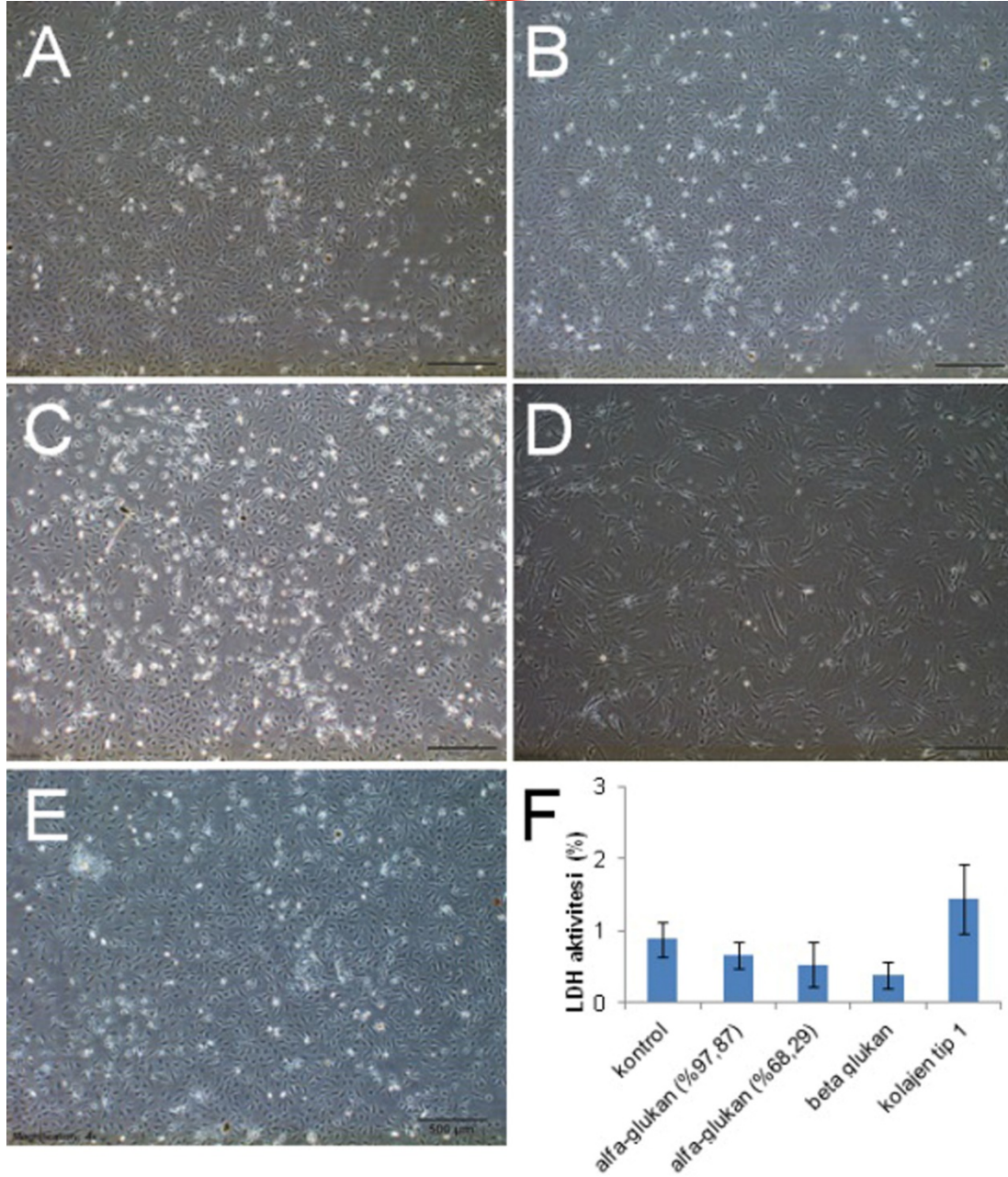


glukan gruplarıyla karşılaştırıldığında hücreler kolajen kaplı yüzeye daha yüksek oranda tutunmuştur ($p < 0.05$).

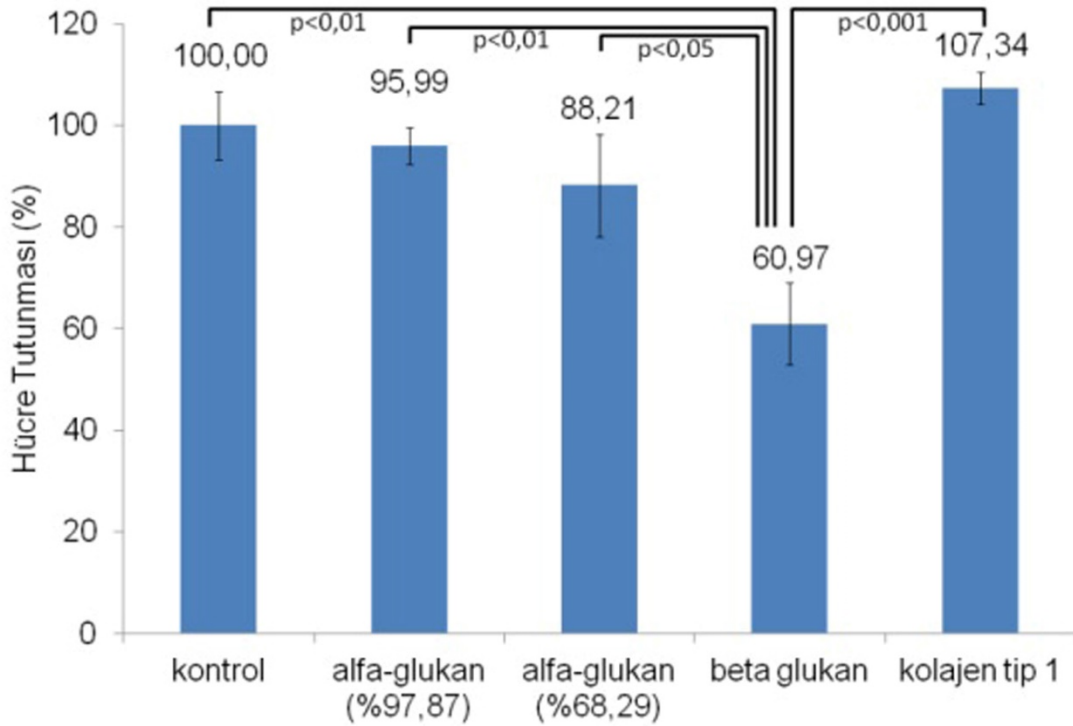
Tablo 1. *P. ostreatus*'tan alfa- ve beta-glukan ekstraksiyonu sonrası ürün özellikleri ve hücreler üzerindeki etkileri

	Alfa-glukan (1× Saflaştırma)	Alfa-glukan* (2× Saflaştırma)	Beta-glukan	Kolajen Tip 1
Saflık	%68.29 ±28.30	%97.87 ±1.45	%97.79 ±0.28	>%99
Verim	%0.06		%2.37	
Yüzeye tutunurluk (polistiren)	32.55 µg/cm ² ±5.83	32.55 µg/cm ² ±5.83	32.33 µg/cm ² ±3.85	
Hücre Adezyonu (Kontrol yüzeye göre)	%88.10 ±2.04	%95.75 ±6.70	%61.26 ±8.04	%107.34 ±3.15
Hücre Toksisitesi (LDH) (Kaplı yüzey üzerinde)	<%1	<%1	<%1	<%2
Hücre Çoğalması (Başlangıçtaki hücre sayısına göre)	10.97 kat	12.35 kat	8.56 kat	12.86 kat
Hücre Çoğalması (96. saatin sonunda Kontrolle göre)	1.39 kat	1.56 kat	1.08 kat	1.62 kat

* Alfa-glukanın ilk izolasyonu sonrası beta-glukan ile kirliliğin fazla olması nedeniyle ikinci kez ekstraksiyon yenilenmiştir.



Şekil 1. Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin farklı glukanlarla kaplı yüzeyler üzerinde 96 saat kültürü sonrası ışık mikroskobu altındaki görüntüleri (A-E) ve toksisite (LDH) analizi (F). Alfa-glukan (%97.87 saflıkta, A), alfa-glukan (%68.29 saflıkta, B), beta-glukan (C), kolajen tip-1 (D) kaplı ve kaplı olmayan (kontrol, E) yüzeyler. Ölçek çubuğu: 500 µm.



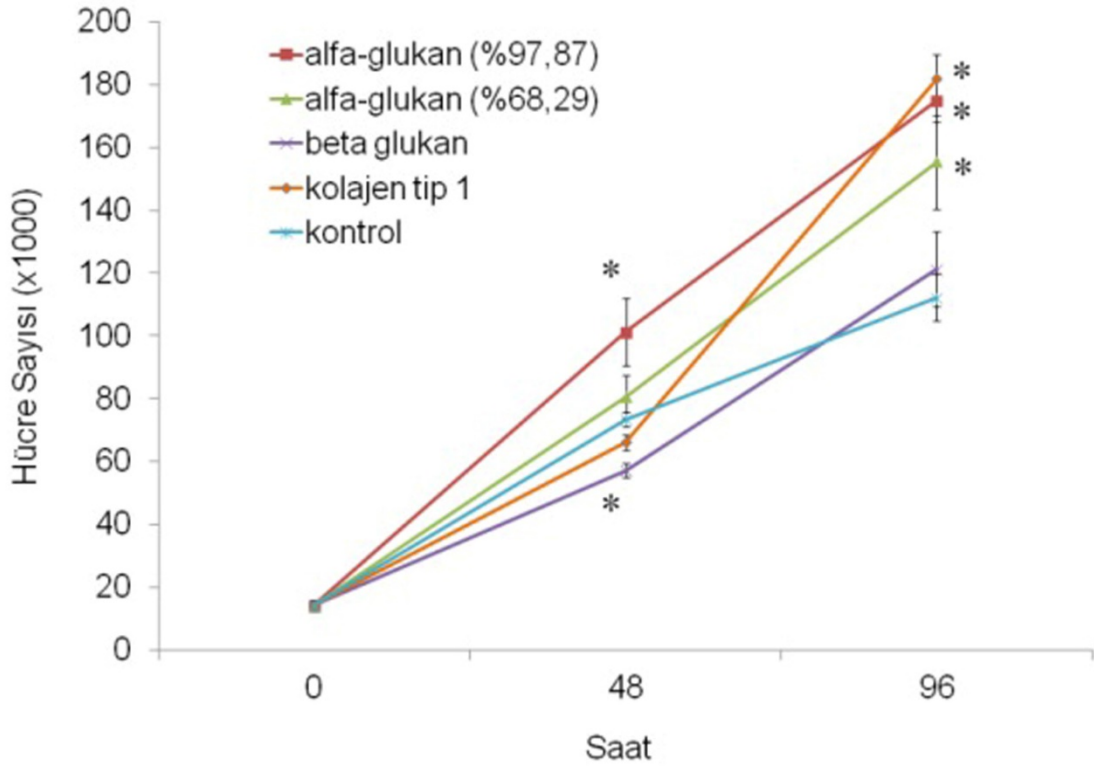
Şekil 2. Hücre tutunma (adezyon) deneyi sonrasında 48 saat sonra yüzey üzerinde asılı kalan hücrelerin kontrole göre oranları

Hücre çoğalması ve sitotoksinite

96 saat boyunca kültüre edilen hücreler alfa-glukan üzerinde en yüksek çoğalma hızı göstermişlerdir. Saflık derecesi %97,87 olan alfa-glukan üzerinde 96 saat içerisinde sayıları 12,35 kat artarken saflık oranı %68,29 olan alfa-glukan üzerinde hücre sayısı 10,97 kat artmıştır (Şekil 3). Kontrol grubu hücreleri bu süre içerisinde 7,92 kat artışı gerçekleştirerek alfa-glukanlar üzerinde kültüre edilen hücrelerin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermiştir ($p<0,05$). Beta-glukan üzerinde kültüre edilen hücreler 96 saat sonra sayılarını 8,56 kat artmış olup bu artışın kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Beta-glukan üzerinde kültüre edilen hücrelerde 48 saat sonra kontrole göre daha düşük bir çoğalma gözlemlenmiş olup bu verinin yüzeye tutunabilen daha düşük hücre sayısı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ancak 96 saat sonunda beta-glukan kaplı yüzey üzerindeki hücre sayısının kaplanmamış (kontrol) yüzeyine yakın bir seviyeye ulaştığı gözlemlenmiştir. Yüzeylerin hücre çoğalması üzerine

etkileri incelendiğinde 96 saatin sonunda beta-glukan kaplı yüzey ve kaplanmamış yüzey arasında istatistiksel olarak belirgin bir farkın olmadığı görülmüştür. Alfa-glukan kaplı yüzeylerin hücre çoğalmasını desteklediği ve alfa-glukan saflığı arttıkça mezenkimal kök hücrelerin daha hızlı çoğaldıkları belirlenmiştir (Şekil 3). Kolajen kaplı yüzey üzerinde hücreler 96 saat sonrasında sayıları başlangıca göre 12,86 kat artmış ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede fark göstermesine karşın yüksek saflıktaki alfa-glukan grubuyla karşılaştırıldığında hücre çoğalmaları arasında istatistiksel olarak belirgin bir fark bulunamamıştır.

LDH analizi sonucunda yüzey kaplamasında kullanılan malzemelerin hücre toksisitesi (sitotoksinite) üzerine bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Alfa- ve beta-glukanın, hücre membranının bütünlüğüne olumsuz bir etkisinin olmadığı enzim aktivitesiyle belirlenmiştir. Kolajen kaplı yüzeyin toksisite değeri %2 değerinin altında çıkmış olması gene toksik etkinin olmadığını göstermektedir (Tablo 1).



Şekil 3. Alfa- ve beta-glukan kaplı yüzeyler üzerinde 96 saat boyunca kültüre edilen hücrelerin çoğalma hızları.

Tartışma

P. ostreatus 'tan alfa- ve beta-glukan ekstraksiyonları sonunda alfa-glukan ekstraksiyon verimi başlangıç kuru mantar kütlelerine göre %0.06 oranında ve beta-glukan ekstraksiyon verimi %2.37 oranında gerçekleşmiştir. Farklı mantar türlerinde ölçülmüş beta-glukan miktarı değişkenlik göstermektedir: *Pleurotus* cinsine ait çözünebilir beta-glukan içeriği %0.6 iken Shiitake mantarında (*Lentinus edodes*) bu oran kuru ağırlığın %1.5'i olarak bildirilmiştir (Otakar ve ark., 2009). Yüksek miktarda beta-glukan içeren *Sparassis crispa*'nın kuru kütlelerinin %40'ının çözünür beta-glukandan oluştuğu ölçülmüştür (Kimura, 2013). *P. ostreatus* and *P. eryngii* mantarlarında gerçekleştirilen bir çalışmada toplam glukan miktarları sırasıyla %3.02 ± 31.2 ve %48.27 ± 2.35 olarak bulunmuştur (Vetvicka ve ark., 2019). İlgili çalışmada alfa- ve beta-glukan miktarları *P. ostreatus* için sırasıyla %3.93 ± 0.87 ve %2.72 ± 27.27 oranında ve *P. eryngii* için ise sırasıyla %4.57 ± 0.07 ve %43.70 ± 0.89 oldukları gösterilmiştir. Bu çalışmada ulaşılan beta-glukan ekstraksiyon verimi (%2.37) ilgili yayında belirtilen değere (%2.72) yakın çıkmıştır. Ancak alfa-glukan miktarları arasındaki fark yüksek olup bu yüksek fark ilgili çalışmada soğuk su ekstraksiyonu yapılmadan doğrudan sıcak su ekstraksiyonu ile hem

alfa-glukan hem de alfa-galaktan miktarları beraber hesaplanmış olmasıyla açıklanabilir.

Bu çalışmada kullanılan benzer bir yöntemi kullanmış, Palacios ve ark.'nın (2012) çalışmasında alfa ve beta glukan ekstraksiyon verimleri kuru ağırlığa göre %1.5 ve %4.5 olarak gerçekleştiği bildirilmiştir. Bir diğer çalışmada ise ekstraksiyon verimleri alfa-glukan için %1.39 verimle yakın bir değer bulunmuş olsa da %14.18 beta-glukan ekstraksiyon verimiyle çok daha yüksek değer bildirilmiştir (Khan ve ark., 2017). Sıcak su ve alkali çözeltinin kullanıldığı başka bir çalışmada yulaftan elde edilen beta-glukanın ekstraksiyon verimi %5'in altında çıkarken protein, selüloz ve diğer hemiselülozları hedef alan enzimatik işleme ekstraksiyon verimi %5'in üstüne çıktığı ve beta-glukanın geri kazanımının ise %82.1-86.6 aralığında olduğu bildirilmiştir (Ahmad ve ark., 2010). Enzim kullanılmadığında bu geri kazanım yulafta %60-76 oranında olduğu ve geri kazanımının alkali işlemlerde düşük çıktığı belirtilmiştir (Dawkins ve Nnanna, 1993; Ahmad ve ark., 2009). Yapılan çalışmada ise elde edilen ekstraksiyon verimi literatürdeki değerlerin çok altında çıkmış olup ticari ölçüde glukan üretimi için metot optimizasyonunu gerektirdiğini göstermektedir. Metilotrofik bir maya olan *Pichia pastoris* 'ten temelde sıcak su ekstraksiyonu ve ultrasonikasyon tekniklerini kullanarak çok basamaklı bir saflaştırma yöntemi



kullanılmış ve saflaştırma sonrasında %11.7 verimlilikle toplam gluklan eldesi gerçekleştirirken elde edilen ürünün saflığı %85.3 oranında olduğu belirtilmiştir (Xing ve ark., 2018). Verimin bu kadar yüksek çıkmasının sebeplerinden bir tek hücreli süspanse bir kültürden ekstraksiyonu gerçekleştirmeleri olabilir. Ayrıca bir sebep de tercih ettikleri yöntemde kullandıkları ultrasonikatör (20 kHz ve 10 s) ile daha küçük parçaların elde edilebilmesi ve ekstraksiyon verimini artırabilmesidir. Ancak bu yöntemin orta ve büyük ölçekte kullanımı sınırlı olacaktır. Ultrasonikasyonun dışında yüksek basınç homojenizasyon yöntemini de kullanıldığı ve yüksek verim alındığı (verim %11.18 ve saflık %93,12) belirtilmişse de özellikle 1,6-D-beta-glukanların yapısının bozulduğu belirtilmiştir (Sandula ve ark., 1999; Liu ve ark., 2008). Daha küçük parçaların elde edilmesiyle daha yüksek ekstraksiyon verimlilik değerlerinin eldesi ilgili çalışmalarda mümkün olmuştur. Çalışmamızdaki tek basamaklı ekstraksiyon yönteminde elde edilen beta-glukanların verimi düşük olmasına karşın saflığı literatürde belirtilen bir diğer beta-glukan ekstraktına göre daha yüksektir. Satitmanwiwat ve ark.'nın (2012) çalışmasında HPLC saflaştırması sonrasında *Pleurotus sajor-caju* beta-glukan saflığı %90.2 olduğu bulunmuştur. *Agaricus blazei* Murill'in su ile ekstraksiyonu sonrasında alfa-glukan DEAE-Sepharose ve Sephacryl S-500 kolonlarıyla saflaştırılmış ve %96 saflıkta ürün elde edilmiştir (Zhang ve ark., 2018). Ancak çoğu çalışmada elde edilen alfa- ve beta-glukanların saflıkları incelenmemiş ya da bildirilmemiş olduğundan karşılaştırılması mümkün olmamıştır. Buna karşın ticari birçok beta-glukan saflığı >%95 olduğu belirtilmiştir. Arpadan elde edilmiş beta-glukanın (Sigma, Cat. No. G6513) HPLC saflaştırması sonrasındaki saflığının %95 olduğu bildirilmiştir. *Saccharomyces cerevisiae* 'dan gluklan izolasyonunda asetik asit, kostik ve sıcak su ekstraksiyon sisteminin kullanıldığı çalışmada elde edilen gluklanın %8.4 verimlilikte ve %55 saflıkta (Thammakiti ve ark., 2004), asetik asit ve %3 H₂O₂ ekstraksiyonunun kullanıldığı sistemde %80.5 saflıkta (Hunter ve ark., 2002) ve sodyum hipoklorat ve DMSO'nun kullanıldığı sistemde verimin %3.7 (Ohno ve ark., 2001) olduğu belirtilmiştir.

Kit ile birlikte temin edilen enzimlerin kullanılmasıyla alfa- ve beta-glukan ekstraktlarının diğer gluklan ile ne kadar karıştığı ölçülmüştür. Beta-glukan izolasyonunda yüksek saflıkta ürün elde edilirken alfa-glukan izolasyonuna beta-glukanın karıştığı bulunmuştur. Ancak gluklan miktarları farklı türler arasında farklılıklar gösterebileceği gibi aynı tür içerisinde kültür koşullarına bağlı olarak da farklı

miktarlarda olabilmektedir (Rop ve ark., 2009). Daha iyi bir saflaştırma için DEAE-Sepharose/Sephacryl S-500, Sephadex G-15 ya da DEAE-cellulose kolon kromatografisi kullanılmış olsa da doğal malzemelerde görülen ve polimerin dallanmasından kaynaklanan yüksek heterojenite tek tip bir ürünün elde edilmesini zorlaştırmaktadır (Camelini ve ark., 2005; Kao ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2018).

Bu çalışmada ulaşılmak istenen hedeflerden biri elde edilen gluklanların hücre üzerindeki etkilerinin belirlenmesi ve rejeneratif tıpta bir biyomalzeme olarak kullanılabilirliğinin ortaya konmasıdır. Bu çalışmada beta-glukan üzerine olan hücre tutunmasının düşük (%61,26) olduğu görülmüştür. Arpadan %95 saflıkta elde edilen beta-glukanın fibroblast hücrelerinin çoğalmasını ve hücre migrasyonunu desteklediği ve böylece yara iyileştirmede kullanılabilirliği ortaya konmuştur (Fuste ve ark., 2019). Ancak ilgili çalışmada arpa beta-glukan hücre tutunmasını engelleyerek kontrole göre yaklaşık %60 oranda kalmasına sebep olmuş ve bu çalışmada ortaya konan %61.26 tutunma değerine yakın olduğu görülmektedir. Kolajen tip-1 kaplı yüzeylerin hücre tutunmasını iyi destekleyen polistiren malzemesine göre daha iyi bir tutunma sağladığı görülmüştür. Yüksek saflıktaki (%97.87) alfa-glukanın hücre tutunmasını ve hücre çoğalmasını kolajen tip-1 kaplı yüzeye yakın bulunmuş ve bu bulgu alfa-glukanın bir biyomalzeme olarak kullanılabilirliği gösterilmiştir. α -1,4- ve α -1,6-glikosidik bağ ile bağlı glukoz monomerlerinden oluşmuş ve bir alfa-glukan olan *Aureobasidium pullulan* kaynaklı pullulan kullanılarak yapılan çalışmalarda toksik olmaması, immün cevap oluşturmaması ve karsinojenik etki taşımamaları nedeniyle iyi bir ilaç taşıyıcı ve kaplama malzemesi olarak kullanılabilirliği bildirilmiştir (Jo ve ark., 2006; Singh ve ark., 2017). Pozitif yüklenmiş (katyonize) pullulanların kalp-damar cerrahisinde kullanılan stentlerin kaplanmasıyla kullanılabilirliği öngörülmüştür (Singh ve ark., 2017). Belirtilen çalışmalarda ilaç olarak kullanılacak kapsüllerin kaplanması amacıyla kullanıldığından kaplanan alfa-glukanın miktarı bildirilmemiştir. Alfa-glukanın kontrol grubuna göre hücre çoğalmasını yaklaşık 1.6 kat artırdığı bu çalışmada ölçülmüştür. Literatürde yalnız alfa-glukanların hücre kültürü veya doku implantının kullanımını içeren yayına rastlanmamıştır. Kolajen tip-1 kaynağının hayvansal olmasından dolayı oluşturacağı kontaminasyon riski yüzünden medikal alanda kullanımı oldukça sınırlandırılmıştır. Bu yüzden alfa-glukan gibi hayvan ya da insan kaynaklı olmayan bir kaplama malzemesinin medikal ya da doku mühendisliği



alanlarındaki kullanımı oldukça yüksek potansiyele sahiptir.

Beta-glukan ile yapılan çalışmada bu polimerin hücre tutunması üzerinde olumlu ya da olumsuz bir etkisinin olduğu veya hücre canlılığını azaltacak bir toksisite gösterdiği belirlenmemiştir. Beta-glukanın hücre çoğalmasında da desteklemeyerek kültür ortamında kullanılmasının bir avantaj sağlamadığı gösterilmiştir. Beta-glukanlar hidrojel ya da diğer biyo-malzemelerle birleştirilerek sağlık alanında kullanılabilir biyo-film ya da 3-boyutlu yapıların oluşturulmasında kullanılabilirliği birçok çalışmada gösterilmiştir (Zhu ve ark., 2016; Borkowski ve ark., 2017; Klimek ve ark., 2017). Ancak beta-glukanların hücrelerde laktosil seramidler ile bağlantı kurduğu ve bunun sonucunda MAPK sinyal yolağında fosforilasyonu sağladığı tespit edilmiştir (Brown ve ark., 2002; Lin ve ark., 2007). Bu yüzden bu malzemenin tek başına kullanımının organizma üzerindeki etkilerinin araştırılması devam etmektedir. Kitosan nano-parçacıkların 1,3-β-glukan (%1) ile kaplanması sonrasında partiküllerin negatif yüklendiği (-33 ± 2 mV) ölçümlerle ortaya konmuştur (Singh et al., 2018). Ancak beta-glukan kaplı bu nano-parçacıkların taşıdığı ilaçların C6 ve LN18 glioblastoma hücre hatlarına daha etki bir şekilde endositoz ile aktarıldığı ve bunu gerçekleştirirken hücre yüzey reseptörü aracılığıyla gerçekleştirebileceği belirtilmiştir (Singh et al., 2018). Fungal alfa- ve beta-glikozidik bağların immün sistemi üzerine etkisini inceleyen bir çalışmada belirtildiği gibi bu zincirlerin uzunluğu, dallı yapısı veya polisakkariti oluşturan zincir dizisinin heterojenitesi bu immün tepkiyi belirlemektedir (Kataoka ve ark., 2002). *Saccharomyces cerevisiae* kaynaklı beta-glukanın karaciğer kanseri hücreleri üzerine dolaylı toksik etkisinin olduğu gösterilmiştir (Javmen ve ark., 2015). İlgili çalışmalar dallanma dışında aynı moleküler omurgaya sahip *S. cerevisiae* kaynaklı glukanlar kullanılarak gerçekleştirildiğinden *P. ostreatus* kaynaklı beta-glukanların etkisi bu çalışmayla gösterilmeye çalışılmıştır. *Pleurotus tuber-regium* 'tan elde edilen beta-glukanın biyo-uyumlu olma özelliği kullanılarak kanser tedavisinde kullanılacak toksik nanomalzemenin beta-glukan ile kaplanması sonrasında sitotoksik etkisinin azaltıldığı bildirilmiştir (Li ve ark., 2018). İlgili çalışmada beta-glukanla kaplama yöntemiyle biyo-uyumlu fonksiyonel nanomalzemelerin tasarlanabileceği ve klinik uygulamalar için daha geniş fırsatlar sunabileceği belirtilmiştir.

Yapılan çalışmada alfa- ve beta-glukanların biyo-uyumlu oldukları yüzey kaplaması sonrasında incelenmiştir. Sıvı besiyerine eklenmesi yerine

mezenkimal kök hücrelerin tutunduğu yüzeyin üzerine kaplanmasıyla bu malzemenin biyomedikal uygulamalara uygun bir biyomateryal olduğu gösterilmeye çalışılmıştır. Yüksek oranda dallanmış bir polimer yapısının immün tepkinin kuvvetinin azalmasına hatta immün modülatör etkinin yaratılabileceği ortaya konmuştur (Paulik ve ark., 1996; Sun ve Liu, 2009; Carbonero ve ark., 2012).

Sonuç olarak bu çalışmada *P. ostreatus* 'tan alfa- ve beta-glukan izolasyonları gerçekleştirildi ve biyomedikal uygulamalar için uygun biyo-uyumlu malzemeler oldukları gösterildi. Ayrıca alfa-glukanın hücre tutunması ve çoğalması gibi hücre canlılığına özgü belirteçleri desteklediği ortaya kondu. *P. ostreatus* kaynaklı alfa-glukanın özelliklerinin daha iyi incelenmesiyle bir biyo-malzeme olarak kullanılabilirliğinin önündeki belirsizlik ortadan kalkacaktır.

Kaynaklar

- Ahmad, A., Anjum, F.M., Zahoor T., Nawaz H., and Din, A. (2009). Physicochemical and functional properties of barley β-glucan as affected by different extraction procedures. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44 181–187.
- Borkowski, L., Sroka-Bartnicka, A., Polkowska, I., Pawlowska, M., Palka, K., Zieba, E., Slosarczyk, A., Jozwiak, K., ve Ginalska, G., (2017). New approach in evaluation of ceramic-polymer composite bioactivity and biocompatibility., *Anal. Bioanal. Chem.*, 409, 5747-5755.
- Brown, G.D., Taylor, P.R., Reid, D.M., Willment, J.A., Williams, D.L., Martinez-Pomares, L., Wong, S.Y., ve Gordon, S., (2002). Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages., *J. Exp. Med.* ,196, :407-412.
- Camelini, C.M., Maraschin, M., de Mendonça, M.M., Zucco, C., Ferreira, A.G. ve, Tavares, L.A. (2005)., Structural characterization of beta-glucans of *Agaricus brasiliensis* in different stages of fruiting body maturity and their use in nutraceutical products., *Biotechnol. Lett.*, 27, 1295-1299.
- Carbonero, E.R., Ruthes, A.C., Freitas, C.S., Utrilla, P., Gálvez, J., da Silva, E.V., Sasaki, G.L., Gorin, P.A. ve, Iacomini, M., (2012). Chemical and biological properties of a highly branched β-glucan from edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*., *Carbohydr. Polym.*,90, 814-819.



- Castro-Alves, V.C., ve Nascimento, J.R.O.D., (2018). α - and β -d-Glucans from the edible mushroom *Pleurotus albidus* differentially regulate lipid-induced inflammation and foam cell formation in human macrophage-like THP-1 cells,. *Int J Biol Macromol.*, 111, 1222-1228.
- Chen, J., ve Seviour, R., (2007). Medicinal importance of fungal beta-(1->3), (1->6)-glucans,. *Mycol. Res.*, 111, 635–652.
- Choromanska, A., Kulbacka, J., Harasym, J., Dubinska-Magiera, M. ve, Saczko, J., (2017). Anticancer activity of oat β -glucan in combination with electroporation on human cancer cells,. *Acta Pol. Pharm.*, 74, 616-623.
- Correa, R.C.G., Brugnari, T., Bracht, A., Peralta, R.M., . ve Ferreira, I.C.F.R.,(2016). Biotechnological, nutritional and therapeutic uses of *Pleurotus* spp. (Oyster mushroom) related with its chemical composition: A review on the past decade findings,. *Trends Food Sci. Technol.*, 50, 103-117.
- Dawkins N.L. ve Nnanna I.A. (1993). Oat gum and β -glucan extraction from oat bran and rolled oats: Temperature and pH effects. *Food Sci.* 58 562–566.
- Deepalakshmi, K. ve, Mirunalini, S., (2014). *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties,. *J. Biochem. Tech.*, 5, 718-726.
- Doğan, N., Doğan, C.ve, Hayoğlu, İ., (2014). Farklı sıcaklık ve süre uygulamalarının *pleurotus ostreatus* (istiridye mantarı)'un bazı özelliklerine etkisi. , *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 18, 10-16.
- Du, B., Lin, C.Y., Bian, Z.X. ve, Xu, B.J., (2015). An insight into anti-inflammatory effects of fungal beta-glucan,. *Trends Food Sci. Technol.*, 41, 49–59.
- DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. ve, Smith, F., (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances,. *Anal Chem.*, 28, 350-356.
- Duruksu, G., ve Aciksari, A., (2018). Guiding the Differentiation Direction of Pancreatic Islet-Derived Stem Cells by Glycated Collagen,. *Stem Cells Int.*, 2018, 6143081.
- El Enshasy, H.A., ve Hatti-Kaul, R. (2013)., Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications,. *Trends Biotechnol.*, 31, 668-677.
- Erdem, A., Duruksu, G., Congur, G., and Karaoz, E., (2013). Genomagnetic assay for electrochemical detection of osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells,. *Analyst*, 138, 5424-5430.
- Fontana, G., Gershlak, J., Adamski, M., Lee, J.S., Matsumoto, S., Le, H.D., Binder, B., Wirth, J., Gaudette, G. ve, Murphy, W.L., (2017). Biofunctionalized Plants as Diverse Biomaterials for Human Cell Culture, *Adv Healthc Mater.*, 6, 1-9.
- Fuste, N.P., Guasch, M., Guillen, P., Anerillas, C., Cemeli, T., Pedraza, N., Ferrezuelo, F., Encinas, M., Moralejo, M. ve Garí, E. (2019). Barley β -glucan accelerates wound healing by favoring migration versus proliferation of human dermal fibroblasts. *Carbohydr. Polym.* 210 389–398.
- Gutierrez, A., Prieto, A., ve Martínez, A.T., (1996). Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*, *Carbohydr Res.*, 281, 143-154.
- Higashi, D., Seki, K., Ishibashi, Y., Egawa, Y., Koga, M., Sasaki, T., Hirano, K., Mikami, K., Futami, K., Maekawa, T. ve, Sudo, M., (2012). The effect of lentinan combination therapy for unresectable advanced gastric cancer,. *Anticancer Res.*, 32, 2365-2368.
- Hunter, K. W., Jr., Gault, R. A. ve Berner, M. D. (2002). Preparation of microparticulate β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation. *Lett. Appl. Microbiol.* 35, 267–271.
- Hyde, K.D., Bahkali, A.H. ve, Moslem, M.A., (2010). Fungi-an unusual source for cosmetics,. *Fungal Divers.*, 43, 1-9.
- İşsever, H., Ezirmik, E., ve Şeker, N., (2018). Beta glukanoların sağlık üzerine etkileri,. *Turk. Klin. J. Public Health-Special Topics*, 4,13-17.
- Jantova, S., Bakos, D., Birosova, L. ve, Matejov, P., (2015). Biological properties of a novel coladerm-beta glucan membrane. In vitro assessment using human fibroblasts,. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, 159, 67-76.



- Javmen, A., Nemeikaite-Ceniene, A., Grigiskis, S., Jonauskienė, I., Rudenkov, M., Kacianauskas, D., ve Mauricas, M., (2015). *S. cerevisiae* β -glucan reduced viability of mouse hepatoma cells in vitro., *Turk J Biol*, 39, 562-566.
- Jesenak, M., Majtan, J., Rennerova, Z., Kyselovic, J., Banovcin, P., ve Hrubisko, M., (2013). Immunomodulatory effect of pleuran (β -glucan from *Pleurotus ostreatus*) in children with recurrent respiratory tract infections., *Int Immunopharmacol.*, 15, 395-399.
- Jo, J., Yamamoto, M., Matsumoto, K., Nakamura, T., ve Tabata, Y.,(2006). Liver targeting of plasmid DNA with a cationized pullulan for tumor suppression., *J Nanosci Nanotechnol.*, 6, 2853-2859, (2006).
- Kao, P.F., Wang, S.H., Hung, W.T., Liao, Y.H., Lin, C.M. ve Yang, W.B., (2012). Structural characterization and antioxidative activity of low-molecular-weights beta-1,3-glucan from the residue of extracted *Ganoderma lucidum* fruiting bodies., *J. Biomed. Biotechnol.*, 2012, 673764.
- Karacsonya, S. ve Kuniakb, L., (1994). Polysaccharides of *Pleurotus ostreatus*: Isolation and structure of pleuran, an alkali-insoluble β -D-glucan., *Carbohydr. Polym.*, 24, 107-111.
- Kataoka, K., Muta, T., Yamazaki, S. ve Takeshige, K., (2002). Activation of macrophages by linear (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans: implications for the recognition of fungi by innate immunity., *J. Biol. Chem.*, 277, 36825–36831.
- Khan, A.A., Gani, A., Masoodi, F.A., Mushtaq, U., ve Naik, A.S., (2017). Structural, rheological, antioxidant, and functional properties of β -glucan extracted from edible mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Coprinus atramentarius*. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 11, 67-74.
- Kimura, T., (2013) Natural products and biological activity of the pharmacologically active cauliflower mushroom *Sparassis crispa*., *BioMed Res Int.*, 2013, 982317.
- Klimek, K., Przekora, A., Benko, A., Niemiec, W., Blazewicz, M., ve Ginalska, G., (2017). The use of calcium ions instead of heat treatment for β -1,3-glucan gelation improves biocompatibility of the β -1,3-glucan/HA bone scaffold., *Carbohydr. Polym.*, 164, 170-178.
- Li, X., Zhou, J., Dong, X., Cheng, W.Y., Duan, H. ve Cheung, P.C.K., (2018). In Vitro and In Vivo Photothermal Cancer Therapeutic Effects of Gold Nanorods Modified with Mushroom β -Glucan., *J Agric Food Chem.*, 66, 4091-4098.
- Lin, H., Cheung, S.W., Nesin, M. ve Cassileth, B.R., (2007). Cunningham-Rundles S., Enhancement of umbilical cord blood cell hematopoiesis by maitake beta-glucan is mediated by granulocyte colony-stimulating factor production., *Clin. Vaccine Immunol.*, 14, 21-27.
- Liu, X., Wang, Q., Cui, S. ve Liu, H. (2008). A new isolation method of β -D-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Hydrocolloid* 22, 239–247.
- Mukhopadhyay, S.K., Naskar, D., Bhattacharjee, P., Mishra, A., Kundu, S.C. ve Dey, S. (2017)., Silk fibroin-Thelebolan matrix: A promising chemopreventive scaffold for soft tissue cancer., *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 155, 379-389.
- Nwe, N., Furuike, T., ve Tamura, H., (2011). Production, Properties and Applications of Fungal Cell Wall Polysaccharides: Chitosan and Glucan. Jayakumar R., Prabakaran M. ve Muzzarelli R.A.A. (Ed.) *Chitosan for Biomaterials II. Advances in Polymer Science* (Jayakumar R., Prabakaran M., Muzzarelli R.A.A.), (ss. 187-207). Berlin: Springer-Verlag Berlin, 2011;244:187-207.
- Nwe, N., Stevens, W.F., Tokura, S. ve Tamura, H. (2008). Characterization of chitosan and chitosan-glucan complex extracted from the cell wall of fungus *Gongronella butleri* USDB 0201 by enzymatic method. , *Enzyme Microb. Technol.*, 42, 242-251.
- Ohno, N., Miura, T., Miura, N. N., Adachi, Y. ve Yadomae, T. (2001) Structure and biological activities of hypochlorite oxidized zymosan. *Carbohydr. Polym.* 70, 339–349.
- Otakar, R., Mlcek, J. ve Jurikova, T., (2009). Beta-glucans in higher fungi and their health effects, *Nutr. Rev.*, 67, 624–631.
- Palacios, I., García-Lafuente, A., Guillamón, E. ve Villares, A., (2012). Novel isolation of water-soluble polysaccharides from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* mushrooms, *Carbohydr. Res.*, 358, 72-77.



- Papaspyridi, L., Zerva, A. ve Topakas, E., (2018). Biocatalytic Synthesis of Fungal β -Glucans. *Catalysts*, 8, 274.
- Paulik, S., Mojzisoava, S.J., Durove, A., Benisek, Z. ve Huska, M., (1996). The immunomodulatory effect of the soluble fungal glucan (*Pleurotus ostreatus*) on delayed hypersensitivity and phagocytic ability of blood leucocytes in mice,. *Zentralbl. Veterinarmed. B.*, 43, 129-135.
- Piska, K., Sułkowska-Ziaja, K. ve Muszyńska, B., (2017). Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom) – Its dietary significance and biological activity,. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*, 16, 151-161.
- Rop, O., Mlcek, J. ve Jurikova T. (2009). Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutr. Rev.* 2009; 67(11): 624-631.
- Ruthes, A.C., Smiderle, F.R., ve Lacomini, M., (2015). D-glucans from edible mushrooms: a review on the extraction, purification and chemical characterization approaches,. *Carbohydr. Polym.*, 117, 753-761.
- Sandula, J., Kogan, G., Kacurakova, M., Machova, E. (1999). Microbial (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans, their preparation, physio-chemical characterization and immunomodulatory activity. *Carbohydr. Polym.*, 38, 247–253.
- Sari, M., Prange, A., Lelley, J.I., ve Hambitzer R., (2017). Screening of beta-glucan contents in commercially cultivated and wild growing mushrooms,. *Food Chem.*, 216, 45-51.
- Satitmanwivat, S., Ratanakhanokchai, K., Laohakunjit, N., Chao, L.K., Chen, S.T., Pason, P., Tachaapaikoon, C. ve Kyu K.L., (2012). Improved purity and immunostimulatory activity of β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-glucan from *Pleurotus sajor-caju* using cell wall-degrading enzymes,. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 5423-5430.
- Singh, P.K., Srivastava, A.K., Dev, A.D., Kaundal, B., Choudhury, S.R. ve Karmakar, S. (2018). 1, 3- β -Glucan anchored, paclitaxel loaded chitosan nanocarrier endows enhanced hemocompatibility with efficient anti-glioblastoma stem cells therapy. *Carbohydr. Polym.* 180 365–375.
- Singh, R.S., Kaur, N., Rana, V. ve Kennedy, J.F., (2017). Pullulan: A novel molecule for biomedical applications,. *Carbohydr. Polym.*, 171, 102-121.
- Sun, Y. ,ve Liu, J., (2009). Purification, structure and immunobiological activity of a water-soluble polysaccharide from the fruiting body of *Pleurotus ostreatus*,. *Bioresour. Technol.*, 100, 983-986.
- Thammakiti, S., Suphantharika, M., Phaesuwan, T. ve Verduyn, C. (2004). Preparation of spent brewer's yeast β -glucans for potential applications in the food industry. *Int. J. Food Microbiol.* 39, 21–29.
- Vetvicka, V., Gover, O., Karpovsky, M., Hayby, H., Danay, O., Ezov, N., Hadar, Y. ve Schwartz, B. (2019). Immune-modulating activities of glucans extracted from *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*. *J. Funct. Food.* 54 81–91.
- Wasser S.P. (2010)., Medicinal mushroom science: History, current status, future trends, and unsolved problems,. *Int. J. Med. Mushrooms*, 12, 1–16.
- Xing, Y., Chen, C., Sun, W., Zhang, B., Sang, Y., Xiu, Z. ve Dong, Y. (2018). An environment-friendly approach to isolate and purify glucan from spent cells of recombinant *Pichia pastoris* and the bioactivity characterization of the purified glucan. *Eng. Life Sci.* 18, 227–235.
- Zhang, A., Deng, J., Liu, X., He, P., He, L., Zhang, F., Linhardt, R.J. ve Sun P. (2018). Structure and conformation of α -glucan extracted from *Agaricus blazei* Murill by high-speed shearing homogenization. *Int. J. Biol. Macromol.* 113 558-564.
- Zhu F., Du B. ve Xu B. (2016)., A critical review on production and industrial applications of beta-glucans,. *Food Hydrocolloid.*, 52, 275-288.