

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğba BALIN

***GANODERMA LUCIDUM* (REISHI VEYA LING-CHI) MANTARININ
SUBKRİTİK SU İLE EKSTRAKSİYONU VE BİLEŞENLERİNİN
TANIMLANMASI**

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA, 2007

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GANODERMA LUCIDUM (REISHI VEYA LING-
CHI) MANTARININ SUBKRİTİK SU İLE
EKSTRAKSİYONU VE BİLEŞENLERİNİN
TANIMLANMASI**

Tuğba BALIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

**Bu tez/...../2007 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.**

İmza.....
Öğr.Gör.Dr. Sibel IRMAK
DANIŞMAN

İmza.....
Prof.Dr. Oktay ERBATUR
ÜYE

İmza.....
Yrd.Doç.Dr. Gülsün A. EVRENDİLEK
ÜYE

Bu tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ

Enstitü Müdürü

İmza ve Mühür

Bu Çalışma Ç.Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: FEF2006YL76

- **Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GANODERMA LUCIDUM (REISHI VEYA LING-CHI)
MANTARININ SUBKRİTİK SU İLE EKSTRAKSİYONU
VE BİLEŞENLERİNİN TANIMLANMASI**

Tuğba BALIN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman : Öğr.Gör.Dr. Sibel IRMAK

Yıl: 2007 Sayfa: 85

Jüri : Öğr.Gör.Dr. Sibel IRMAK

Prof. Dr. Oktay ERBATUR

Yrd.Doç.Dr. Gülsün A. EVRENDİLEK

Bu çalışmada, “Balcalı” ve “Alata” diye adlandırılan yöresel iki farklı *Ganoderma lucidum* türünün polisakkaritleri CO₂ atmosferinde subkritik su ile ekstrakte edilmiştir. Subkritik su ekstraksiyonu, ekstrakte edilmiş polisakkaritlerin fiziksel ve kimyasal niteliğini incelemek için üç farklı sıcaklık (50, 100 ve 150°C) ve 280 bar (4060 psi) sabit basınçta gerçekleştirilmiştir. Her bir ekstrakttaki polisakkaritlerin çözünürlüğü, pH’sı, nem, protein, üronik asit ve monosakkarit içerikleri ve moleküler kütle dağılımları belirlenmiştir. Ekstraktların monosakkarit içerikleri ve ortalama moleküler kütleleri GPC ve HPSEC-MALLS analizleri ile belirlenmiştir. Bu analizlerden elde edilen sonuçlar, *Ganoderma lucidum*’un her iki türündeki polisakkaritlerin başlıca D-glukoz ve eser miktarlarda D-mannoz ve D-galaktozdan oluştuğunu göstermiştir. HPSEC-MALLS analizleri ile her iki türün iki polisakkarit fraksiyonu içerdiği belirlenmiştir. Alata’da ilk fraksiyonunun kütlece ortalama molekül kütlesi (M_w), sırasıyla 50, 100 ve 150°C için, 1,253x10⁷; 5,924x10⁶ ve 2,901x10⁶ Da ve Balcalı’da ise 6,279x10⁶; 1,749x10⁶ ve 8,140x10⁵ Da olarak hesaplanmıştır. İkinci fraksiyonların molekül kütleleri ise, sırasıyla 50, 100 ve 150 °C’de, Alata için 5,064x10⁴; 4,687x10⁴ ve 1,022x10⁴ Da ve Balcalı için 4,311x10⁴; 2,662x10⁴ ve 2,672x10⁴ Da olarak bulunmuştur. 280 nm’de HPSEC-UV analizleri ve Lowry protein metodu sonuçları, polisakkarit ekstraktlarının protein içerdiğini de göstermiştir. Polisakkarit ekstraktlarındaki proteinin miktarı ekstraksiyon sıcaklığının artmasıyla azalmıştır. Nötral ve bazik ortamda Balcalı ve Alata’nın sıcak su ekstraktlarının sırasıyla %1,53 ve %3,43’ü çözünmeden kalırken, subkritik su ekstraktlarının tümü çözülmüştür. Anahtar Kelimeler: *Ganoderma lucidum* (Reishi), subkritik su ekstraksiyonu, polisakkarit, moleküler kütle dağılımı.

ABSTRACT

MSc THESIS

SUBCRITICAL WATER EXTRACTION OF GANODERMA LUCIDUM STRAINS AND CHARACTERIZATION OF THEIR COMPOUNDS

Tuğba BALIN

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor : Dr. Sibel IRMAK

Year: 2007, Pages: 85

Jury : Dr. Sibel IRMAK

Prof. Oktay ERBATUR

Assoc.Prof. Gülsün A. EVRENDILEK

In this study, polysaccharides of two different *Ganoderma lucidum* local strains called “Balcali” and “Alata” were extracted with subcritical water at CO₂ atmosphere. Subcritical water extraction was carried out at three different temperatures (50, 100 and 150 °C) at a constant pressure of 280 bar to examine physical and chemical characterization of the polysaccharides extracted. The solubility, pH, humidity, protein, uronic acid, and monosaccharide contents, and molecular weight distribution of polysaccharides in each extract were determined. Monosaccharide contents and the average molecular weights of the extracts were determined by GPC and HPSEC-MALLS analysis. The results showed that polysaccharides of both strains of *Ganoderma lucidum* composed of mainly D-glucose and trace amount of D-mannose and D-galactose. HPSEC-MALLS analysis were indicated that both strains contained two polysaccharide fractions. The weight-average molecular masses of first fraction in Alata were 1.253×10^7 , 5.924×10^6 and 2.901×10^6 Da and in Balcali were 6.279×10^6 , 1.749×10^6 and 8.140×10^5 Da at 50, 100, and 150 °C, respectively. The second fraction had weight average molecular weight (M_w) of 5.064×10^4 , 4.687×10^4 and 1.022×10^4 Da for Alata and 4.311×10^4 , 2.662×10^4 and 2.672×10^4 Da for Balcali at 50, 100 and 150 °C, respectively. HPSEC-UV analysis at 280 nm and Lowry protein assay results showed that these polysaccharide extracts contained protein. The amount of protein in polysaccharide extracts decreased by increasing the extraction temperature. All subcritical water extracts of Balcali and Alata were soluble while hot water extracts left insoluble residues of 1.53% and 3.43% in neutral and alkali medium, respectively.

KeyWords: *Ganoderma lucidum* (Reishi), subcritical water extraction, polysaccharide, molecular mass distribution

TEŞEKKÜR

Kimya eğitimim ve akademik çalıŐmalarımnda her konuda benden desteğini esirgemeyen, anlayıŐ gösteren, tez çalıŐmam süresince yapmıŐ olduğum araŐtırmalarda beni yönlendiren danıŐmanım Prof.Dr. Oktay Erbatur ve Öğr. Gör. Dr. Sibel Irmak'a teŐekkürlerimi sunarım. AraŐtırmalarımnda fikirleri ve çabalarıyla bana her zaman sonsuz destek veren ArŐ. Gör. Osman Malik Atanur'a da çok teşekkür ederim. Katkılarından dolayı Prof. Saphwan Al-Assaf, Öğr. Gör. Dr. Arif Hesenov ve diğer analitik grubu üyelerine de teşekkür ederim.

Aileme ve özellikle de annem Fatma ve babam Sebahattin Balın'a eğitim ve ğretim hayatım boyunca bana maddi, manevi her konuda destek oldukları ve her zaman güvendikleri için çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	X
1.GİRİŞ.....	1
1.1.TEORİ.....	2
1.1.1.Tıbbi Olarak Kullanılan Mantarlar.....	2
1.1.2. <i>Ganoderma</i> Mantarlarının Bulunuşu ve Taksonomisi.....	5
1.1.3. <i>Ganoderma lucidum</i> Mantarının Bileşenleri.....	9
1.1.3.1.Polisakkaritler.....	10
(i).Polisakkaritlein Hidrolizi.....	13
1.1.3.2.Steroller.....	14
(i)Ergosterol.....	14
1.1.3.3.Alkoloidler.....	15
1.1.3.4.Komarin.....	15
1.1.3.5.Mannitol.....	16
1.1.3.6.Lakton.....	17
1.1.3.7.Riboflavin.....	17
1.1.3.8.Askorbik Asit.....	18
1.1.3.9.Amino Asitler.....	20
1.1.4.Subkritik ve Süperkritik Suyun Özellikleri.....	21
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	26
3.MATERYAL VE METOD.....	37
3.1.Materyal.....	37
3.1.1.Çalışılan Mantar Türleri.....	37
3.1.2.Kullanılan Kimyasallar.....	37

3.1.3.Kromatografik ve Spektroskopik Analizlerde Kullanılan Standartlar.....	37
3.1.4.Yüksek Sıcaklık/Yüksek Basınç Reaktörü.....	38
3.1.5.Analitik Cihazlar.....	39
3.2.Metod.....	41
3.2.1. <i>Ganoderma lucidum</i> Mantar Örneklerinin Hazırlanması.....	41
3.2.2.Subkritik Su ile Ekstraksiyon Çalışması.....	41
3.2.3.Ekstraksiyon Sonrası Bileşenlerin İzolasyonu.....	41
3.2.4.Homojenlik ve Ortalama Moleküler Kütlelerin Belirlenmesi.....	43
3.2.4.1.Jel Geçirgenlik Kromatografisi Analizleri.....	43
3.2.4.2.HPSEC-MALLS Analizleri.....	44
3.2.5.Ekstraktların Kimyasal Bileşimi ve Karakterizasyonu.....	45
3.2.5.1. Monosakkarit Analizleri.....	45
3.2.5.2. Lowry Protein Metodu.....	46
3.2.5.3. Üronik Asit İçeriği.....	46
3.2.5.4. Çözünürlük Testi.....	46
(i) Bazik ortamda çözünürlük testi (JECFA1).....	47
(ii) Nötral ortamda çözünürlük testi (JECFA2).....	47
3.2.5.5. Polisakkaritlerin Karakterizasyonu.....	47
4.BULGULAR VE TARTIŞMA.....	49
4.1. Jel Geçirgenlik Kromatografisi Analizleri.....	49
4.2. HPSEC-MALLS Analizleri.....	56
4.3. Polisakkaritlerin Kimyasal Bileşimi	60
4.4. Infrared (FT-IR) Sonuçları.....	64
5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	68
KAYNAKLAR.....	70
ÖZGEÇMİŞ.....	78
EKLER.....	79

Çizelge 1.1. Tıbbi olarak aktif yüksek Basidiomycota mantarları ve onların tedavi edici özellikleri.....	4
Çizelge 1.2. <i>Ganoderma lucidum</i> 'a ait özellikler.....	5
Çizelge 1.3. <i>Ganoderma lucidum</i> mantarını yetiştirmede önemli bazı parametreler.....	8
Çizelge 4.1. Alata ve Balcalı <i>Ganoderma lucidum</i> mantarının CO ₂ atmosferi altında 50, 100 ve 150°C'de subkritik su ile ekstraksiyonundan elde edilen kaba polisakkarit miktarları.....	49
Çizelge 4.2. Dekstran standartlarının molekül kütleleri ve GPC kolonundan elüsyonları sonucunda belirlenen alıkonma zamanları	50
Çizelge 4.3. Alata ve Balcalı <i>Ganoderma lucidum</i> mantarının subkritik koşullarda ekstrakte edilen polisakkaritlerini ortalama moleküler kütleleri (M _p).....	51
Çizelge 4.4. Alata ve Balcalı <i>Ganoderma lucidum</i> polisakkaritlerinin HPSEC-MALLS analizi sonucu hesaplanan ortalama molekül kütleleri (M _w).....	59
Çizelge 4.5. Alata ve Balcalı <i>Ganoderma lucidum</i> polisakkaritlerinin temel bileşenleri.....	61
Çizelge 4.6. Alata ve Balcalı <i>Ganoderma lucidum</i> polisakkaritlerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	62

Şekil 1.1. <i>Ganoderma lucidum</i> 'un meyve kısmı.....	6
Şekil 1.2. Doğada yetişen ve kültür <i>Ganoderma lucidum</i> (Reishi) mantarı.....	7
Şekil 1.3. Selüloz (β -(1→4)-glukozidik bağ ile bağlı D-glukoz üniteleri).....	10
Şekil 1.4. Amilopektin (α -(1→6)-glukozidik bağ ile bağlı D-glukoz üniteleri).....	11
Şekil 1.5. Şeker moleküllerinin 4C_1 sandalye konformasyonunda anomerik bağ etrafında dönme açılarının iki değişik bağlantıda β -(1→4) ve β -(1→6) gösterilmesi.....	12
Şekil 1.6. β -D-glukozun (a) piranoz ve (b) furanoz formu.....	13
Şekil 1.7. Ergosterol.....	15
Şekil 1.8. Komarin.....	15
Şekil 1.9. Komarin eldesi.....	16
Şekil 1.10. Mannitol.....	16
Şekil 1.11. gamma-Butyrolactone (GBL).....	17
Şekil 1.12. Riboflavin (B ₂ vitamini).....	17
Şekil 1.13. Askorbik asit (C vitamini).....	18
Şekil 1.14. 1,3-diketon vermek için proton üzerine askorbik enolün atağı.....	19
Şekil 1.15. C vitamininin oksidasyon prosesi.....	19
Şekil 1.16. Amino asitlerin yapısı.....	20
Şekil 1.17. Amino asitlerin L-konfigürasyonu.....	21
Şekil 1.18. Amino asitlerin kuvvetli asidik ve bazik çözeltilerdeki şekli.....	21
Şekil 1.19. Suyun faz diyagramı.....	22
Şekil 1.20. Suyun sıcaklık, basınç ve yoğunluk ilişkisini gösteren üç boyutlu diyagramı.....	23
Şekil 1.21. Suyun dielektrik sabiti değerleri.....	24
Şekil 1.22. Suyun iyon çarpımı sabiti (K_w) değerleri.....	24
Şekil 2.1. PS-I ve PS-II polisakkaritlerinin olası yapıları.....	32
Şekil 2.2. <i>Ganoderma lucidum</i> 'daki altı triterpenoidin yapısı.....	36
Şekil 3.1. 500 ml yüksek basınç/sıcaklık reaktörü.....	38
Şekil 3.2. Bir SEC cihazının şematik gösterimi.....	39

Şekil 3.3. SEC ile farklı büyüklüklerdeki moleküllerin ayrımı.....	39
Şekil 3.4. SEC kolonda moleküllerin ayrımı.....	40
Şekil 3.5. Polisakkaritlerin izolasyonu.....	42
Şekil 3.6. GPC analizlerde kullanılan HPLC cihazı.....	43
Şekil 3.7. HPSEC-MALLS sistemi.....	44
Şekil 3.8. Monosakkarit analizlerinde kullanılan Varian HPLC sistemi.....	45
Şekil 4.1. Dekstran standartlarının Ultrahydrogel 2000–250 kolondan elüsyonunun durumunu gösteren kromatogram.....	50
Şekil 4.2. Dekstran standartlarının GPC analizi sonucu oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	50
Şekil 4.3. Alata <i>Ganoderma lucidum</i> mantarının CO ₂ atmosferinde sırasıyla a) 50, b) 100 ve c) 150°C ve 280 bar basınçta subkritik su ile ekstraksiyonu sonucunda elde edilen kaba polisakkaritin GPC kromatogramları.....	52
Şekil 4.4. Balcalı <i>Ganoderma lucidum</i> mantarının CO ₂ atmosferinde sırasıyla a) 50, b) 100 ve c) 150°C ve 280 bar basınçta subkritik su ile ekstraksiyonu sonucunda elde edilen kaba polisakkaritin GPC kromatogramları.....	53
Şekil 4.5. <i>Ganoderma lucidum</i> mantar türlerinin atmosferik koşullarda sıcak su ile ekstraksiyonu sonucunda elde edilen polisakkaritlerin GPC kromatogramları (a) Alata, (b) Balcalı.....	54
Şekil 4.6. Sıcak su, 50, 100 ve 150° C’de Alata <i>Ganoderma lucidum</i> ’dan ekstrakte edilmiş polisakkaritlerin üst üste çakıştırılmış HPSEC kromatogramları. a) MALLS dedektör cevabı; b) RI dedektör cevabı; c) UV dedektör cevabı.....	57
Şekil 4.7. Sıcak su, 50, 100 ve 150° C’de Balcalı <i>Ganoderma lucidum</i> ’dan ekstrakte edilmiş polisakkaritlerin üst üste çakıştırılmış HPSEC kromatogramları. a) MALLS dedektör cevabı; b) RI dedektör cevabı; c) UV dedektör cevabı.....	58
Şekil 4.8. BSA standartına ait kalibrasyon eğrisi.....	60

Şekil 4.9. Alata <i>Ganoderma lucidum</i> 'dan 50, 100, 150°C'de subkritik ve sıcak su ile ekstrakte edilen polisakkaritlerin IR spektrumu.....	64
Şekil 4.10. Balcalı <i>Ganoderma lucidum</i> 'dan 50, 100, 150°C'de subkritik ve sıcak su ile ekstrakte edilen polisakkaritlerin IR spektrumu.....	65
Şekil 4.11. Bazı monosakkaritlerin (basit şekerler) halka şekilleri.....	67

SİMGELER VE KISALTMALAR

A50-A100-A150:	Alata <i>Ganoderma lucidum</i> mantarının subkritik su-CO ₂ atmosferi koşullarında 50, 100 ve 150°C'deki ekstraksiyonu
B50-B100-B150:	Balcalı <i>Ganoderma lucidum</i> mantarının subkritik su-CO ₂ atmosferi koşullarında 50, 100 ve 150°C'deki ekstraksiyonu
ESI-MS	: Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (Elektro Sprey İyonlaştırma-Kütle Spektrometri)
FT-IR	: Fourier Transformed Infrared
GC-MS	: Gas Chromatography- Mass Spectrometry (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometri)
GFC	: Gel Filtration Chromatography (Jel-Süzme Kromatografisi)
GPC	: Gel Permeation Chromatography (Jel-Geçirgenlik Kromatografisi)
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
HPSEC	: High Performance Size-Exclusion Chromatography (Yüksek Performanslı Boyut-Eleme Kromatografisi)
HPTLC	: High Performance Thin Layer Chromatography (Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi)
LALLS	: Low Angle Laser Light Scattering Dedector (Düşük Açılı Lazer Işık Saçılım Dedektörü)
MALLS	: Multi Angle Laser Light Scattering Dedector (Çok Açılı Lazer Işık Saçılım Dedektörü)
M _p	: Peak Molar Mass (Pik Maksimumundaki Mol Kütleli)
M _w	: Weight-Average Molecular Weight (Kütlece-Ortalama Molekül Kütleli)
MWCO	: Molecular Weight Cut Off
MWR	: Molecular Weight Range
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
RI	: Refractive Index Dedector (Refraktif İndeks Dedektörü)
SFE	: Supercritical Fluid Extraction (Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu)

SWE : Subcritical Water Extraction (Subkritik Su Ekstraksiyonu)

XRD : X-Ray Diffraction

1.GİRİŞ

Yüksek Basidiomycota üyesi mantarlardan birisi olan *Ganoderma lucidum*, önemli tıbbi kullanıma sahip mantarlardan biridir. Bu mantarın meyve kısmı Çin’de ‘‘Lingzhi’’ ve Japonya’da ‘‘Reishi’’ olarak adlandırılmaktadır. Yüzyıllardır, bu mantar Çin ve diğer Asya ülkelerinde kronik bronşit, hepatit, hipertansiyon, yüksek kolesterol, tümörojenik hastalıklar ve immünolojik bozukluklar gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde ve bu hastalıklardan korunmada geleneksel Çin ilacı veya halk ilacı olarak kabul edilmiştir (Lin, 2001). Son yıllarda, bu mantarın biyolojik olarak aktif bileşenlerinden biri olan polisakkaritler, immünolojik ve anti-tümör özelliklerinden dolayı kimyagerlerin ve immünobiyologların dikkatini çekmektedir (Borchers ve ark., 1999; Wasser ve Weis, 1999b; Leung ve ark., 1997).

Şimdiye kadar *Ganoderma lucidum*’un polisakkaritleri genellikle kaynatılarak sıcak su ile ekstrakte edilmiştir (Chang ve ark., 2004). Ancak, son zamanlarda, basınçlandırılmış sıcak su veya subkritik su, doğal aktif bileşiklerin ekstraksiyonu için alternatif bir çözücü olarak büyük ilgi görmektedir. Su, sıcaklığın $99,97^{\circ}\text{C} < t < 374,15^{\circ}\text{C}$ aralığında ve basıncın $217,76 \text{ atm} < P$ şeklinde olduğu koşullarda ‘‘subkritik’’ olarak adlandırılır. Bu bölgede, suyun polaritesindeki azalma ile suyun dielektrik sabiti oda koşullarında olandan daha düşük olmaktadır. Bu durum, organik bileşiklerin çözünmesi için suyun çözme gücünde bir artışa neden olmaktadır (Shotipruk ve ark., 2004). Sıcak suyun aksine, subkritik suyun kullanımı *Ganoderma lucidum*’un polisakkarit moleküllerinin ekstraksiyonunu ve hidrolizini daha etkin yapacaktır. Sıcaklık ve basınçtaki artış ile su moleküllerinin katı haldeki mantar matrisi içine difüzyonu ve dolayısıyla polisakkaritlerle etkileşimi daha etkin olacaktır. Bununla birlikte, ekstraksiyon ortamında karbondioksit gazının bulunması karbonik asitin oluşumundan dolayı polisakkaritlerin ekstraksiyonunu ve hidrolizini hızlandıracaktır.

Boyut eleme kromatografisi (Size-Exclusion Chromatography, SEC), özellikle yüksek mol kütleli türlere uygulanabilen güçlü bir tekniktir. Bu yöntem, uygulamalarında jel süzme (Gel Filtration Chromatography, GFC) ve jel geçirgenlik (Gel Permeation Chromatography, GPC) olmak üzere iki alt kısma ayrılır. Birincide sulu çözücüler ve hidrofilik dolgu maddeleri, ikincide polar olmayan organik

çözücüler ve hidrofobik dolgu maddeleri kullanılır. Yöntemler, birisi suda çözünen maddelere, diğeri de daha az polar olan organik çözücülerde çözünen numunelere uygulanmaları bakımından birbirini tamamlar. Bu yöntemin ana uygulamalarından biri, büyük polimer veya doğal ürünlerin mol kütlelerinin veya mol kütlesi dağılımlarının hızlı bir şekilde tayinidir. SEC, karbonhidrat araştırmalarında, polisakkaritlerin moleküler kütle dağılımlarını belirlemede en çok kullanılan yöntemlerdendir. Bu yöntemle moleküler kütleleri belirlemede, vizkometri, düşük veya çok açılı lazer ışık saçılım (LALLS veya MALLS), refraktif indeks, ultraviyole/görünür bölge absorpsiyon, floresans, UV ile birleştirilmiş diferansiyel refraktometri gibi çeşitli ölçüm metodları kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, yerel *Ganoderma lucidum* türlerinin farklı sıcaklıklarda ve sabit basınçta subkritik su ile ekstraksiyonları yapılacak, elde edilen ekstraktlardan polisakkaritler izole edilecek ve bu polisakkaritlerin fiziksel özellikleri, moleküler kütle dağılımları, kimyasal bileşimleri analiz edilecektir. Elde edilen veriler farklı ekstraksiyon koşullarıyla kıyaslanarak tartışılacaktır.

1.1. Teori

1.1.1. Tıbbi Olarak Kullanılan Mantarlar

Besleyici değeri olan yenilebilir mantarların birçoğu tedavi edici amaçlar için dünya çapında uzun zamandır kullanılmaktadır. Yenilemeyen türlerin çoğu da önemli tıbbi kullanıma sahiptir. şu an çeşitli tedavi edici özelliklere sahip olduğu bilinen en az 270 tür mantar vardır (Ying ve ark., 1987).

Tıbbi olarak kullanılan mantarlar, çeşitli hastalıkların ve belirli sağlık problemlerinin tedavisi için büyük ölçüde kullanılmaktadır. Otuz yılı aşkın süredir, özellikle Japonya, Çin ve Kore'de bu mantarlar üzerinde yapılan birçok bilimsel çalışmanın sonucu olarak, geleneksel kullanımlarının çoğu doğrulanmış ve yeni uygulamalar geliştirilmiştir (Çizelge 1.1, Wasser and Weis, 1999a). Bu mantarların çeşitli immunolojik ve anti-kanser özellikleri dikkat çekerken, antioksidant, yüksek kan basıncını azaltıcı (anti-hypertensive), kolesterol düşürücü, karaciğeri koruyucu, ağrı hafifletici (anti-inflammatory), anti-diyabetik, anti-viral, anti-mikrobik etkilerini

içeren önemli tedavi edici özellikleri de bulunmaktadır. Uzak Doğu'da çoğu endüstriyel ilaç üreten şirket yenileyici biyomedikal moleküllerin zengin kaynağı olarak bu tedavi edici mantarları incelemektedir. Basidiomycota mantar sınıfından üretilen polisakkaritlere-bağlı proteinler U.S. Ulusal Kanseri Enstitüsü tarafından anti-tümör kimyasalları olarak sınıflandırılmaktadır (Jong ve Donovick, 1989). Bu tıbbi öneme sahip mantarlar hakkında daha detaylı bilgiler için Hobbs (1995), Stamets (1993, 2000) ve Mizuno (1995) referans olarak verilebilir.

Çizelge 1.1. Tıbbi olarak aktif Basidiomycota mantarları ve onların tedavi edici özellikleri (Wasser and Weis, 1999a) (X = ticari olarak geliştirilmiş mantar üretimi, + = ticari olarak geliştirilmeyen mantar üretimi)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
	Antifungal	Antiinflammatory	Antitumour	Antiviral (e.g. anti-HIV)	Antibacterial & Antiparasitic	Blood pressure regulation	Cardiovascular disorders	Hypercholesterolemia, hyperlipidemia	Antidiabetic	Immunomodulating	Kidney tonic	Hepatoprotective	Nerve tonic	Sexual potentiator	Chronic bronchitis	
Auriculariales				+		+	X	X								X
<i>Auricularia auricula-judas</i> (Bull.) Wettst.																
Tremellales		+	+					+	+	+		+				X
<i>Tremella fuciformis</i> Berk.						+										+
<i>Tremella mesenterica</i> Rits.:Fr.																
Polyporales																
<i>Schizophyllum commune</i> Fr.:Fr.			X	X		X				X	X	X				
<i>Dendropolyporus umbellatus</i> (Pers.:Fr.) Jül.				X						X	X	X				X
<i>Grifola frondosa</i> (Dicks.:Fr.) S.F. Gray	+		X	X	X	X			X	X		+				+
<i>Fomes formentarius</i> (L.:Fr.) Fr.				+		+										
<i>Fomitopsis pumicola</i> (Schw.:Fr.) P. Karst.		+	+		+							+				
<i>Trametes versicolor</i> (L.:Fr.) Lloyd				X	X	X					X	X				
<i>Piptoporus betulinus</i> (bull.:Fr.) P. Karst.	+		+		+											
<i>Hericium erinaceus</i> (bull.:Fr.) Pers.			+							X			X			X
<i>Inonotus obliquus</i> (Pers.:Fr.) Bond.et Sing.			X	X						X		X				
<i>Lenzites betulina</i> (L.:Fr.) Fr.				+				+								
<i>Laetiporus sulphureus</i> (Bull.:Fr.) Murr.	+			+												
Ganodermatales																
<i>Ganoderma lucidum</i> (Curt.:Fr.) P.Karst		X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X
<i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.				+	+	+				+						
Agaricomycetideae																
Agaricales s.l.																
Pleurotaceae																
<i>Lentinus edodes</i> (Berk.) Sing.			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.:Fr.) Kumm.				+	+	+		+					+			
<i>Pleurotus pulmonarius</i> (Fr.:Fr.) Quéf	+			+				+								
Tricholomataceae																
<i>Flammulina velutipes</i> (Curt.:Fr.) P.Karst.	+	X	X	+						X						
<i>Oudemansiella mucida</i> (Schrad.:Fr.) v. Höhn.	X															
<i>Armillariella mellea</i> (Vahl.:Fr.) P.Karst.	+					X	X									X
<i>Hypsizygus marmoreus</i> (Peck) Bigel.				X												X
<i>Marasmius androsaceus</i> (L.:Fr.) Fr.			X											X		
Agaricaceae																
<i>Agaricus blazei</i> Murr.				X												
<i>Agaricus bisporus</i> (J.Lge) Imbach				+						X	X					
Pluteaceae																
<i>Volvariella volvacea</i> (Bull.:Fr.) Sing.				+	+	+		+								
Bolbitiaceae																
<i>Agrocybe aegerita</i> (Brit.) Sing.	+		+					+						+		


1.1.2. *Ganoderma* Mantarlarının Bulunuşu ve Taksonomisi

Ganoderma lucidum ve ilgili türleri, en az 4.000 yıldır, tedavi edici amaçlar için kullanılmaktadır (Zhao ve Zhang, 1994). Bu mantar Japonya’da Reishi veya Mannetake (10.000 yıl mantarı) olarak adlandırılır. Çin ve Kore’de ise, farklı olarak, Ling Chi, Ling Chih ve Ling Zhi (Ölümsüzlük Mantarı) olarak adlandırılmaktadır. *Ganoderma lucidum* eski Japon, Kore ve Çin sanatında en çok betimlenen mantardır ve daha çok Çin kraliyetine ait resimli örtülerde anlatılmıştır. Reishi, kötülüklerle karşı kişileri veya evleri korumak için büyülü güçlere sahip olduğu inanılan bir nesne olarak da kullanılmıştır (Anonim, 2006a).

Anavatanı Çin olan *Ganoderma lucidum* tedavi ve beslenme için yüksek değere sahiptir. İlk Çin endüstriyel ilaç üretimi çalışmalarında *Ganoderma lucidum*’un acı bir tadının olduğu ancak birçok gizemli etkiye sahip olduğu, vücudu yapılandırıcı, hastalıkları önlemek için organların fonksiyonlarını geliştirici ve yaşamı uzatmak için nadir bir güçlendirici olarak rol oynadığı gözlenmiştir (Anonim, 2006b). Bu mantarlar dünyanın birçok yerinde yetiştirilmekte ve yapay olarak da geliştirilmektedir, ancak bu yolla üretimin maliyeti oldukça yüksek olduğundan nadir olarak yapılmaktadır (Anonim, 2006a).

Ganoderma lucidum mantarına ait bazı özellikler Çizelge 1.2’de özetlenmiştir.

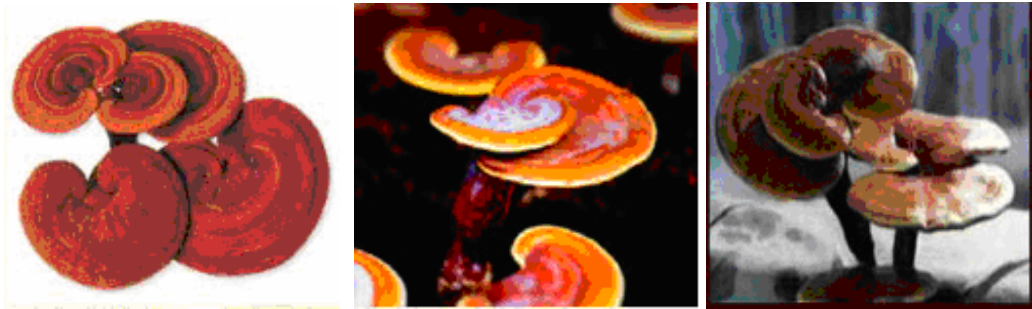
Çizelge 1.2. *Ganoderma lucidum*’a ait özellikler (Anonim, 2006c)

<i>Ganoderma lucidum</i> , (Curtis) P. Karst	Bilimsel sınıflandırma	
	Alem	: Fungi
	Filum	: Basidiomycota
	Sınıf	: Homobasidiomycetes
	Çeşit	: Polyporales
	Aile	: Ganodermataceae
	Cins	: <i>Ganoderma</i>
	Tür	: <i>G. Lucidum</i>

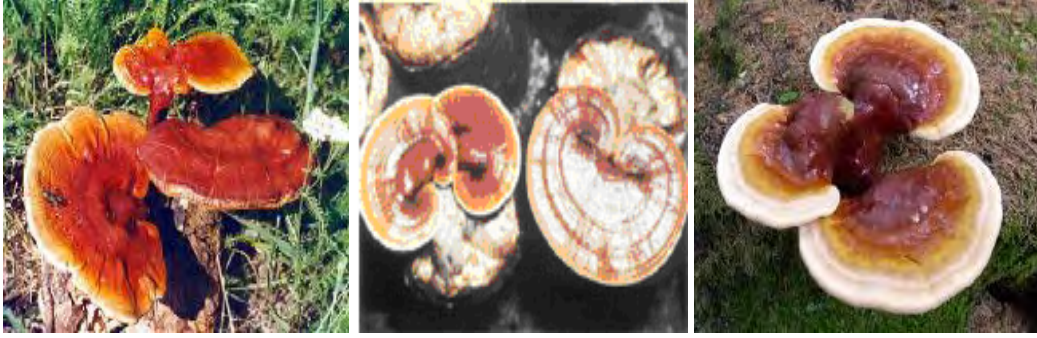
Ganoderma lucidum meşe ve diğer sert ağaçlar üzerinde yetişirken *G. tsugae* ve *G. oregonense* gibi diğer türleri esasen kozalaklı ağaçlar üzerinde yetişmektedir.

Bu tür yıllık mantarlar tipik olarak ölü ya da kuru ağaçlar üzerinde, kışın yapraklarını döken özellikle akçaağaç, karaağaç, söğüt, manolya, akasya ve Asya’da erik ağaçları üzerinde de yetişebilmektedir. *Ganoderma lucidum* ve *G. tsugae* kültürde yetiştirme sürecinde çevresel manipülasyonlara karşılık uzun saplar oluştururlar. *Ganoderma lucidum*’un hem sert ağaç talaşları hem de bazı kozalaklı ağaçlar üzerinde rahatlıkla gelişip meyve verebilmesi için, bu mantarların yetiştirilmesini sadece habitata bağlamamak gerekir. *G. oregonense* genellikle soğuk iklimleri tercih eder. *Ganoderma lucidum*’a ise daha çok sıcak bölgelerde rastlanır.

Bu mantarlar kahverengi renge sahip, böbrek şeklinde ve nemli olduklarında verniklenmiş görünümünde parlak bir yüzeye sahiptirler (Şekil 1.1 ve 1.2). Meyve kısımları geliştiğinde spor üreten alt tabaka, hymenium, beyaz ve gözeneklidir (Stamets, 2000). *G. curtisii* sarı renkli şapkaya sahip ve Amerika’nın kuzey doğusunda bulunan bir türdür (Zhao, 1989). Kuzey Amerika *Reishi*’lerinden *Ganoderma lucidum*, *G. curtisii*, *G.tsugae* ve *G. oregonense* büyük olasılıkla aynı soy kütüğünden gelmişlerdir. Onları ayrı birer tür olarak sınıflandırmak için biyolojik olarak bir ayırım yapmak yerine ekolojik ve özel konukçu durumları dikkate alınmıştır. *Ganoderma lucidum*’un kültürde eşeysiz üremesi, buna karşılık *G. tsugae*’nin ürememesi az sayıda olan kültürel farklılıklarına bir örnektir (Stamets, 2000).



Şekil 1.1. *Ganoderma lucidum*’un meyve kısmı (Anonim, 2006d)



Şekil 1.2. Doğada yetişen ve kültür *Ganoderma lucidum* (Reishi) mantarı (Anonim, 2006d)

Ganoderma türlerinin ayırt edilebilmelerinde geleneksel taksonomi yöntemleri yeterli olamamıştır. Ancak nükleotid dizilerinin incelenmesiyle onları sınıflandırmak için daha somut sonuçlara ulaşılmıştır. Hseu ve ark. (1996) *Ganodermataceae*'nin kırk beş değişik cins (genus), alt cins (sub-genus), bölümler (sections) ve türleri (species) üzerindeki çalışmaları sonucunda nükleotid dizilerini inceleyerek rDNA'nın ITS1 ve ITS2 ile D2'nin LSU-D2 alt birim genleri arasında filogenetik karakter oluşumlarını göstermişlerdir. Alt taksonomik düzeylerde ITS verileri faydalı olurken, üst düzeylerde LSU verilerinin daha yararlı olduğu görülmüştür. Nükleotid dizin verileri sonucunda *Ganoderma* ve *Amauroderma*'nın kesinlikle ayrı cinslere ait oldukları saptanırken, alt cins *Elfvigina*'nın monofiletik olduğu, *Characoderma* ve *Phaeonema* bölümlerinin ise monofiletik olmadığı görülmüştür (Moncalvo ve ark., 1995a). Moncalvo ve ark. (1995b) araştırmalarında sub-tropik ve ılımlı iklim bölgelerinden temin edilen yirmi dokuz *Ganoderma lucidum* şuşlarının ITS1, ITS2 ve LSU-D2 nükleotid dizin verilerini parsimoni analizine tabi tutmuşlar ve sonuçları hem morfolojik hem ekolojik hem de kültürel bazda değerlendirmişlerdir. Filogenetik olarak ilişkilendirilen izolatlar benzer kültür özellikleri göstermiştir. Fakat elde edilen bu veriler daha uzak taksonomiye sahip izolatlarda da bulunabilmektedir. Bundan ötürü son zamanların uzak taksonomi sınıflamaları arasında, morfolojik özellikler kültür özelliklerine göre daha yüksek polimorfik niteliktedir. Ancak bu kültür özellikleri monofiletik grupların belirlenmesinde faydalı olmamaktadır. Bu sonuçlara göre monofili bazında yeni bir tür tanımlaması yapılmış ve bu genetik izolasyon için gizil bir gelişme olarak ortaya

konulmuştur. Buna göre de *Ganoderma lucidum* kompleksinin taksonomisi yeniden gözden geçirilmiştir. Poliporların taksonomisi üzerine yazılmış en kapsamlı çalışmalar Gilbertson ve Ryvarden (1986) ve Zhao (1989)'ya aittir.

Ganoderma lucidum mantarını yetiştirmede önemli olan bazı parametreler Çizelge 1.3'de verilmiştir. Bu parametreler ve gerekli hijyenin de sağlanması durumunda 90–120 gün aralığında her bir poşetten en az iki ürün elde edilmektedir.

Çizelge 1.3. *Ganoderma lucidum* mantarını yetiştirmede önemli bazı parametreler (Stamets, 2000)

	Spawn Çalışması	Boynuz (Primodyum) Oluşumu	Genç Conk (Primodyum) Oluşumu	Meyve (Fruitbody) Gelişimi
Sıcaklık	21-27°C	18-24°C	21-27°C	21-27°C
Bağıl Nem	% 95–100	%9 5–100	% 95–100	% 90–95
Süre	10–20 gün	14–28 gün	14–28 gün	60 gün
CO₂ Miktarı (ppm)	50,000 ppm	20,000–40,000 ppm	5,000–2000 ppm	< 2,000 ppm
Temiz Hava Değişimi	0–1 saat başı	0–1 saat başı	Gerektikçe	Gerektikçe
Işık Gereksinimi	n/a	200–500 lux', 4–8 saat	500–1000 lux', 12 saat açıp/kapama	750–1500 lux, 12 saat açıp/kapama

Yüzyıllardır Çinliler ve Japonlar tarafından kullanılan *Ganoderma lucidum* mantarı yapısında başlıca steroidleri, laktonları, alkaloidleri, polisakkaritleri ve triterpenleri içermektedir. Farmokolojik olarak, suda çözünebilen polisakkaritlerinin birçoğu anti-tümör ve bağışıklığı uyarıcı (immunostimulating) etkiler göstermektedir. En az 100 farklı alkolde çözünen triterpenlerin ganoderik, ganoderenik, lusidenik ve ganolusidik gibi oldukça oksitlenmiş lanostane-türü triterpenoitleri içerdiği saptanmıştır. Bu triterpenoitlerin anti-alerjik özelliklerle birlikte yüksek kan basıncını azaltıcı özelliklere de sahip olduğu gösterilmiştir (Anonim, 2006a). Bu mantar yetiştirme evresine ve çevresine bağlı olarak birçok farklı tedavi edici özelliklere sahiptir (Jong ve Birmingham, 1992; Liu, 1999). Geleneksel

olarak, *Ganoderma lucidum* kronik hepatit, nefrit, hipertansiyon, eklem iltihabı, sinir zayıflaması, uykusuzluk, bronşit, astım ve gastrik ülser gibi hastalıkların tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bilimsel çalışmalar, mantardan ekstrakte edilmiş ürünlerin kan basıncı, kandaki kolesterol ve kan şekeri seviyelerini azaltabildiğini doğrulamaktadır (Hobbs, 1995). Buna karşılık, *Ganoderma lucidum* mantarının burun ve boğaz kuruluğu, bulantı, kusma, kaşıntı ve diğer septomlarını içeren yan etkilerinin bulunduğu da ifade edilmiştir (Anonim, 2006e).

Etkili bağışıklık düzenleyici etkiye sahip polisakkaritler, proteinler ve triterpenoitler gibi birkaç temel biyokimyasal, *Ganoderma lucidum* spp.'den izole edilmektedir (Anonim, 2006a). Anti-kanser ve iltihap önleyici ajan olarak *Ganoderma lucidum*'un etkisi onun bağışıklık düzenleyici özelliklerini akla getirmektedir (Wang ve ark., 1997). Bu mantarlar kullanılarak yapılan geleneksel tıp tedavilerinin büyük çoğunluğu hala tam olarak modern bilimsel standartlar tarafından ispat edilemezken, Uzak Doğu ve ABD'de kapsamlı olarak incelenmektedir (Chang, 1995; Chen ve Miles, 1996). *Ganoderma lucidum* acı tadı ve sindirilemeyen yapısından dolayı yenilebilir bir mantar değildir, ama sıcak suda ekstrakte edilmiş formda, tablet ve sıvı ürünler halinde dünya çapında elde edilebilmektedir (Stamets, 1999).

1.1.3. *Ganoderma lucidum* Mantarının Bileşenleri

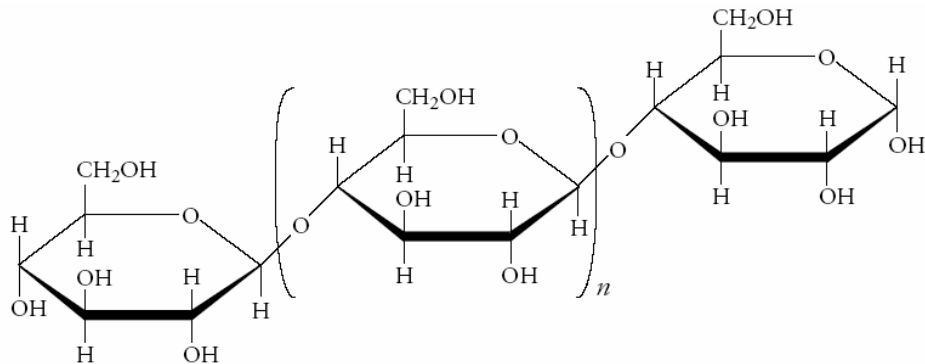
Ganoderma lucidum taze iken yumuşak, mantarimsı ve yassı, verniklenmiş görünümünde kırmızı şapkallı ve alt kısmında donuk kahverengi-beyaz gözenekleri olan çok gözenekli bir mantardır. Diğer mantarların aksine, alt taraflarında solungaçlara sahip değildir ve gözenekler içinden sporlarını serbest bırakır; bu nedenle bu mantar için polipor terimi kullanılmaktadır.

Ganoderma lucidum, steroid hormonlarına benzer bir moleküler yapıya sahip, ganoderik asitler olarak bilinen bir grup triterpenoidi içerir. Tıbbi bitkiler arasında birçok aktif polisakkarite (uzun zincirli şekerler) de sahiptir (Anonim, 2006f). Temel olarak organik germanyum (Ge) içerir (Anonim, 2006b). Bunların yanı sıra içeriğinde; steroller (ergosterol), lipitler (doymamış yağ asitleri), alkaloidler, komarin, mannitol, laktonlar, uçucu yağlar, proteinler ve diğer bileşenler (riboflavin,

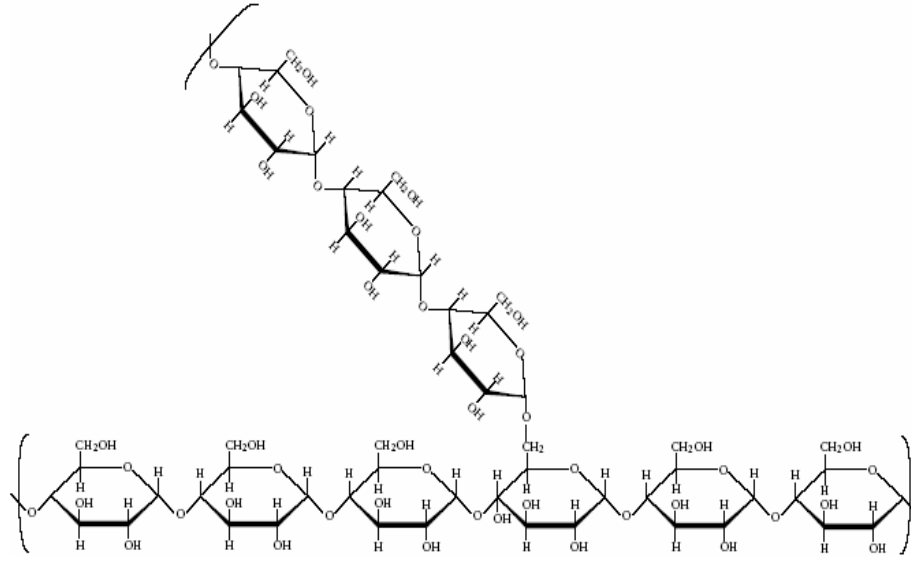
askorbik asit, amino asitlerin tüm türleri (Anonim, 2006g) ve K, Fe, Mg, Mn, Zn, Ca, Be, Cu, Ag, Al, Na bulunmaktadır (Anonim, 2006b).

1.1.3.1. Polisakkaritler

Polisakkaritler, fizikokimyasal özelliklerin geniş bir dağılımına sahip biyolojik makromoleküllerin yapısal olarak farklı bir sınıfını oluşturmaktadır. Oluştukları temel monosakkarit bileşenlerine, sıralamalarına ve aralarındaki bağlara, bağların anomerik konfigürasyonuna, halka büyüklüğüne (furanoz veya piranoz), mutlak konfigürasyona (D- veya L-) ve herhangi bir süstitüentin mevcudiyetine göre sınıflandırılırlar. Zincir konformasyonu gibi tam yapısal özellikler ve molekül dışı etkileşimler polisakkaritlerin fizikokimyasal özelliklerini etkileyebilmektedir. Bir polisakkaritte atomların en kararlı düzenlemesi hem molekül içi hem de molekül dışı güçlerden etkilenmektedir. Düzenli olarak sıralanmış polisakkaritlerde, çoğunlukla, glukozidik bağlar etrafında şeker birimlerinin serbestçe dönme hareketinden doğan etkin sterik engellerden dolayı bulunabilecekleri konformasyon sayıları sınırlıdır. Bu konformasyonlar ve bağlanma türleri arasında da karşılıklı sıkı bir ilişki vardır. Selüloz ve ksilan (xylan) gibi yapısal nişasta olmayan polisakkaritler uzunlamasına konformasyonu destekleyen yönlendirmeleri tercih ederler (Şekil 1.3). Amilopektin gibi depo polisakkaritler ise geniş, helikal konformasyonlarda bulunma eğilimindedir (Şekil 1.4).



Şekil 1.3. Selüloz (β -(1 \rightarrow 4)-glukozidik bağ ile bağlı D-glukoz üniteleri)



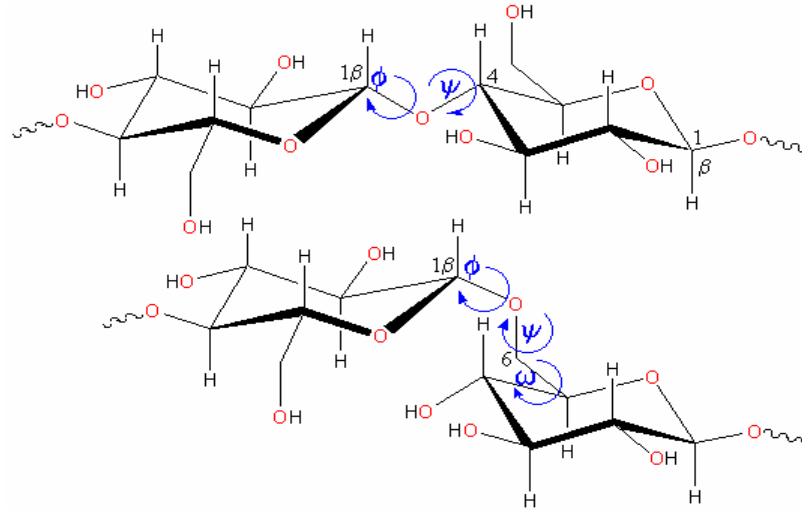
Şekil 1.4. Amilopektin (α -(1 \rightarrow 6)-glukozidik bağ ile bağlı D-glukoz üniteleri)

Polisakkarit zincirinin esneklik derecesi ve düzenliliği, fermantasyonlarının boyutunu ve oranını etkileyebilir. Arabinoz ve ksiloz gibi pentoz şekerleri, iki spesifik konformasyondan birini tercih eder. Bunlardan arabinoz, furanoz halkalarını oluşturur ve daha esnek bir yapıya sahiptir. Ksiloz ve glukozun oluşturduğu piranoz halkaları ise daha az esnektir. Özellikle fazla sayıda hidroksil grubu içeren karbonhidratların hidrofilik oldukları düşünülür. Ama monomerlerinin halka konformasyonları, epimerik yapı ve glukozidik bağlanmanın stereokimyasına bağlı olarak bazı polisakkaritlerde apolar yüzeylerin oluşumu da gerçekleşebilir. Örneğin, çözelti içerisinde, dekstrin, α -(1 \rightarrow 4) bağlı glukanlar apolar yüzeyler oluştururken, dekstranlar, α -(1 \rightarrow 6) bağlı glukanlar ile selüloz ve β -(1 \rightarrow 4) bağlı glukanlar çok daha az hidrofobik yüzeyler oluştururlar ve apolar bir yüzeyi korumak için yetersizdirler. Polisakkaritlerin hidrasyonunda, özellikle molekül içi hidrojen bağlarının miktarı da hidrofobikliği etkileyen faktörlerdendir.

Polisakkaritler fazla sayıda molekül içi hidrojen bağlarına sahip ise daha hidrofobik karakterdedir ve bu formda su ile daha az etkileşime girecektir. Eğer karbonhidratlar moleküldeki diğer hidroksil gruplarıyla etkileşmiyorsa, bu karbonhidratlar iki su molekülünün her biri ile tercihli olarak etkileşen hidroksil (alkol) gruplarını içerirler. Aynı ya da komşu moleküller üzerindeki hidroksil grupları ile etkileşim ister istemez polisakkaritlerin hidrasyonunu azaltır. Mannoz

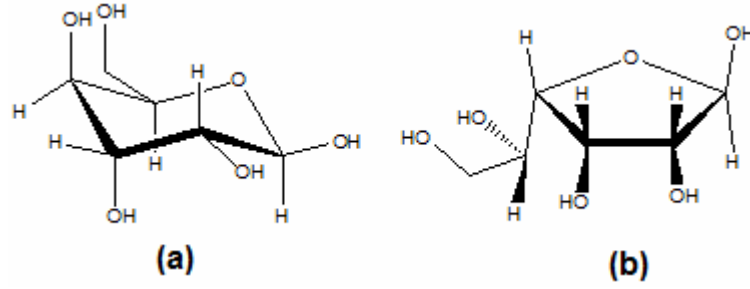
veya glukoz homopolimerlerindeki 3- ve 4- pozisyonundaki β -bağlar güçlü, esnek olmayan molekül içi hidrojen bağlarının oluşumuna imkan verir. Bu nedenle, polimerin hidrasyonu azalır ve yapısal olarak esnek olmayan (bükülmeyen) polisakkaritler oluşur. Bunların aksine, mannoz veya glukoz homopolimerlerindeki 2-, 3- ve 4- pozisyonundaki α -bağlar hidrasyonun daha fazla olmasını ve daha esnek bağlantıların oluşumunu sağlar.

Şeker artığı sıklıkla 4C_1 sandalye konformasyonu olarak adlandırılan spesifik bir konformasyona sahiptir. Şekil 1.3’de halka oksijeninin arkada bulunduğu sağ taraftaki yapıda 4 numaralı karbon yukarıda, bir numaralı karbon ise aşağıda yer alır.



Şekil 1.5. Şeker moleküllerinin 4C_1 sandalye konformasyonunda anomerik bağ etrafında dönme açılarının iki değişik bağlantıda β -(1→4) ve β -(1→6) gösterilmesi

Burada anomerik bağ etrafındaki dönme açıları iki değişik bağlantı ile, β -(1→4) ve β -(1→6), görülmektedir. Metil hidroksil grubu ile β -(1→6) bağı yapan yapı, “ ω ” açısı ile bir fazla serbestlik derecesine sahip olduğu için, daha esnek bir yapıya sahiptir. Polisakkarit zincirinin esnekliği (anomerik bağlar etrafındaki dönme kolaylığı) molekül içi hidrojen bağlarının varlığı ile de doğrudan ilgilidir. Bu bağlamda furanoz halkaları piranoz halkalarından daha esnek bir yapıya sahiptir ve bir su molekülü ile etkileşime girme olasılığı daha azdır.



Şekil 1.6. β -D-glukozun (a) piranoz ve (b) furanoz formu

Ayrıca dönme, yapının enerjisini de değiştirir. Konformasyondaki böyle farklılıklar viskozite üzerinde etkilere de yol açabilir (Anonim, 2006h).

Sulu çözeltilerdeki etkileşimler moleküllerarası hidrojen bağlarını bozarak tercih edilen konformasyonu belirleyebilir. Bununla beraber moleküllerin su ile etkileşim düzeyi prosesin sıcaklık ve basıncı, dolayısıyla su moleküllerinin polaritesi, hidronyum ve hidroksil iyonlarının derişimi gibi etkenler polisakkarit molekülü ile hidrojen bağı yapabilme etkinliğini belirleyerek, mevcut proses koşullarında polisakkarit moleküllerinin yeni konformasyonlarının oluşmasına neden olacaktır (Kirscher ve Woods, 2001).

(i) Polisakkaritlerin Hidrolizi

Polisakkaritlerin, özellikle selülozun hidroliz yoluyla esas ürün olarak glukozu dönüştürülmesi ve glukozdan da fermantasyon yolu ile etil alkol elde edilmesi konusuna ilgi tarihsel olarak 1940'lara kadar uzanır (Dunning, 1945). Asit katalizörlüğünde hidroliz çalışmalarından (Thomson ve Grethlein, 1979; Church ve Wooldridge, 1981; Mok ve ark., 1992) sonra asit eklenmeden subkritik ve süperkritik su ile çalışmalar öne çıkmıştır (Bonn ve ark., 1983; Townsend ve ark., 1988; Klein ve ark., 1990; Adshiri ve ark., 1993; Bobleter, 1994; Sakaki ve ark., 1996; Sasaki ve ark., 1998; Sasaki ve ark., 2000; Ehara ve Saka, 2002). Son bir çalışma karbondioksit varlığında karbonik asitin katalitik etkisi ile daha ılımlı koşullarda (200°C) nişasta ve bazı diğer polisakkaritlerin etkin olarak hidroliz edilebileceğini göstermiştir (Miyazawa ve Funazukuri, 2005).

Sakaki ve ark. (1996) selülozdan 355°C sıcaklıkta 15 saniye sürede diğer oligomer ürünlerin yanı sıra %40'lara varan glukoz oluşumunu bildirmişlerdir.

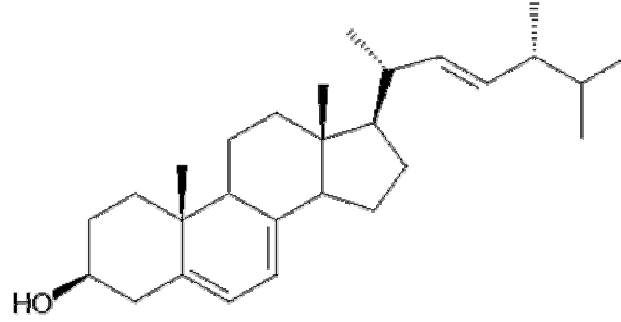
Ancak prosesin devamında gaz ürünlere ve metanolde çözünen bozunma ürünlerine dönüşüm artarken karbonize (char) ürünler de gözlenmiştir. Sasaki ve arkadaşları (2000) ise selülozun 25 MPa basınçta ve çeşitli subkritik ve süperkritik koşullarda dönüşümünü ayrıntılı bir şekilde inceleyerek 350°C ve üzerindeki sıcaklıklarda selülozun hızla (0,05–10,0 sn) glukoza kadar hidroliz olduğu, ancak 320–350°C sıcaklık aralığında hidroliz hızının düştüğü, buna karşılık glukoz ve diğerlerinin bozunma tepkimelerinin ağır bastığını göstermişlerdir. Ehara ve Saka (2002) da selülozu batch- ve flow-tipli reaktörlerde süperkritik su ile etkileştirdiğinde Sasaki ve ark. (2000) sonuçlarına uyumlu gözlemlerde bulunmuşlardır.

1.1.3.2. Steroller

Çeşitli steroller doğal olarak bitkilerden elde edilebilirler. Kimyasal olarak bu steroller hayvanlardan elde edilen kolesterole benzer. Steroller üç birleşik sikloheksan halkasını içerir; yapıdaki yan zincirler de sterollerini farklılaştırır (Anonim, 2006ı).

(i) Ergosterol

Pro-vitamin D₂ olarak da adlandırılan ergosterol, sabunlaşmayan bir lipittir. Maya ve diğer funguslarda bulunur. Suda çözünmezken organik çözücülerde çözünebilen beyaz, berrak bir bileşiktir. Ergosterol, ultraviyole ışık veya elektron bombardımanı ile ergokalsiferole (D₂ vitamini) dönüşür. D vitamini, ya iki tane yağda çözünen sterol benzeri bileşik veya hem ergokalsiferol (D₂ vitamini) hem de aktifleştirilmiş kolkalsiferol (D₃ vitamini)'den ibarettir. D₂ ve D₃ vitaminleri tüm memelilerde yaklaşık eşit etkinliğe sahiptir. D vitamini eksikliği çocuklarda raşitizm, yetişkinlerde ise kemik erimesi ile sonuçlanır (Anonim, 2006ı).



Şekil 1.7. Ergosterol (ergosta-5,7,22-trien-3β-ol) (Anonim, 2006i)

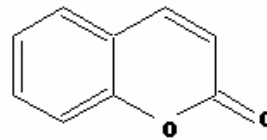
1.1.3.3. Alkoloidler

Alkoloidler, insanlar ve hayvanlar üzerinde farmakolojik etkiye sahip azotlu organik bileşiklerdir. Genellikle amino asitlerin türevleridirler. Birçoğu çok acı bir tada sahiptir. Bitkilerde (patates ve domates), hayvanlarda (özellikle suda yaşayan kabuklu hayvanlarda) ve mantarlarda ikincil metabolitler olarak bulunurlar. Bu maddeler asitlerle (genellikle HCl ve H₂SO₄; bazen maleik ve sitrik asit) muamele edilerek ekstrakte edilirler.

Sitrokinin (strychnine) veya konin (coniine) gibi birçok alkaloid zehirliken, bazıları analjezik (ağrı hafifletici) veya anestetik, özellikle morfin ve kodein olarak ilaçlarda kullanılırlar. Sentetik olarak da üretilirler (Anonim, 2006j).

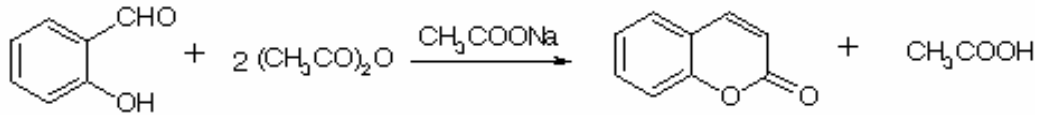
1.1.3.4. Komarin

Komarin, birçok bitkide yüksek konsantrasyonlarda bulunan kimyasal bir bileşiktir. Yeni biçilmiş saman kokusuna benzer, kolaylıkla tanınabilen hoş bir kokuya sahiptir. Birkaç pıhtılaşma önleyici (anti-coagulant) için öncü maddesi (precursor) olarak klinik değere sahiptir.



Şekil 1.8. Komarin (1,2-Benzopyrone), (Anonim, 2006k)

Bitkilerdeki komarinin biyosentezi hidroksilasyon, glukoliz ve sinamik asitin halkalaşması yoluyla gerçekleşir. Komarin laboratuvar ortamında ise, salisilaldehit ve asetik anhidrit arasındaki Perkin reaksiyonu ile hazırlanabilir.

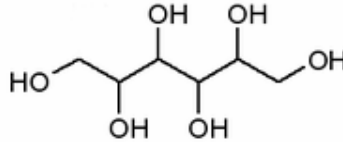


Şekil 1.9. Komarin eldesi, (Anonim, 2006k)

Komarin, karaciğer ve böbreklerde ılımlı olarak toksik etki gösterdiği için yirminci yüzyılın ortalarından bu yana pek çok ülkede gıda katkı maddesi olarak yasaklanmış olmasına rağmen bazı tütün ürünleri ile yapay vanilyada bulunmaktadır.

1.1.3.5. Mannitol

Mannitol veya heksan-1,2,3,4,5,6-heksol ($\text{C}_6\text{H}_8(\text{OH})_6$) bir sorbitol izomeridir.



Şekil 1.10. Mannitol, (Anonim, 2006l)

Kimyasal olarak, mannitol, bir alkol, şeker veya polioldür; ksilitol (xylitol) ve sorbitole benzerdir. Ama asidik sulu çözeltilerde bir hidrojen iyonunu kaybetme eğilimine sahiptir. Bu sebeple, pH'sını ayarlamak için sodyum bikarbonat gibi bir madde çözeltiliye eklenebilir.

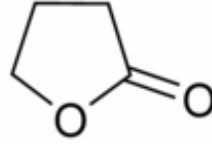
Mannitol, Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca diyabetli hastalar için tatlandırıcı olarak kullanılabilirdiği gibi, ısı düşürücü yeteneğe sahip olduğu için, “nefes tazeleyici” şekerlemelerde de tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. 20 g'dan daha fazla dozlarda müshil etkisi gösterir ve bazen çocuklar için bu amaçla satılmaktadır. Bazen eroin veya diğer kanunen yasak

uyuştırucular için düşük nitelikli katkı maddesi olarak da kullanılır. Son olarak, tropikal balık zehirlenmeleri felç benzeri belirtiler oluşturdukları için bu gibi durumlarda da mannitol uygulanabilir.

1.1.3.6. Lakton

Lakton, halkalı bir esterdir. Bir alkol ve bir karboksilik asit grubunun kondensasyon ürünüdür. Önekler halka büyüklüğünü gösterir: beta-lakton (4 üyeli), gama-lakton (5 üyeli), delta-lakton (6 üyeli halka) gibi.

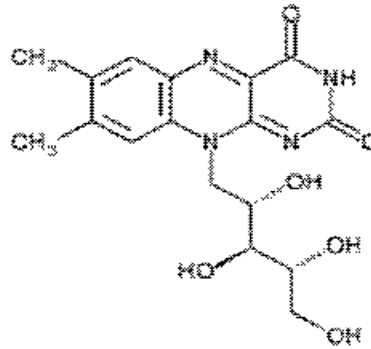
Laktonlara ilişkin bir yapı Şekil 1.11’de gösterilmektedir.



Şekil 1.11. gamma-Butyrolactone (GBL), (Anonim, 2006m)

1.1.3.7. Riboflavin

B₂ vitamini veya G vitamini olarak bilinen riboflavin kolaylıkla absorblanan, suda çözünen, insan sağlığını korumada anahtar role sahip bir maddedir (Şekil 1.12). Sarı veya turuncu-sarı renktedir ve gıda renklendiricisi olarak kullanımına ek olarak bazı gıda ürünlerini korumak için de kullanılır. Bebek gıdalarında, kahvaltılık tahıllarda, soslarda, işlenmiş peynirde, meyve suları ve vitamince zenginleştirilmiş süt ürünlerinde riboflavin bulunabilir.



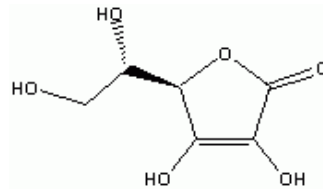
Şekil 1.12. Riboflavin (B₂ vitamini), (Anonim, 2006n)

Riboflavin, diğer B vitaminleri gibi, yağlar, karbonhidratlar ve proteinlerin metabolize olmasına yardım ederek enerji üretimini destekler. B₂ vitamini kırmızı kan hücrelerinin oluşumu, antikor üretimi, büyümeyi düzenleme ve üreme için de gereklidir. Tiroit aktivitesini düzenlemenin yanı sıra sağlıklı bir cilt, tırnaklar, saç uzaması ve genel sağlık için önemlidir. Riboflavin, katarakt gibi bazı göz rahatsızlıklarının tedavisi veya önlenmesinde de yardımcıdır. Kanlı, kaşınan, yanan ve ışığa karşı duyarlı gözleri iyileştirici etkisi vardır.

Süt, peynir, lifli yeşil sebzeler, karaciğer, maya, badem ve olgun soya fasulyesi B₂ vitamini kaynağıdır. Ama bu doğal kaynaklarda riboflavin ışığa maruz kaldığında bozunur. İnsan vücudu riboflavini depolayamadığı için eksikliğinin yaygın olduğu düşünülür.

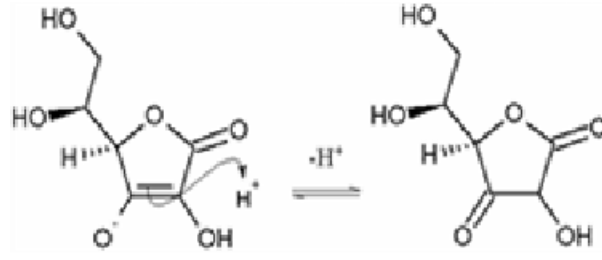
1.1.3.8. Askorbik Asit

Askorbik asit antioksidant özellikte bir organik asittir. Suda çözünür. L-enantiomeri C vitamini olarak bilinir.



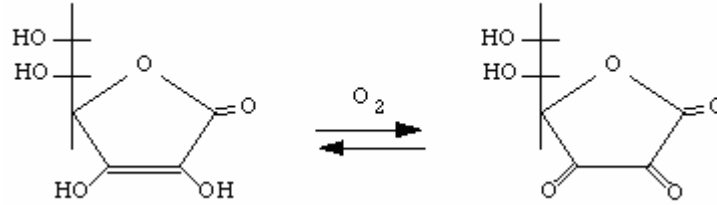
Şekil 1.13. Askorbik asit (C vitamini), L-3-ketothreoheksuronik asit (Anonim, 2006o)

Askorbik asitin yapısında altta bulunan çift bağ yakınındaki hidroksil grupları enoldür. Askorbik asit enol formunda en kararlı halde olmasına rağmen, hızlı bir şekilde proton transfer ederek iki kararsız diketon tautomerine dönüşür. Enolün protonu kaybolur ve bir diketon oluşturmak için çift bağdan elektronlar alınır. Bu enol reaksiyon ürünlerinin 1,2-diketon ve 1,3-diketon olmak üzere iki olası şekli vardır (Şekil 1.14)



Şekil 1.14. 1,3-diketon vermek için proton üzerine askorbik enolün atağı (Anonim, 2006ö)

C vitamini ısı ve ışığa karşı duyarlıdır ve atmosferdeki oksijenle reaksiyona girerek kolaylıkla oksitlenebilir (Şekil 1.15).



Şekil 1.15. C vitamininin oksidasyon prosesi (Anonim, 2006p)

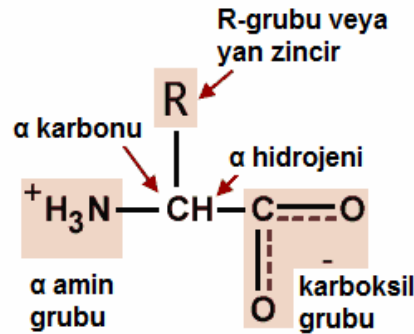
Askorbik asit doğada birçok farklı besinde ve bazı hayvanlarda bulunur. Ancak insanlar askorbik asiti vücutta kendi kendilerine sentezleyemedikleri için dışarıdan bir kaynakla onu almak zorundadırlar. Özellikle turuncgiller ve kuşburnu gibi bazı bitkiler askorbik asit bakımından oldukça zengindirler.

C vitamini, vücutta kan damarlarının büyük bir kısmı, kemikler, eklemler, dişler, dişetleri ve bütün bağlayıcı dokularda olan kollojenin sentezinin önemli bir kısmını oluşturur. Aynı zamanda insan vücudunun birincil suda çözünen antioksidanıdır. Yaraların ve kırık kemiklerin iyileşmesinde çok önemlidir. Kemik iliğinde hemoglobin ve kırmızı kan hücrelerinin üretiminde de rol oynar. Sinir iletiminin önemli bir kısmında rol oynadığı için beyinde de çok miktarda bulunur. C vitamininin fazla dozları her gün alındığında astım belirtilerini azaltabilir. Kalp krizlerini ve çarpıntılarını önleyici etkiye de sahiptir (Anonim, 2006r).

1.1.3.9. Amino Asitler

Amino asitler hem proteinleri oluşturmada hem de metabolizma içerisinde ara ürünler olarak önemli rol oynarlar. Belirli bir proteinin tam amino asit içeriği ve bu amino asitlerin sırası, bu proteinin kodlandığı gen içindeki bazların sırası ile belirlenir. Proteini oluşturan amino asitlerin kimyasal özellikleri o proteinin biyolojik aktivitesini de belirler. Yağ ve nişastanın aksine, insan vücudu amino asitleri depolayamaz. Bu nedenle, amino asitler her gün gıdalarla alınmak zorundadır. Alanin, asparagin, aspartik asit, sistein, glutamik asit, glutamin, glisin, prolin, serin ve trosin vücudumuzun üretebildiği amino asitlerdir.

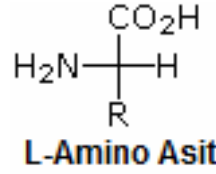
Biyolojik olarak önemli amino asitler $-COOH$ grubunun yanındaki karbon atomuna bağlı bir amin grubuna sahiptirler. Şekil 1.16'da da proteinlerde bulunan bütün amino asitlere ait temel yapı gösterilmektedir.



Şekil 1.16. Amino asitlerin yapısı (Anonim, 2006s)

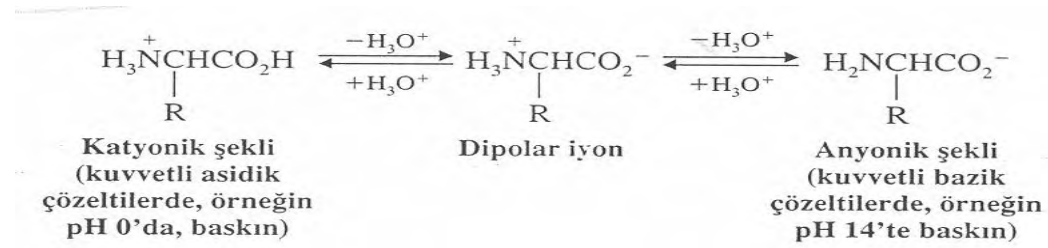
Amino asitler yüksek erime noktasına sahip kristal katılardır. Genel olarak suda çözünürken, hidrokarbonlar gibi apolar organik çözücülerde çözünmezler. Sudaki çözünürlük ‘‘R’’ grubunun yapısına ve boyutuna bağlı olarak değişir.

Aynı karbon atomu etrafında dört farklı grup olduğu için amino asitler (glisin hariç) kiral moleküllerdir. Kiral amino asitlerin konfigürasyonları, Fischer projeksiyon formülleri yazıldığı zaman benzerlik gösterir ve bu ‘‘L-konfigürasyon’’ olarak tanımlanır (Şekil 1.17).



Şekil 1.17. Amino asitlerin L-konfigürasyonu, (Anonim, 2006ş)

Amino asitler hem asidik (-COOH) hem de bazik (-NH₂) fonksiyonel gruplar taşıdıkları için sulu çözeltilerde baskın moleküler türler olarak bulunurlar. Bir çözeltideki amino asidin baskın şekli, çözeltinin pH 'sına ve amino asidin karakterine bağlıdır. Kuvvetli asidik çözeltilerde bütün amino asitler öncelikle katyonlar olarak, kuvvetli bazik çözeltilerde ise anyonlar olarak bulunurlar. Moleküllerin net bir yüke sahip olmadığı pH izoelektrik nokta (pI) olarak adlandırılır ve bu noktada pozitif ve negatif yüklü gruplar dengededir ve dipolar iyonun derişimi en fazladır (Şekil 1.18).



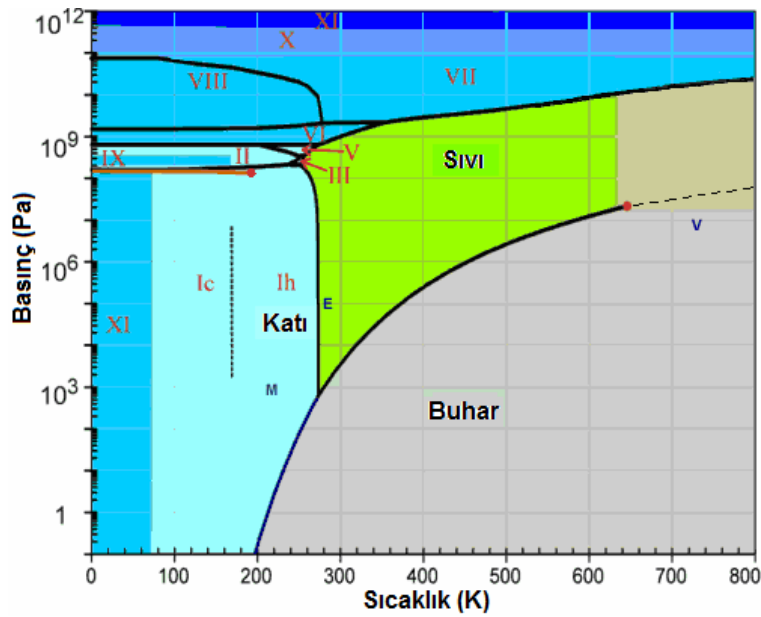
Şekil 1.18. Amino asitlerin kuvvetli asidik ve bazik çözeltilerdeki şekli, (Solomons, Fryhle, 2002)

Basit bir amino asit için izoelektrik nokta karboksil ve amin gruplarının pK_a'larının ortalamasıdır. Her amino asidin belirli bir izoelektrik noktası vardır.

1.1.4. Subkritik ve Süperkritik Suyun Özellikleri

Saf bir madde kendine özgü bir kritik sıcaklık değerine sahiptir. Bu sıcaklıkta bulunan maddenin buhar basıncı da kritik basınç olarak ifade edilir. Bir madde kritik sıcaklığının üzerinde bir sıcaklıkta, basınç ne kadar yüksek olursa olsun, sıvı fazda bulunamaz. Bu faza süperkritik faz adı verilir. Süperkritik fazda maddenin kritik koşullardaki viskozitesi ve yoğunluğu, gaz ve sıvı faz değerleri arasında olmakla birlikte, viskozitesi sıvı halinden on kat daha düşük; buna karşılık difüzyon hızı sıvınınınin on katı kadar daha büyüktür. Şekil 1.19 suyun faz diyagramını

göstermektedir. Su, diğer tüm moleküler maddelere göre oldukça farklı fiziksel özelliklere sahiptir ve dolayısıyla faz diyagramı da diğer maddelerle karşılaştırıldığında oldukça karmaşıktır. Bunun temel nedeni su molekülleri arasında meydana gelen kuvvetli hidrojen bağlarıdır. Sıcaklık ve basınç koşullarının değişmesine bağlı olarak hidrojen bağlarının nitelik ve niceliğindeki değişimler, suyun yoğunluğu, dielektrik sabiti, iyon çarpımı gibi değerlerinde önemli değişikliklere yol açacaktır.

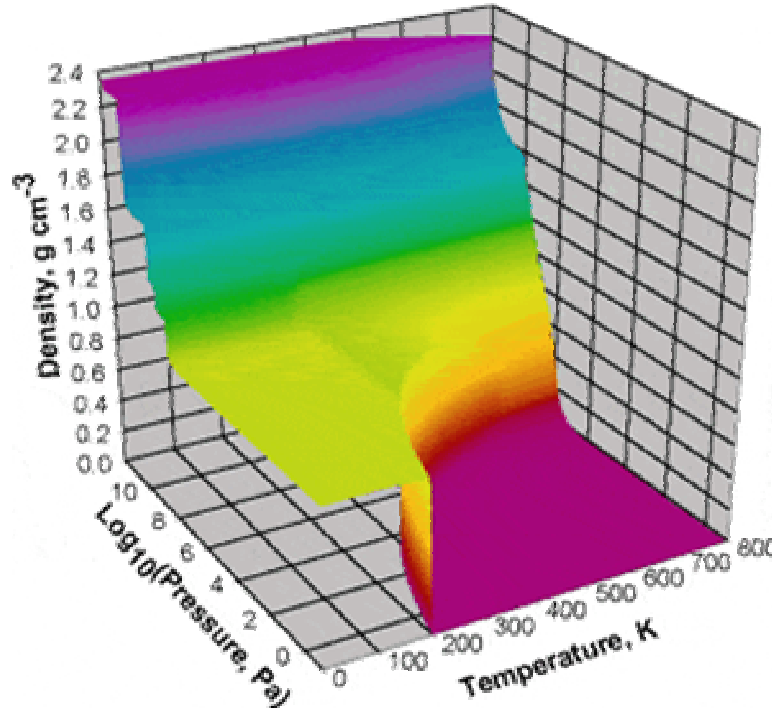


Şekil 1.19. Suyun faz diyagramı (Glasser, 2004)

Şekil 1.19’da mavi renkli bölge katı hali, yeşil sıvı hali ve gri ise buhar (gaz) halini göstermekte, 374,15°C (647,15 K) sıcaklık ve 217,76 atm (22064 kPa) basınç olarak belirlenen kritik noktanın üzerinde ise bej rengi süperkritik fazı göstermektedir. Ancak kritik sıcaklığın üzerinde, basınç 1010 kPa’ın üstündeki değerlere çıktığında süperkritik faz bölgesinden çıkılıp, katı faz bölgesine girilmektedir. Bu durum su molekülleri arasındaki hidrojen bağlarından kaynaklanan özel bir durumdur. Ayrıca katı faz bölgesi incelendiğinde tam 12 adet farklı katı faz bölgesi görülmektedir. Ancak bu bölge konumuz dışında olduğu için ayrıntıya girilmeyecektir. Çalışmamızı ilgilendiren alanlar, süperkritik faz ile subkritik diye adlandırılan yüksek basınçlı sıvı faz bölgesidir. Farklı yayınlarda suyun subkritik faz bölgesine ilişkin sıcaklık ve

basınç sınır değerleri farklı olarak ele alınmaktadır. Ancak bizim çalışmamızda subkritik bölgede sıcaklık ve basınca ilişkin sınır değerler $t_b < t < t_c$ ve $P_c < P$ olarak alınacaktır (Ohtaki, 2003; Nakahara ve ark., 1997). Su için bu değerler $99,97^\circ\text{C} < t < 374,15^\circ\text{C}$ ve $217,76 \text{ atm} < P$ şeklinde olacaktır.

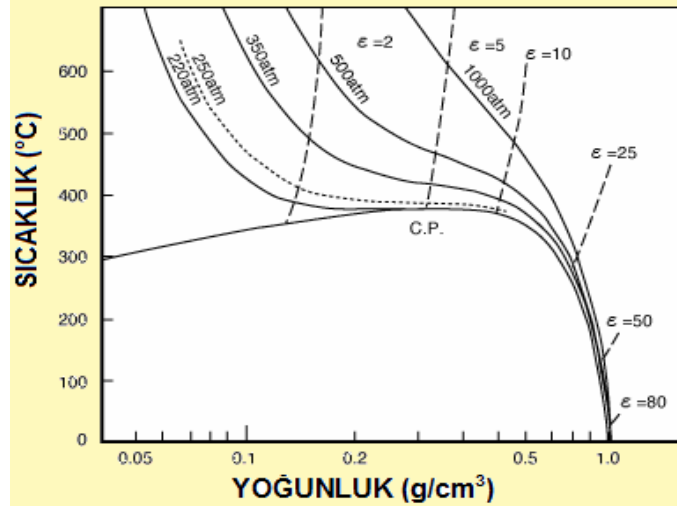
Suyun sıcaklık, buhar basıncı ve yoğunluk ilişkisi Şekil 1.20’de verilmiştir.



Şekil 1.20. Suyun sıcaklık, basınç ve yoğunluk ilişkisini gösteren üç boyutlu diyagramı (Wagner ve Pruss, 2002)

Süperkritik bölgede artık sıvı fazın varlığından söz edilmediği için, buhar basıncından bahsetmek de gerekli değildir. Kritik noktada yoğunluk $0,323 \text{ g cm}^{-3}$ ’dür ve bu değer normal çevre sıcaklığı koşullarındaki değer yaklaşık üçte biri kadardır.

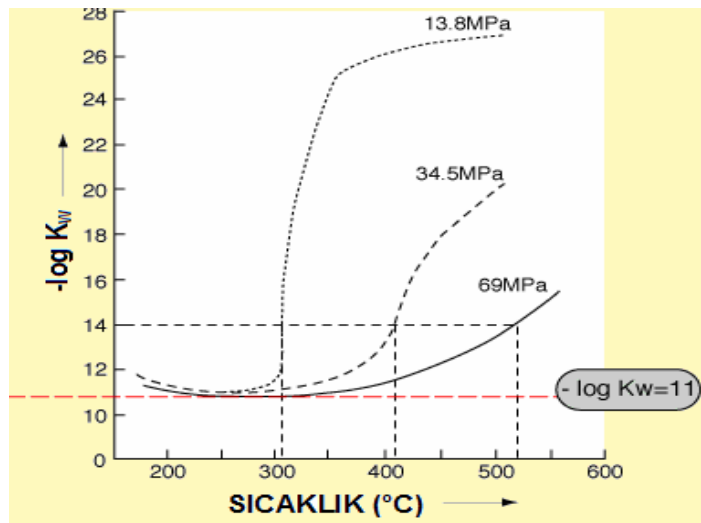
Subkritik ve süperkritik koşullarda su ile yapılacak ekstraksiyonlarda önemli bir parametre de dielektrik sabiti değeridir. Şekil 1.21’de suyun değişik sabit basınç değerlerinde sıcaklık ve yoğunluk değişkenleri ile dielektrik sabitinin (ϵ) ilişkisi görülmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi suyun normal koşullardaki bağıl ϵ değeri 80 civarında iken, süperkritik bölgede bu değer 2’ye doğru bir düşüş göstermektedir.



Şekil 1.21. Suyun dielektrik sabiti değerleri, (Glasser, 2004)

Tamamen apolar olan hekzan, heptan ve karbontetraklorür gibi organik çözücülerin bağıl ϵ değerleri 2 civarında olduğuna göre, süperkritik suyun da tamamen apolar nitelikli bir çözücü olduğu anlaşılmaktadır. Buna karşılık, uygun sıcaklık ve basınç parametrelerini ayarlayarak subkritik bölgede ve daha ılımlı sıcaklık ve basınç koşullarında orta ya da yüksek polarlıkta su çözeni ile polariteleri oldukça farklı bileşenleri bir katı matriksten seçici olarak ekstrakte etmek mümkün olacaktır.

Suyun iyon çarpım değerleri de sıcaklık ve basınçtaki değişikliklere bağlı olarak oldukça ilginç bir değişim göstermektedir (Şekil 1.22).



Şekil 1.22. Suyun iyon çarpımı sabiti (K_w) değerleri (Glasser, 2004)

Sıcaklığın 500°C'nin altında ve basıncın da 60 MPa veya üzerinde olduğu tüm durumlarda iyon çarpım değeri 1×10^{-14} den büyüktür. Basıncın 35 MPa civarında olması durumunda, 400°C'nin altındaki süperkritik ve subkritik bölgelerde de iyon çarpım değeri 1×10^{-14} den büyük olmaktadır. Sıcaklığın 200–300°C aralığında olan bölgede ise basınçtan epeyce bağımsız olarak iyon çarpım değerinin en yüksek değerlere ($\sim 10^{-11}$) vardığı görülmektedir. Bu bölgede hidronyum ve hidroksil iyon derişimleri oda sıcaklığı koşullarına göre yaklaşık 30 kat daha büyük değerlere sahiptir. Polisakkaritlerin su ile ekstraksiyonu sürecinde, ekstraksiyon koşullarına göre kısmen ya da tamamına yakınının hidroliz olma durumu söz konusudur. Hidronyum ve hidroksil iyon derişimlerinin göreceli olarak yüksek olması durumunda, hidroliz tepkimeleri de katalizlenerek ekstraksiyon sonucu elde edilecek polisakkaritlerin/oligosakkaritlerin ortalama mol kütlelerinde azalma, buna karşılık monosakkarit ve diğer çözüner ürün miktarında artış olacaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Son zamanlarda bazı doğal bitki ekstraktlarının düşük toksisiteye sahip olduğu ve anti-tümör etkisi gösterdiği gözlenmiştir. Fujimiya ve ark. (1999), *Agaricus blazei* Murill mantarından ekstrakte edilen düşük molekül kütleli ürünlerin, MethA tümör hücre gelişimi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Çalışmalarında, bu mantarın meyve kısımlarını %80'lik etanol ile ekstrakte ettikten sonra, çözünmeyen kısmı kaynamış su ile ve bunu takiben %5'lik amonyum okzalatla ısıtarak ekstrakte etmişler ve bu ekstraktları sonraki çalışmalarda kullanmak üzere kodlamışlardır. Kaba ekstraktlar ise 1 M HCl ile muamele edilerek farklı bir şekilde kodlanmıştır. Ekstraktlardan düşük moleküle kütleli yapıları ayırmak için, önce GPC kolon üzerinden 0,2 M NaCl yürütücü fazı ile 25 ml/dk akış hızında bir elüsyon yapılmıştır. Sonra sırasıyla su, 0,2 M ve 0,5 M NaCl çözeltileri ile DEAE-kolondan elüsyon ve ardından tekrar GPC kolonu ile düşük molekül kütleli (Low Molecule: LM) türlerin ayırımı sağlanmıştır. Kromatografik ve fizikokimyasal çalışmalar, ortalama molekül ağırlığı 20 kDa olan α -1,4-glukan- β -1,6-glukan kompleksini içeren düşük molekül fraksiyonu-3'ün (LM-3) temel anti-tümör aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir. Bütün LM fraksiyonları ve asitle muamele edilmiş kaba fraksiyon, normal hücreler üzerinde etkisi olmayan MethA tümör hücreleri için, laboratuvar çalışmalarında seçici sitotoksik etki göstermiştir. LM fraksiyonlarının, özellikle LM-3'ün, alındığı farelerde, bağışıklık bastırıcı asidik proteinin serum seviyesi, granulositlerin olası bir hareketlilik göstermesiyle önemli derecede artmıştır. Belirsiz bir tümörün inhibisyonunun, ilk tümör alanına ekstrakt enjeksiyonlarının etkisiyle, granulositlerin göçünü arttırdığı için, çoğalabileceği tahmin edilmiştir.

Bao ve ark. (2001a), *Ganoderma lucidum* sporlarından izole edilen (1 \rightarrow 3)- α -D-glukan'ın kimyasal modifikasyonlarını, fizikokimyasal özelliklerini ve immunolojik aktivitesini araştırmışlardır. Sübstitüsyon derecesinin değişimi ile (1 \rightarrow 3)- α -D-glukanın iyonik ve yüksüz altı farklı fonksiyonlaştırılmış türevi – aminopropillenmiş, hidroksietillenmiş, sülfatlanmış, karboksimetillenmiş, karboksimetillenmiş ve sülfatlanmış çift ve benzilamitlenmiş-karboksimetillenmiş türevleri – sentezlenmiştir. Tüm türevlerin yapısal ve fizikokimyasal özellikleri kimyasal ve spektral analizlerle araştırılmış ve lenfosit çoğalımı ve antikor üretimi

üzerindeki etkileri laboratuarda ve canlı üzerinde test edilmiştir. Genelde, bütün örneklerin yapısal ve fizikokimyasal özellikleri ve lenfosit çoğalım aktivitesi, fonksiyonel gruplar ve süstitüsyonun derecesi ile değişmiştir. İmmunolojik çalışmalar ise, bazı modifiye edilmiş türevlerin, lenfosit çoğalımı ve antikor üretimi üzerinde güçlü uyarıcı etkilere sahip olduğu ve bununla beraber, süstitüsyonun derecesi düşük tutulan ($SD < 0.28$) karboksimetil gruplarının girişinin immuno-uyarıcı aktivitenin gelişimi üzerinde en iyi etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

Bao ve ark. (2001b), *Ganoderma lucidum*'un sporlarından kompleks bir glukana ait yapısal özellikleri tanımlamaya ve fareler üzerinde yaptıkları çalışmalarla da bu glukana ait bağışıklık düzenleyici aktiviteyi belirlemeye çalışmışlardır. *Ganoderma lucidum*'dan sıcak su ekstraksiyonu ile elde edilen, HPSEC analizleri ile molekül ağırlığı $1,26 \times 10^5$ Da olarak belirlenen bir polisakkariti anyon değiştirici ve jel-geçirgenlik kromatografisi yöntemlerini kullanarak saflaştırmışlardır. Bu polisakkaritin, farelerde lenfosit artışına neden olan konkanavalin (ConA) veya lipopolisakkarit (LPS) ile antikor üretimini bastırmada güçlü bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Doğal polisakkaritin ve kısmi asit hidrolizi, Smith parçalaması ve asetilasyon ile elde edilen oligosakkarit kısımlarının yapıları, kimyasal olarak metilasyon analizleri ile birlikte, 1H , ^{13}C , 2D NMR ve ESI-MS spektroskopik çalışmaları ile aydınlatılmıştır. Parçalanmamış polisakkaritin (1→6)-bağlı ana zincire sahip kompleks bir β -D-glukan olduğu ve her bir glukozil artığının bu ana zincirde C-3 ve C-4'de süstitüe olmuş mono-, di- ve trisakkarit içerdiği sonucuna varmışlardır.

Bao ve ark. (2001c), *Ganoderma lucidum* sporlarından yola çıkarak temel bir polisakkaritin yapısını, oldukça dallanmış bir glukanın immunolojik etkilerini ve onun parçalanma ürünlerini aydınlatmaya çalışmışlardır. Bileşim ve metilasyon analizleri, periyodat oksidasyonu, Smith indirgemesi, 1H , ^{13}C ve 2D NMR ve ESI-MS deneyleri ile *Ganoderma lucidum*'un yapısında bulunan doğal polisakkaritler ve onun parçalanma ürünleri belirlenmiştir. Bu polisakkaritin ana zincirini β -(1→3)-D-glukopiranozil oluştururken, ana zincirde glukozilin altıncı karbonunda (C-6) süstitüe olmuş mono-, di- ve oligosakkarit yan zincirlerinin bulunduğu gösterilmiştir. HPSEC metodu ile bu doğal polisakkaritlerin ortalama moleküler

kütlesini $1,0 \times 10^4$ Da olarak hesaplamışlardır. Sulu çözeltideki konformasyon analizleri ve doğal ve parçalanmış glukanların immunolojik aktiviteleri de araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, ana zincir üzerindeki süstitüsyonun derecesi ve yan zincirlerin uzunluğunun, konformasyonun ve β -(1→3)-bağlı glukanların biyolojik aktivitelerinin belirlenmesinde çok önemli faktörler olabileceğini önermiştir.

Mau ve ark. (2001), Tayvan’ da ticari olarak kullanılan *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma tsugae* ve *Coriolus versicolor*’ı içeren üç tıbbi nitelikli mantar türünü kullanarak, yapılarında bulunan çözünebilir şekerler, serbest amino asitler ve 5^1 - nükleotidler gibi uçucu olmayan bileşenleri tanımlamaya çalışmışlardır. Çözünebilir şekerleri belirlemek için, kurutulmuş mantarlar %80’lik etanol ile ekstrakte edildikten sonra sırasıyla filtrasyon, buharlaştırma ve çözme işlemlerinden geçirilmiştir. Elde edilen sulu ekstrakt filtre edilip 2 ml/dk akış hızında asetonyril/su hareketli fazı ile RI dedektörlü bir HPLC sisteminde kantitatif olarak analiz edilmiştir. Serbest amino içeriğini belirlemede, kuru mantarlar uygun reaktiflerle muamele edildikten sonra geride kalan son çözelti floresans dedektörlü bir HPLC sisteminden ODS-2 kolonu ile 1,2 ml/dk akış hızında sodyum asetat/tetrahidrofuran/deiyonize su karışımı ile gradient olarak elüe edilmiş ve analiz sonuçları kantitatif olarak değerlendirilmiştir. 5^1 -nükleotidleri belirlemek için ise, kuru mantarlar su ile ekstrakte edilerek analiz için uygun forma getirildikten sonra UV dedektörlü HPLC sistemi ile 1 ml/dk akış hızında ODS-2 kolonundan 0,5 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ (pH: 4) hareketli fazı kullanılarak elüe edilmiştir. Bu analizlerin sonuçlarına göre, *Ganoderma* spp.’nin protein içeriğinin *C. versicolor*’a göre daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Karbonhidrat içerikleri bakımında *C. versicolor* (%66,09) ve *Ganoderma* spp. (%21,83–27,78) iki farklı seviye göstermiştir. *G. tsugae*’nin, normal ve boynuzlu *G. lucidum* ile *C. versicolor*’a göre daha fazla lif içeriğine sahip olduğu ifade edilmiştir. *Ganoderma* spp.’nin toplamda çözünebilir şeker miktarı *C. versicolor*’a göre daha küçük olduğu belirlenmiştir. Toplam serbest amino asit içeriği 4,25-14,04 mg/g aralığında elde edilmiştir. MSG (monosodyumglutamid) benzeri bileşenlerin içeriği 0,17–0,50 mg/g aralığında değişirken, şeker bileşimleri 0,28–1,38 mg/g aralığında değişiklik göstermiştir. Bu

mantarlarda acı bileşenlerin de baskın olarak mevcut olduğu belirtilmiştir. 5¹ – nükleotidlerin varlığı ise *C. versicolor* ve *G. lucidum*'da yüksek çıkmıştır.

Bao ve ark. (2002a), çalışmalarında *Ganoderma lucidum* mantarından immunolojik olarak aktif polisakkaritlerin yapısal niteliklerini belirlemişlerdir. Bu polisakkaritler, ikisi heteroglukan (PL-1 ve PL-4) ve bir glukan (PL-3), *Ganoderma lucidum*'un meyve kısmından ekstrakte edilmiş ve anyon değiştirici ve jel-filtrasyon kromatografisi ile ayrılmıştır. PL-1, PL-3 ve PL-4'ün molekül kütleleri HPSEC sisteminde Dekstran standartları ile oluşturan kalibrasyon eğrisine göre, sırasıyla, $8,3 \times 10^3$; $6,3 \times 10^4$ ve $2,0 \times 10^5$ olarak hesaplatılmıştır. Bu polisakkaritlere ait yapısal özellikler, glukozil artığı ve glukozil bağlı bileşim analizleri, kısmi asit hidrolizi, asetilleme, periyodat oksidasyonu, ¹H, ¹³C ve 2D NMR spektroskopisi, ESI-MS deneyleri ve GC-MS analizleri ile aydınlatılmıştır. Elde edilen veriler PL-1'in 1,4- α -D-glukopiranozil artığını içeren bir ana zincire, bununla birlikte glukoz artığının O-6'da ve terminal glukoz, 1,6-glukozil artığı ve terminal ramnozdan ibaret galaktoz artığının O-2'de dallanmış 1,6- β -D-galaktopiranozil artığına sahip olduğunu göstermiştir. PL-3, 1,6-glukozil kalıntısı ile O-6'da süstitüe olmuş 1,3- β -D-glukopiranozil artığından oluşmuş oldukça dallanmış bir glukandır. PL-4 ise, 1,3-, 1,4-, 1,6- β -D-glukopiranozil artığı ve 1,6- β -D-mannopiranozil kalıntısını içermektedir. Bu polisakkaritler değişik içeriklerde laboratuarda T- ve B-lenfosit çoğaltımını arttırmış ve PL-1 ise farelerde bağışıklık-uyarıcı aktivite göstermiştir.

Bao ve ark. (2002b), *Ganoderma lucidum* sporlarının sıcak su ekstraktının, T lenfositlerin mitojenik aktivitesini sağlayan konkanavalin A üzerinde uyarıcı bir etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. Etanol ile fraksiyonlama, anyon değiştirme ve boyut eleme kromatografisi ile güçlü T lenfosit-uyarıcı aktiviteye sahip bir polisakkaritin ayrılmasını sağlamışlardır. Bileşim ve metilasyon analizleri, periyodat oksidasyonu, Smith parçalaması ve NMR spektroskopisine dayanarak, bu doğal polisakkaritin dallanmış bir β -D-(1 \rightarrow 3)-glukan olduğunu göstermişlerdir. Dallanma oranının yaklaşık olarak %20 olduğunu belirlemişlerdir. Sülfatlanmış ve karboksimetillenmiş birkaç türev hazırlamış ve bunların yapısal özelliklerini de kimyasal ve spektral analizlerle aydınlatmışlardır. Türevlendirmeden önce ve sonra glukanların çözeltideki konformasyonu ve T lenfosit çoğalım etkisi karşılaştırılmış

ve tartışılmıştır. Elde edilen veriler, iyonik grupların girişinin hem sulu çözeltideki doğal glukanın orijinal konformasyonunu hem de T lenfosit-uyarıcı aktiviteyi önemli ölçüde etkilediğini göstermiştir. Glukanın üç boyutlu-heliks yapısının, iyonik grupların ve negatif yük yoğunluğunun bu aktiviteyle yakından ilgili olduğu düşünülmüştür.

Mau ve ark. (2002), yaptıkları çalışmada tıbbi olarak kullanılan *Ganoderma lucidum* (Ling-chih), *Ganoderma tsugae* (Sung-shan-ling-chih) ve *Coriolus versicolor* (Yun-chih) mantarlarının antioksidant özelliklerini araştırmışlardır. Bu üç tür mantar Taiwan'da ticari olarak kullanılmaktadır. Öncelikle bu mantarların metanol ekstraktları hazırlanmış ve ardından onların antioksidant özellikleri üzerinde çalışılmıştır. *G. lucidum*, *G. lucidum* boynuzu ve *G. tsugae* 0,6 mg/ml'de muhteşem bir antioksidant (%2,30–6.41 lipid peroksidasyonu) aktivite gösterirken, *C. versicolor* sadece %58,56 göstermiştir. 4 mg/ml'de indirgeyici güçleri *G. tsugae* (2,38) ~ *G. lucidum* boynuzu (2,28) > *G. lucidum* (1,62) > *C. versicolor* (0,79) sırasında bulunmuştur. Demir iyonu üzerindeki şelat oluşturucu etkileri *G. lucidum* boynuzu > *G. lucidum* > *G. tsugae* > *C. versicolor* sırasında tespit edilmiştir. Fenollerin, bu tür mantarların metanol ekstraktlarında bulunan ve doğal olarak elde edilen antioksidant bileşenler oldukları ifade edilmiştir. Sonuç olarak, *G. lucidum* ve *G. tsugae*'nin antioksidant aktivitesinin, indirgeyici gücünün, şelat oluşturma yeteneklerinin ve toplam fenol içeriğinin daha yüksek olduğu saptanmıştır.

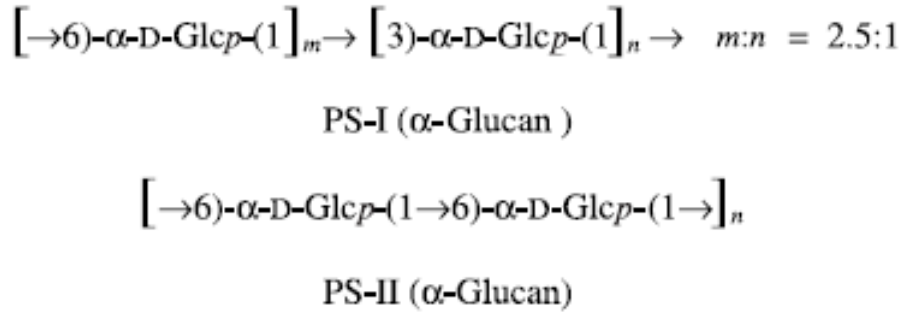
Di ve ark. (2003), çeşitli Lingzhi türlerinin meyve kısımlarından elde edilen karbonhidratların pik profilleri için, modern ekstraksiyon tekniklerini (basınçlı sıvı ekstraksiyonu) ve ileri planar kromatografik cihazları (HPTLC, oto-örnekleyici ve tarayıcı) kullanmanın avantajlarını araştırmış ve kanıtlamışlardır. Çalışmalarında geliştirilen analitik prosedürde öncelikle çeşitli Lingzhi örneklerinden ekstrakte edilen polisakkaritlerin asit ile hidrolizleri gerçekleştirilmiştir. Daha sonra mono- ve oligosakkaritler gibi parçalanma ürünlerinin bağıl miktarlarını gösteren pik profilleri, ayırma için HPTLC tabakaları (Si 50 000) kullanılmıştır. Aynı zamanda, basit ve daha kompleks şekerleri içeren Lingzhi'nin asit hidrolizatları, yüksek otomasyon derecesi ile eş zamanlı olarak ayrıştırılmıştır. Tam ya da kısmi asit hidrolizi koşulları altında oldukça değerli olan iki Lingzhi türü, *Ganoderma applanatum* ve *Ganoderma*

lucidum, arasındaki monosakkarit profillerinde tek pik gözlemlenmiştir. Ek olarak, karbonhidratların HPTLC pik profilleri Lingzhi'nin meyve kısımları ve sporlarının ekstraktlarından elde edilmiş ve karşılaştırılmıştır.

Ohtaki (2003), su ve formamidin yapısındaki hidrojen bağları üzerine sıcaklık ve basıncın etkilerini yüksek sıcaklık ve yüksek basınçlarda ölçülen XRD ve NMR verilerine göre ele almışlardır. Yüksek sıcaklık ve basınçlarda suyun yapısı üzerinde yapılan araştırmaya göre, yoğunluğun suyun yapısını tanımlamada tek bir parametre olabileceği önerilmiştir. Süperkritik su, en düşük yoğunlukta ($0,7 \text{ g/dm}^3$) bile hidrojen bağlarına sahiptir. Birbirine oldukça yakın komşu su moleküllerinin sayısı yüksek sıcaklık ve basınçta, $0,7 \text{ g/mol}^3$ yoğunlukta $4,4'$ den $1,7'$ ye düşerken, birbirine çok yakın su molekülleri arasındaki uzaklık $0,7-0,95 \text{ g/dm}^3$ geniş bir yoğunluk aralığında yaklaşık 292 pm 'de değişmeden kalmıştır. Aksine, lineer ve halkalı-dimer yapılarının karışımını içeren yapıdaki formamidde, hidrojen bağları sıcaklığın yükselmesi ile kırılmıştır. Ama basıncın artmasıyla lineerden çok halkalı dimer yapı daha fazla bir oluşum göstermiştir.

Chang ve ark. (2004), *Ganoderma lucidum*'un meyve kısmının sıcak su ile ekstraksiyonu sonucunda ayrılan polisakkarit bileşenlerinin moleküler yapılarını tanımlamaya çalışmışlardır. Bu polisakkaritlerin molekül ağırlıkları, dağılım profilleri HPSCE-MALLS kullanılarak ölçülmüştür. Ekstraktta sırasıyla %31, 46 ve 23 ağırlıklı üç polisakkarit grubu bulunmuştur. Bu üç grubu temsil eden fraksiyonlar, farklı derişimlerde etanol ile çöktürme kullanılarak elde edilmiştir. En büyük molekül büyüklüğüne sahip ilk grubun, şeker bileşimi analizi, anilin metodu ve ^1H -ve ^{13}C -NMR analizlerinden anlaşıldığı gibi, O -6 pozisyonunda tekli β -D-glukozil yan zincirlerine sahip dallanmış $(1\rightarrow3)$ - β -D-glukan olduğu belirlenmiştir. $(1\rightarrow3, 1\rightarrow6)$ - β -D-glukanın temel aktif bir polisakkarit olduğu belirtilmiş ve bu, insan MNC hücrelerinden (mononuclear cells) uyarıcı aktivite sağlayarak önemli tümör öldürücü faktör- α 'yı (TNF- α ; tumor necrosis factor) göstermiştir. Bu glukan oda sıcaklığında, suda az çözülmüştür. Önemsiz derecede düzenleyici aktivite gösteren ikinci ve üçüncü grupların ise farklı oranlarda D-glukoz, D-galaktoz ve D-mannoz'u içerdiği gösterilmiştir. HPSEC-MALLS analizleri ile de polisakkarit moleküllerinin ortalama molekül kütlesi dağılımları belirlenmiştir.

Mondal ve ark. (2004), yenilebilir bir mantarın, *Termitomyces eurhizus*, meyve kısmından suda çözünebilen polisakkaritlerini ekstrakte etmişler ve bu polisakkaritlerin yapısını araştırmışlardır. PS-I ve PS-II olarak kodlanan iki homojen polisakkarit fraksiyonunun monosakkarit olarak sadece D-glukoza içerdiğini bulmuşlardır. Metilasyon analizleri ve periyodat oksidasyonu çalışmalarının ardından GLC-MS analizleri ile yapıdaki bağlanmalar belirlenmiş ve buna göre PS-I'deki şeker ünitelerinin (1→3)-D-glukopiranozil ve (1→6)-D-glukopiranozil oldukları saptanmıştır. Bununla beraber, PS-II'nin D-glukoz içerdiği ve D-glukoz'un bağlanma şeklinin de (1→6)-D-glukopiranozil olduğu tanımlanmıştır. Son olarak, Şekil 2.1'de polisakkaritlerin olası yapıları ¹H, 2D ve ¹³C NMR spektral analizleri kullanılarak saptanmıştır.



Şekil 2.1. PS-I ve PS-II polisakkaritlerinin olası yapıları.

Hsieh ve ark. (2005), başlıca Taiwan yemeklerinde kullanılan pirinç şarabının üretiminde oluşan atık suyu (thin stillage) katkı maddesi karbon kaynağı ile kullanarak *Ganoderma lucidum*'un yerel bir türünün hücre gelişimini ve polisakkarit oluşumu üzerinde çalışmışlardır. pH 5'e ayarlanarak, %60'lık atık suyu, en yüksek hücre konsantrasyonu (7,8 g/l) ve polisakkarit oluşumu (7,5 g/l) ile *Ganoderma lucidum* miselini geliştirmek için başarıyla kullanmışlardır. Çeşitli şeker katkı maddeleri, melas ilavesi kullanmak hücre konsantrasyonunu önemli derecede arttırırken, en yüksek misel gelişim hızı ve hücre konsantrasyonunu oluşturmuştur. Aksine, glikoz ilavesi, ilavesiz yapılarına göre, polisakkarit üretiminin artmasına yol açmıştır. Sadece atık su ile üretilenlerde 10,000 ile 200,000 Da molekül kütlesi aralığında polisakkaritler bulunmuştur. Bu moleküler kütle dağılımı boyut-eleme

kolonu kullanılarak GPC ile belirlenmiştir. *Ganoderma lucidum*'un hücre içi ve hücre dışı polisakkaritleri benzer molekül kütlesi dağılımı göstermiş ama hücre içi polisakkaritlerin çok daha yüksek bir molekül kütlesi dağılımına sahip oldukları kaydedilmiştir.

Miyazawa ve ark. (2005), agar, nişasta ve ksilan gibi polisakkaritleri, küçük bir batch reaktörde karbondioksit ile ve karbondioksitsiz olarak hidrotermal koşullar altında mono- ve oligosakkaritlerini elde etmek için hidroliz etmişlerdir. Hidroliz sonrasında ele edilen reaksiyon ürünlerinin moleküler kütle dağılımı GPC kolonu kullanılarak HPLC ile belirlenmiştir. Bu analiz sonuçlarına göre, polisakkarit hidrolizatlarının moleküler kütle dağılımları, karbondioksit yüklemesinin arttırılmasıyla daha düşük molekül kütlelere kayma göstermiştir. Örneğin, 200°C'de nişastanın hidrolizinden oluşan glikozun verimi, 15 dakikalık reaksiyon süresince karbondioksit yüklemesinin arttırılmasıyla %3,7'den %53'e artmıştır Su ve karbondioksitten oluşan karbonik asit, yüksek sıcaklık ve yüksek basınçlı suya göre daha düşük pH'da görülmüştür. Bu çalışma, karbondioksit mevcudiyetinde hidrotermal koşullar altında polisakkaritlerin hidrolizinin, nötralizasyon ve ayırmada ticari asit ve bazların kullanımını gerektirmeyen bir proses olduğu için mono- ve oligosakkaritleri üretmede çevresel olarak tehlikesiz bir yöntem olduğunu da göstermiştir.

Peng ve ark. (2005b), *Ganoderma tsugae* miselinden suda çözünmeyen iki tür heteropolisakkariti (GM5-1 ve GM6-1) 25 ve 65°C'de 0,5 M NaOH çözeltisi ile izole etmişlerdir. Bu polisakkaritlerin kimyasal yapılarını infrared spektroskopisi, gaz kromatografisi ve ¹³C NMR ile belirlemişlerdir. GM5-1, (1→3)-α-D-glukan ve mannoksilan'dan oluşurken, GM6-1 başlıca mannoksilandan oluşmuştur. GM6-1 herhangi bir çözücü ilavesi olmadan 5 fraksiyona ayrılmış ve bu fraksiyonların ortalama molekül kütlesi (Molecular Weight, M_w) ve gerçek viskozitesi $[\eta]$ lazer ışınli ışık saçılım (LLS) dedektörü, çok açılı lazer ışık saçılım dedektörü ile kombine edilmiş boyut eleme kromatografisi (SEC-LLS) ve 30°C de 0,25 M LiCl/DMSO içinde viskozimetre ile belirlenmiştir. Çözelti içerisinde seyrek sarımlı bir konformasyon gösteren $1,56 \times 10^6$ – $4,81 \times 10^6$ M_w aralığındaki GM6-1 için, M_w 'ye

bağlı olan $[\eta]$ ve yarıçap $[(S^2)_z^{1/2}]$, $[\eta]=8.9 \times 10^{-2} M_w^{0.57} (\text{cm}^3 \text{g}^{-1})$ ve $(S^2)_z^{1/2}=4,1 \times 10^{-2} M_w^{0.52}$ (nm) olarak bulunmuştur.

Umemura ve ark. (2005), MDS (Molecular Dynamics Simulation) yöntemini kullanarak malto- ve cello- oligosakkaritlerin monomerden heksamere hidrasyon durumunu araştırmışlardır. Malto- ve cello- oligosakkaritlerin her ikisinde D-glukopiranoz'dan oluşmaktadır, ama glukozidik bağları farklı konformasyon esnekliğine sahiptir. Buna göre, hidrate olmuş su moleküllerinin sayısı malto- ve cello- oligosakkaritler arasında yaklaşık olarak aynı çıkmıştır. Ama iki şeker oksijen atomundan daha çok sayıdaki hidrojen bağlı su molekülleri malto- oligosakkaritlerden çok cello-oligosakkaritlerde 1,3~1,5 kat daha fazla çıkmıştır. Ek olarak, çift hidrojen bağlı su molekülü, malto-oligosakkaritlerden çok cello-oligosakkaritlerde glikozidik bağlar etrafında daha bol bulunduğu belirlenmiştir. Cello-oligosakkaritlerin güçlü glukozidik bağının, malto-oligosakkaritlere göre, glukozidik bağdaki şeker oksijenlerinin köprü kurarak daha fazla su molekülünün oluşmasına yol açtığı ifade edilmiştir.

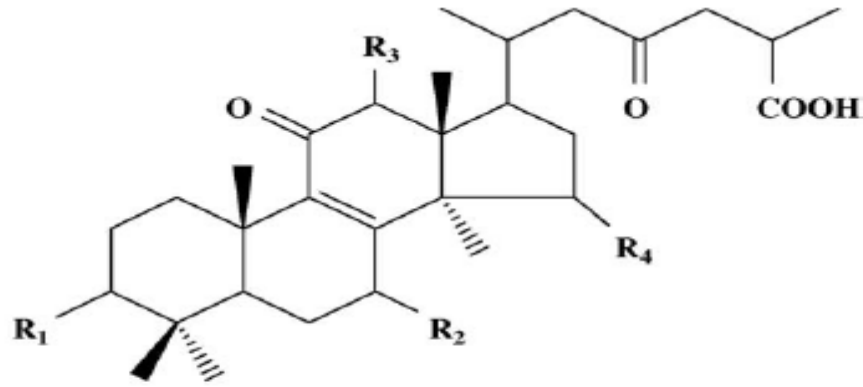
Hsieh, Tseng ve ark. (2006), araştırmalarında *Ganoderma lucidum*'un polisakkaritlerinin farklı ortamlardaki oluşumunu ve hücre büyümesini anlamaya çalışmışlardır. Bu çalışmada, üç farklı derişimde karbon, azot, fosfat, magnezyum kaynağı ve çözünmüş oksijen *Ganoderma lucidum*'u geliştirmek ve hücre büyümesini, derişimini ve polisakkaritlerin molekül ağırlığını değerlendirmek için kullanılmıştır. Glukoz derişimi 60 g/l'den 20 g/l'ye düştüğü zaman polisakkarit derişimi 1,79 g/l'den 0,91 g/l' e düşmüştür. En yüksek spesifik polisakkarit oluşumu 0,299 g/g hücreli 60 g/l glukozda bulunmuştur. En düşük molekül ağırlığı ise karbon kaynaklı çalışmada bulunmuştur. Azot kaynağı altında hücrenin derişimi düşük iken, hem polisakkarit oluşumu hem de spesifik polisakkarit oluşumu en yüksek çıkmıştır. Polisakkaritin en düşük molekül ağırlığı azot kaynağı altında bulunmuştur. Hem fosfat hem de magnezyum kaynaklı çalışma düşük hücre büyümesini göstermiştir. Hem düşük polisakkarit oluşumu hem de polisakkaritin düşük molekül ağırlığı fosfat kaynaklı işlemde elde edilmiştir. Magnezyum kaynaklıda polisakkarit oluşumu düşük iken, moleküler kütle daha yüksek çıkmıştır. En iyi polisakkarit oluşumu, ilk beş günlük gelişim için, yeterli oksijen desteği ile sağlanırken, sonrasında diğer beş

günlük gelişim için oksijen miktarı değiştirilmiştir. Aksine, polisakkaritin en yüksek molekül ağırlığı fermantasyon prosesinde oksijen sınırlaması ile sağlanmıştır. Bu çalışmada fermantasyondaki glukoz iyon değiştirici kolona sahip RI dedektörlü bir HPLC sistemi ile belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, polisakkaritlerin molekül ağırlıkları guard ve analitik kolonlu boyut-eleme kolonları kullanılarak GPC ile belirlenmiştir.

Lai ve ark. (2006), *Ganoderma lucidum*'un misel ve meyve kısmından sıcak su ile ekstrakte edilmiş polisakkaritlerinin gerçek viskozite, Mark-Houwink parametreleri gibi termal işlemlere bağlı olarak değişen özelliklerini çözücülerin ve dehidrasyon metotlarının bir türü olarak ölçmüşlerdir. *G. lucidum* polisakkaritlerinin gerçek viskozitesi, tuz dengesi ve zincir bükülmezlik parametreleri üzerinde iyonik gücün etkilerini de belirlemişlerdir. Çalışmaları sonucunda, *Ganoderma lucidum*'un misel ve meyve kısmından ekstrakte edilmiş polisakkaritler için, su çözücü olarak kullanıldığı zaman, moleküler agregasyonlar muhtemelen bazı büyüklükleri akla getirmiştir. Ama DMSO kullanıldığı zaman, daha az yoğun, daha genişlemiş bir konformasyon elde edilmiştir. *G. lucidum*'un hem misel hem de meyve kısmından ekstrakte edilen polisakkaritlerin gerçek viskozitesi iyonik gücün artmasıyla azalmıştır. Böyle bir sonucun olasılıkla polisakkarit yapısındaki üronik asit gruplarının mevcudiyetinden kaynaklandığı ifade edilmiştir. Molekül büyüklüğünün olasılıkla daha büyük olmasından dolayı, miselden ekstrakte edilmiş polisakkaritler genellikle meyve kısmından ekstrakte edilene göre daha yüksek viskozite göstermiştir. Sıcak hava, vakum ve dondurma ile kurutmayı (freeze drying) içeren metotlarla kurutma, miselden ve meyve kısmından ekstrakte edilen polisakkaritlerin termal işlemlere bağlı olarak değişen özellikleri üzerinde önemli bir etki göstermemiştir. Böyle bir bilginin de *G. lucidum* polisakkaritlerini içeren fonksiyonel gıdaların gelişimi sırasında uygun olacağı belirtilmiştir.

Wang ve ark. (2006), *Ganoderma lucidum*'daki altı triterpenoidin, ganoderik asit C₂, B, AM₁, K, H ve D ve ilgili türlerinin (Şekil 2.2), kantitatif belirlemesi için ters-faz sıvı kromatografisini geliştirmişlerdir. Örnekleri ultrasonik banyoda kloroform ile ekstrakte etmişlerdir. Ayırma ve tanımlamaların optimum koşullarını, 250 nm'de, 1,0 ml/dak. akış hızında, %0,03'lük (v/v) sulu fosforik asit ve asetonyitril gradienti ile Agilent Zorbax SB-C₁₈ kolon üzerinde başarmışlardır. Bütün

kalibrasyon eğrileri, test aralığı içinde iyi bir lineerlik göstermiş ve bu metoda ait bağıl sapma %2'den daha az çıkmıştır. Metodun geri kazanımı, %5'den daha az standart sapma ile, %93–103 aralığında elde edilmiştir. Geçerli çalışma metodu, *Ganoderma lucidum* ve ilgili türlerinin 36 farklı örneğinde triterpenoit bileşenlerinin kantitatif olarak belirlenmesi için uygulanmıştır. Sonuçlar, geliştirilmiş metodun *G. lucidum* ve ilgili türleri için bir kalite kontrol metodu olarak kolaylıkla kullanılabilir olduğunu göstermiştir.



Ganoderic acid C₂ (1): R₁=R₂=β-OH, R₃=H, R₄=α-OH

Ganoderic acid B (2): R₁=R₂=β-OH, R₃=H, R₄=O

Ganoderic acid AM₁ (3): R₁=β-OH, R₂=R₄=O, R₃=H

Ganoderic acid K (4): R₁=R₂=β-OH, R₃=β-OAC, R₄=O

Ganoderic acid H (5): R₁=β-OH, R₂=R₄=O, R₃=β-OAC

Ganoderic acid D (6): R₁=R₄=O, R₂=β-OH, R₃=H

Şekil 2.2. *Ganoderma lucidum*'daki altı triterpenoidin yapısı

3. MATERYAL VE METOD**3.1. Materyal****3.1.1. Çalışılan Mantar Türleri**

Ganoderma lucidum'un meyve kısımları doğal olarak yetişen iki bölgeden temin edilmiştir. Bu bölgelerden ilki Çukurova Üniversitesi'nin kampus alanıdır. Bu kampus alanının ismi Balcalı olarak bilindiği için bu tür, "Balcalı" olarak kodlanmıştır. Diğer *Ganoderma lucidum* türü ise Mersin'deki ormanlardan bulunmuştur. Bu türe de yine yetiştiği bölgenin adından yola çıkarak "Alata" ismi verilmiştir. Toplanan *Ganoderma lucidum*'un meyve kısımlarından miselleri geliştirilerek ekimleri yapılmıştır. Bu işlemler Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir. Misel, yeterli miktara ulaştıktan sonra yetiştirilmek üzere özel ışık, havalandırma, nem ve sıcaklık donanımına sahip Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Mantar Üretim Laboratuvarı'na aktarılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Aseton (Merck), Asetonitril (Merck), Baryum karbonat (Merck), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck), EDTA (Na tuzu), Etanol (Merck), Fenolftalein indikatörü, Folin-Ciocalteu reaktifi (Sigma), Karbondioksit gazı, 2-propanol (Merck), Sıvı azot (AdvanSA A.Ş.), Sodyum azid, Sodyum hidroksit (Merck), Sodyum karbonat (Merck), Sodyum klorür (Merck), Sodyum potasyum tartarat, Sülfirik asit (Merck), pH: 7,2 Fosfat tamponu (NaCl , KCl , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4) (Merck), Trikloroasetik asit (Merck).

3.1.3. Kromatografik ve Spektroskopik Analizlerde Kullanılan Standartlar

Dekstran standartları: Molekül kütleleri 4400, 9900, 21400, 43500, 124000, 196000, 277000 ve 401000 Dalton.

Monosakkarit standartları: Glukoz, Galaktoz, Mannoz, Ramnoz, Arabinoz, Ksiloz, Fruktoz (Sigma).

Protein standardı: Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma).

3.1.4. Yüksek Sıcaklık/Yüksek Basınç Reaktörü

Subkritik su ile ekstraksiyon deneyleri, Parr Instrument Company'den alınan, Parr 4575 model özel alaşımdan yapılmış, 500 ml hacminde yüksek sıcaklık/yüksek basınca dayanıklı paslanmaz çelik reaktöründe yapılmıştır (Şekil 3.1).

Yüksek sıcaklık/basınç ve korozyif ortama dayanıklı paslanmaz çelik alaşımdan imal edilmiş gövdenin üzerinde, gaz basma düzeneğinin bağlanacağı ve aynı zamanda ekstraksiyon sonrasında içerideki gazın boşaltılabileceği valflerin bulunduğu, yine özel çelik alaşımdan yapılmış, kaçakları engellemek için grafit gasket yerleştirilebilen, manometreli bir kapak bulunmaktadır. Bu kapağın etrafında da karşılıklı olarak birleştirilen ve kapağı sıkıştırmak için sekiz adet alyan vida bulduran bir kapak sistemi daha mevcuttur.

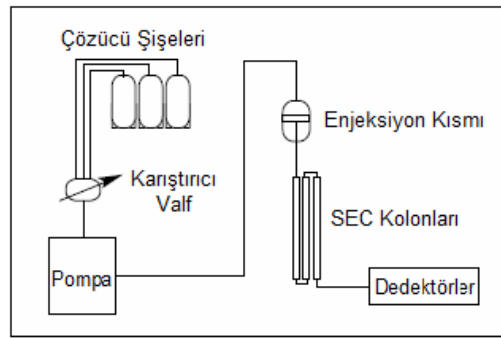
Ekstraksiyonlarda, CO₂ atmosferini sağlamak için, reaktör kapağında bulunan valflerden birine ISCO marka 260D model pompa sistemi bağlanarak CO₂ gazı basılmıştır. Isıtma işlemi Parr 4842 model manyetik karıştırıcı ısıtıcı ile gerçekleştirilirken, reaktör içindeki sıcaklığın kontrolü bir ısı çifti (thermocouple) aracılığı ile sağlanmıştır.



Şekil 3.1. 500 ml yüksek basınç/sıcaklık reaktörü

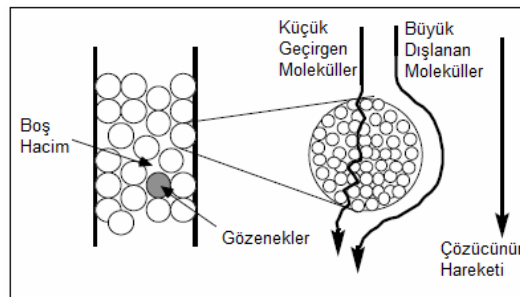
3.1.5. Analitik Cihazlar

Yüksek performanslı boyut eleme kromatografisi (Size Exclusion, SEC ve Gel Permeation Chromatography, GPC) özellikle büyük molekül kütle dağılımları, üç boyutlu yapıları ve dallanmaları hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlayacak modern tekniklerden biridir. Bir SEC sistemindeki temel kısımlar Şekil 3.2’de şematik olarak gösterilmiştir.



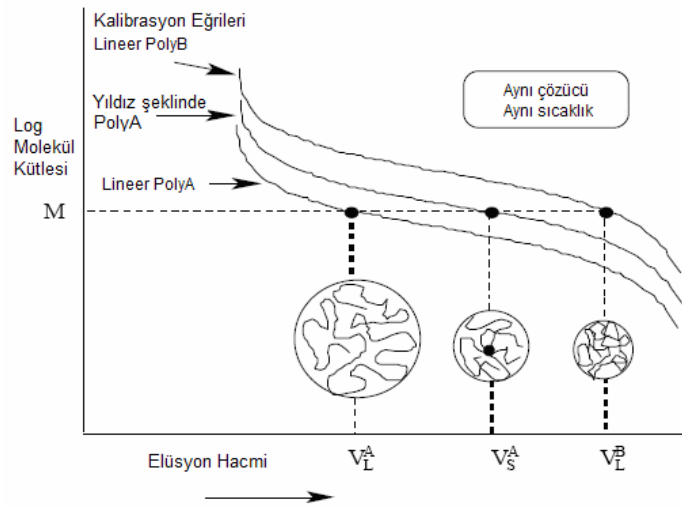
Şekil 3.2. Bir SEC cihazının şematik gösterimi (Anonim, 2007a)

SEC için ayırma mekanizması basit ve hızlıdır. Bir SEC kolonu, daha küçük moleküllerin daha uzun süre kalmasını sağlayacak gözenekler içerir. Verilen bir solvent akış hızında farklı büyüklükteki moleküller kolon içerisinde farklı yollar alırlar (Şekil 3.3). Kolon içerisinde küçük moleküller, gözenekler arasındaki boşluklara sızdıkları için, büyük moleküllerden daha büyük uzaklıklara doğru hareket ederler. Bu nedenle büyük moleküller kolondan ilk olarak çıkarken, küçük moleküller daha geç kolonu terk ederler.



Şekil 3.3. SEC ile farklı büyüklüklerdeki moleküllerin ayrımı (Anonim, 2007a)

SEC, polimer moleküllerini molekül kütlelerine göre değil, daha çok onların çözelti içindeki hidrodinamik hacimlerine (çözücü molekülleri ile çevrilmiş halde bulunan polimer moleküllerinin çözelti içerisinde kapladıkları hacim) göre ayırımı yapmayı sağlar (Şekil 3.4). Hidrodinamik hacmin büyüklüğü, polimerin mol kütlesine ve polimer-çözücü etkileşim türüne bağlıdır.



Şekil 3.4. SEC kolonda moleküllerin ayırımı (Anonim, 2007a)

Bu yöntemle molekül kütlelerinin hesaplanması, ilgili materyal ile benzer özelliklere sahip standartların kullanımını gerektirmektedir. Ancak bileşimi tam olarak bilinmeyen biyopolimerler ve karbonhidratlar ile çalışıldığı zaman moleküler kütleleri hesaplamak zorlaşmaktadır. Çünkü polimerdeki farklı fonksiyonel grupların varlığı kolon ile etkileşimleri etkileyebildiği gibi, konformasyon da polimerin bağlı hidrodinamik büyüklüğünün değişmesine neden olmaktadır. Bu durumdan dolayı, elde edilen bilgiler materyaller arasındaki bağlı farklılıkları ortaya koyabilirken, mutlak molekül kütlelerinin elde edilmesi çoğu zaman mümkün olamamaktadır. Ancak yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ve çok açılı lazer ışık saçılım dedektörü (Multi Angle Laser Light Scattering, MALLS) ile kullanılan boyut eleme kromatografisi standart SEC yönteminde oluşan hataların birçoğunu düzeltme imkanı sağlayabildiği gibi tek bir polimerdeki yüksek ve düşük miktardaki dallanmaları bağlı olarak da belirleyebilmektedir. Bu dedektörde saçılan ışığın şiddeti (yoğunluğu), molekülün

konsantrasyonu ve molekül kütlesi ile orantılıdır ve ilave bir dedektörle (Refractive Index/Ultraviolet, RI/UV) konsantrasyon ölçüldüğünde, bir polimerin molekül kütlesi kolaylıkla bulunabilmektedir (Anonim, 2007b).

3.2. Metod

3.2.1. *Ganoderma lucidum* Mantar Örneklerinin Hazırlanması

Alata ve Balcalı olarak kodlanmış *Ganoderma lucidum* mantar türlerinin meyve kısımları belirli aralıklarla (yaklaşık 3-4 haftada bir) hasat edildikten sonra küçük parçalar halinde doğranarak parçalayıcıda öğütülmüştür. Öğütülmüş *Ganoderma lucidum* mantarının açık havada iyice kurutulması sağlanmıştır. Kurutma işlemi tamamlandıktan sonra kuru mantar örnekleri paketlenerek desikatörlerde kullanılacakları zamana kadar saklanmıştır.

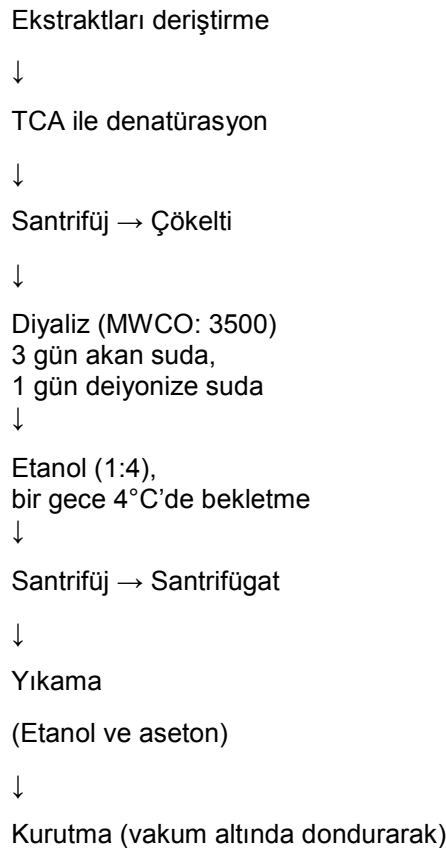
3.2.2. Subkritik Su ile Ekstraksiyon Çalışması

Alata ve Balcalı kodlu *Ganoderma lucidum* türleri, CO₂ atmosferinde, subkritik koşullarda su ile ekstrakte edilmiştir. Kurutulmuş mantar örnekleri (yaklaşık 40 g) 500 ml'lik reaktör içerisine konularak üzerine 350 ml saf su ilave edilmiş ve sistem kapatılmıştır. Tüm kontroller yapıldıktan sonra reaktör istenilen sıcaklığa ısıtılmıştır. Sıcaklık ayarlanan değere ulaştığı zaman, reaktöre ISCO pompa sistemi ile CO₂ gazı (280 bar) basılmıştır. Yaklaşık bir saatlik ekstraksiyon sonrasında, sistem hızlı bir şekilde soğutulmuş ve içerideki basınç reaktörün vanası açılarak yavaşça uzaklaştırılmıştır. Elde edilen ekstrakt filtre edilmiş ve süzüntü kısmına aşağıda açıklanan izolasyon işlemi uygulanmıştır. Ekstraksiyon deneyleri üç farklı sıcaklıkta (50, 100 ve 150°C) gerçekleştirilmiştir. Basınç, tüm ekstraksiyon deneylerinde, en düşük sıcaklıkta bile, subkritik su koşullarını sağlamak için 280 bar (4060 psi)'da sabit tutulmuştur.

3.2.3. Ekstraksiyon Sonrası Bileşenlerin İzolasyonu

Subkritik su ile ekstraksiyon sonrasında sulu ekstraktlar, belirli bir hacme kadar (20–25 ml) döner buharlaştırıcıda, 50–60°C'de vakum altında deriştirilmiş ve ardından polisakkaritlerin yapısında veya çözelti ortamında bulunabilecek proteinleri

uzaklaştırmak veya denatüre etmek için trikloroasetik asit (TCA) (~4 g) ile muamele edilmiştir. Bu işlem sonucunda çökelediği gözlenen kısımlar santrifüjlenmiş ve santrifügat üç gün akan suda ve bir gün de deiyonize suda diyaliz edilmiştir (Serva Membra-Cell Dialysis Tubing, MWCO: 3500 Da). Diyaliz işlemi sonrasında kalan kısım bir balonda toplanarak döner buharlaştırıcıda küçük bir hacme kadar deriştirilmiş ve kalan sıvı ekstrakta, hacminin 4 katı kadar etanol eklenmiştir. Bu karışım 4°C’de bir gece bekletildikten sonra oluşan son çökelek 6000 rpm’de 4°C’de 25 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında geride kalan son çökelti (polisakkarit içerikli katı) sırasıyla etanol ve aseton ile yıkanmış ve sonrasında sıvı azot ile dondurulup Freeze Dryer’de -48°C’de 2 gün boyunca kurutulmuştur. Kurutulmuş örnekler sonraki aşamalar ve analizler için 25 ml’lik ağzı kapaklı viallere alınarak desikatörde saklanmıştır.



Şekil 3.5. Polisakkaritlerin izolasyonu

3.2.4. Homojenlik ve Ortalama Moleküler Kütlelerin Belirlenmesi**3.2.4.1. Jel Geçirgenlik Kromatografisi Analizleri**

Alata ve Balcalı *Ganoderma lucidum* mantarlarının aktif bileşenlerinden bir kısmını oluşturan polisakkaritlerin ortalama molekül kütleleri jel geçirgenlik kromatografisi (Gel Permeation Chromatography, GPC) ile Shimadzu 10VP serisi HPLC cihazı (Şekil 3.6) kullanılarak belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisi molekül ağırlıkları 4400, 9900, 21400, 43500, 124000, 196000, 277000 ve 401000 Da olan dekstran standartları kullanılarak oluşturulmuştur. Standart çözeltiler 2 mg/ml konsantrasyonunda hazırlanmıştır. Alata ve Balcalı *Ganoderma lucidum*'un sabit basınçta ve farklı sıcaklıklarda subkritik su ile ekstraksiyonundan elde edilen polisakkarit içerikli katı örneklerden yaklaşık 4 mg alınarak 1 ml deiyonize suda çözülmüş ve analize hazır hale getirmek için 0,45 µm'lik filtreden geçirilerek küçük viallere alınmıştır.



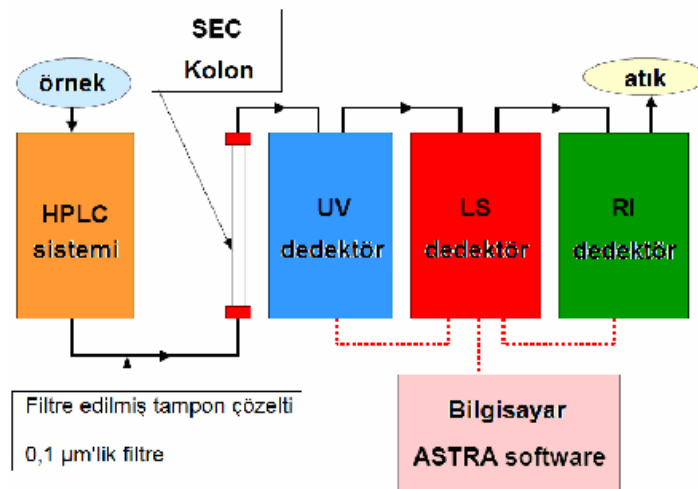
Şekil 3.6. GPC analizlerde kullanılan HPLC cihazı

İzole edilen polisakkaritlerin analizlerinde, Waters Ultrahydrogel 250 (MWR: 1 kDa–80 kDa ve 300 mm x 7,8 mm; 250 Å) ve 2000 (MWR: 50 kDa–5000 kDa ve 300 mm x 7,8 mm; 2000 Å) kolonları molekül büyüklüklerine göre, büyükten küçüğe doğru, seri olarak bağlanıp HPLC cihazının donanımında bulunan fırın içerisine yerleştirilerek kullanılmıştır. Analizler analitik modda, refraktif indeks dedektör (Shimadzu RID-10A) ile 70°C fırın sıcaklığında yapılmıştır. Standartlar ve analiz için hazır hale getirilmiş numuneler oto örnekleyiciye (Shimadzu SIL-10AF

Automatic Sample Injector) konularak enjeksiyonları yapılmıştır. Numune enjeksiyon hacmi 50 µl olarak yapılmıştır. Mobil faz olarak 0,001 M NaOH çözeltisi kullanılmıştır. Elüsyon 0,7 ml/dk akış hızında izokratik olarak 37 dakikada gerçekleştirilmiştir. Her bir analiz için iki tekrar yapılmıştır.

3.2.4.2. HPSEC-MALLS Analizleri

Alata ve Balcalı *Ganoderma lucidum* polisakkaritlerinin molekül kütlelerinin belirlenmesi HPSEC-MALLS (High Pressure Size Exclusion Chromatography-Multi Angle Laser Light Scattering) sistemi kullanılarak da gerçekleştirilmiştir. Wyatt DAWN-DSP marka çok açılı ışık saçılım dedektörü (MALLS), Shimadzu SPD-6A UV dedektör ve Duratec Analysentechnik RI2000 refraktif indeks dedektör sisteme seri bağlı olarak kullanılmıştır (Şekil 3.7). Hem Alata hem de Balcalı *Ganoderma lucidum* polisakkarit ekstraktlarının elüsyonu oda sıcaklığında, izokratik olarak, Superose™ 12, 10/300 GL (GE Healthcare, Sweden) kolonda yapılmıştır ve elüsyonlarda %0,005 NaN₃ + 0,1 M NaCl mobil faz bileşimi 0,45 ml/dk akış hızında kullanılmıştır. Elde edilen veriler ve sonuçların değerlendirilmesi Astra Software (Wyatt Technology, USA) ile yapılmıştır. Bütün örnekler 2 mg/ml olarak hazırlanmış ve bir gece boyunca karıştırıcıda hidrate edilmiştir. Örnekler enjeksiyondan önce 0,1 µm'lik naylon filtrelerden filtre edilmiş ve her çalışmada 100 µl örnek manuel olarak enjekte edilmiştir.



Şekil 3.7. HPSEC-MALLS sistemi

3.2.5. Ekstraktların Kimyasal Bileşimi ve Karakterizasyonu**3.2.5.1. Monosakkarit Analizleri**

Alata ve Balcalı *Ganoderma lucidum*'un polisakkaritlerindeki basit şekerlerin analizleri için Varian HPLC sistemi kullanılmıştır (Şekil 3.8). Bu sistem, bir çift pompa sistemi (Varian 210 Prostar), refraktif indeks dedektör (Varian RI 350), ve bir oto örnekleyiciden (Varian AS Module 410) oluşmaktadır. Supelcosil™ LC-NH₂ şeker kolonu (250mm x 4,6 mm, 5 µm), asetonitril (C₂H₃N)/su (H₂O) (%80/20) mobil fazı ile 0,3 ml/dk akış hızında kullanılmıştır. Monosakkarit standartları (glukoz, galaktoz, mannoz, ramnoz, arabinoz, ksiloz, fruktoz, Sigma, Almanya) kaba ekstraktaki gerçek şeker miktarını belirlemek için farklı derişimlerde kullanılmıştır. Alata ve Balcalı örneklerinin polisakkarit ekstraktları (10 mg/ml) 5ml % 4'lük H₂SO₄ çözeltisi ile 6 saat boyunca 100 °C'de ağzı kapaklı viallerde hidroliz edilmiştir. Hidrolizden sonra, çözelti bir tüpe aktarılmıştır. Asidin fazlası, oluşan kabarcıkların taşmasını önlemek için son derece yavaş bir şekilde BaCO₃ eklenerek tamamen uzaklaştırılmıştır. Bu karışım bir gece oda sıcaklığında bırakılmış ve sonraki gün 3000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen çözelti 0,45 µm'lik bir filtreden geçirildikten sonra HPLC'ye enjekte edilmiştir (20 µl).



Şekil 3.8. Monosakkarit analizlerinde kullanılan Varian HPLC sistemi

3.2.5.2. Lowry Protein Metodu

Bovine Serum Albumin (BSA), polisakkaritlerin yapısında bulunan proteinlerin kantitatif olarak belirlenmesi için standard olarak kullanılmıştır. 20 ml (2 mg/ml) BSA stok çözeltisi pH'sı 7.2 olan 0,2 M fosfat tamponu içinde hazırlanmıştır. Örnekler de %1'lik (w/v) konsantrasyonda fosfat tamponu içinde hazırlanmıştır. Standartlar ve örnekler bir gece hidrate edilmiştir. Protein standardı stok çözeltiden fosfat tamponu ile seyreltilerek 0, 250, 500, 1000, 1500 ve 2000 µg/ml'lik derişimlerinde hazırlanmıştır. Lowry stok çözeltisini hazırlamak için, Lowry reaktifi A (%2,0 (w/v) Na₂CO₃, %0,4 (w/v) NaOH), B(%1 (w/v) CuSO₄.5H₂O) ve C (%2 (w/v) sodyum potasyum tartarat) 98:1:1 (A:B:C) oranında karıştırılmıştır. Lowry stok çözeltisinin 3 ml'si ile 300 µl örnek bir tüp içinde karıştırılmış ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra her bir çözeltiye 1:1 oranında seyreltilmiş 300 µl Folin–Ciocalteu reaktifi ilave edilmiştir. 30 dakikalık inkübasyondan sonra spektrofotometrede (Perkin Elmer λ 25) 595 nm dalga boyunda hem farklı derişimlerdeki standart çözeltilerin hem de örneklerin UV ölçümleri alınmış ve bu ölçüm sonuçlarından oluşturulan kalibrasyon eğrisine göre polisakkaritlerin içeriğindeki % toplam protein miktarı hesaplanmıştır (bakınız: Ek-A Hesaplamalar).

3.2.5.3. Üronik Asit İçeriği

Alata ve Balcalı *Ganoderma lucidum* polisakkarit ekstraktlarının üronik asit içeriği, kolon elüsyonundan sonra titrimetrik nötralizasyon işlemi ile belirlenmiştir. Amerlite-120 reçine (asit formu) ile doldurulmuş bir katyon değiştirici reçine kolonu bu amaç için kullanılmıştır. 10 ml %3'lük (w/v) polisakkarit çözeltisi kolona verilmiş ve kolon 100 ml deiyonize su ile yıkanmıştır. Eluent ve yıkama sonucunda alınan çözelti 0,01 M sodyum hidroksit çözeltisi ile fenolftalein indikatörü kullanılarak titre edilmiştir.

3.2.6.4. Çözünürlük Testi

Polisakkarit ekstraktlarının çözünürlük testi hem nötral hem de bazik sulu çözeltilerde yapılmıştır (JECFA, "Joint FAO/WHO Experts Committee on Food Additives" metodu).

(i) Bazik ortamda çözünürlük testi (JECFA1):

70 mm'lik cam bir fiber filtre (Whatman, GF/C, 70 mm, 1,2 micron) 105°C'de 1 saat boyunca fırında kurutulmuştur. Daha sonra bir desikatörde soğutulup tartılmıştır (m_1). 300 ml'lik bir deney tüpüne yaklaşık 0,5 g örnek tartılıp (m_0) 5 ml 2-propanol ile karıştırılmıştır. Örnek magnetik karıştırıcıda karıştırılırken, üzerine 100 ml % 0,1 (w/w) etilen diamin tetra asetik asit (Na tuzu) içeren 0,03 M NaOH çözeltisi ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 30 dakika karıştırıldıktan sonra kaynayana kadar ısıtılmış ve bu sıcak çözelti vakum altında filtre edilmiştir. Deney tüpü 5 kez su ile ve filtre de 50°C'de 100 ml ılık su ile yıkanmıştır. Filtre 105°C'de 1 saat kurutulmuş ve desikatöre alınarak soğumaya bırakılmıştır. Bu işlem sonunda filtre kağıdı tartılarak (m_2) çözünmeden kalan kısmın miktarı hesaplanmıştır (bakınız: Ek-A: Hesaplamalar).

(ii) Nötral ortamda çözünürlük testi (JECFA2):

70 mm'lik cam bir fiber filtre (Whatman, GF/C, 70 mm, 1,2 micron) 105°C'de 1 saat boyunca fırında kurutulmuştur. Bu filtre kurutulduktan sonra bir desikatörde soğutulup tartılmıştır (m_1). Yaklaşık 80–100 ml %1 ve %2'lik örnek çözeltisi hazırlanmış (m_0) ve bunlar oda sıcaklığında 30 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra çözeltiler 20°C'de 2500 rpm'de 30 dakika santrifüjlenmiştir. Bu işlem sonunda çözeltiler cam fiberden vakum altında filtre edilmiş ve 105°C'de 1 saat kurumaya bırakılmıştır. Desikatörde soğutulan filtre tartılarak (m_2) çözünmeyen kısmın miktarı hesaplanmıştır (bakınız: Ek-A: Hesaplamalar).

3.2.5.5. Polisakkaritlerin Karakterizasyonu

Farklı ekstraksiyon koşullarının polisakkaritlerin kimyasal yapıları üzerinde ne tür değişikliklere neden olduğunu belirlemek ve bu yapılardaki fonksiyonel grupların değişikliklerini irdelemek için 400–4000 cm^{-1} aralığında Spectrum RXI FT-IR (Fourier Transformed Infrared, Perkin Elmer) spektroskopi sistemi kullanılmıştır. Katı haldeki polisakkarit ekstraktlarının, potasyum bromür (KBr)-disk metodu kullanılarak spektrumları alınmıştır. Bu metoda göre, önce yaklaşık 100 mg kurutulmuş KBr bir havana konularak iyice öğütülmüş ve 10000–15000 psi'lik

basınç uygulanarak saydam bir disk haline getirilmiştir. Alata ve Balcalı *Ganoderma lucidum* mantarlarının subkritik koşullarda su ile ekstrakte edilmiş katı polisakkarit ekstraktlarından ise 1 mg veya daha az örnek KBr ile karıştırılarak disk haline getirilmiş ve KBr referans alınarak her bir örneğin infrared spektrumları alınmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

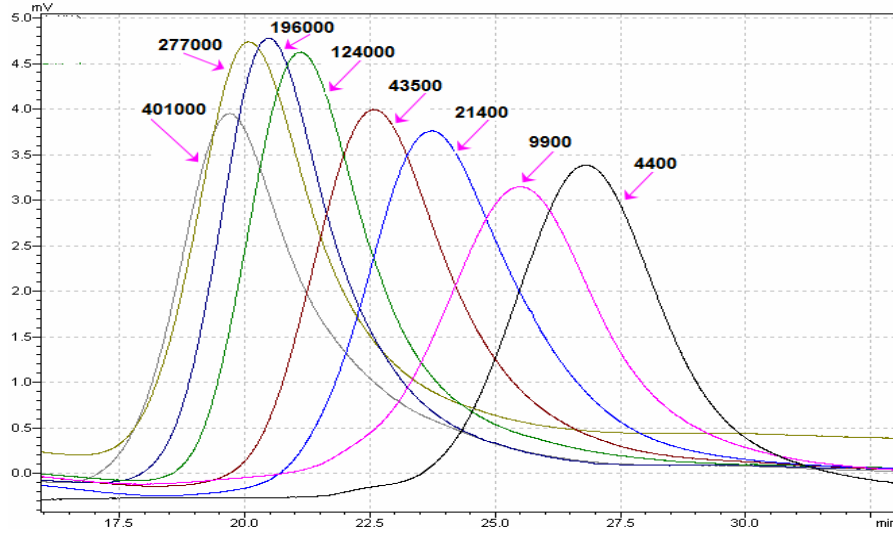
4.1. Jel Geçirgenlik Kromatografisi Analizleri

Alata ve Balcalı *Ganoderma lucidum*'un meyve kısımlarının sırasıyla 50, 100 ve 150°C sıcaklıklarda ve 280 bar (4060 psi) sabit basınçta subkritik su ile CO₂ atmosferi altında ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstraktlardan izole edilen (bakınız: 3.2.3. Ekstraksiyon Sonrası Bileşenlerin İzolasyonu) kaba polisakkarit miktarları Çizelge 4.1'de verilmiştir. Yaklaşık olarak aynı miktarlarda mantar örneklerinin farklı sıcaklıklarda ekstraksiyonuyla farklı miktarlarda polisakkarit elde edilmiştir. Sıcaklık arttıkça elde edilen kaba polisakkarit miktarları da artmıştır.

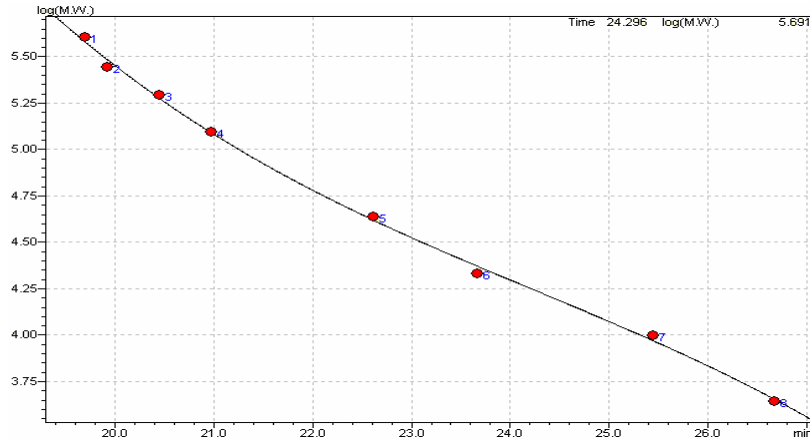
Çizelge 4.1. Alata ve Balcalı *Ganoderma lucidum* mantarının CO₂ atmosferi altında 50, 100 ve 150°C'de subkritik su ile ekstraksiyonundan elde edilen kaba polisakkarit miktarları

Örnek Adı	Başlangıçtaki Örnek Miktarı (g)	Polisakkarit Miktarı (g)
A50	40,3249	0,0812
A100	40,3001	0,5248
A150	40,1404	0,6266
B50	40,3253	0,0656
B100	40,3363	0,2026
B150	40,3053	1,1435

Elde edilen polisakkaritlerin ortalama molekül kütleleri GPC (Gel Permeation Chromatography) ile belirlenmiştir. Farklı molekül kütlelerindeki dekstran standartları kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisinden her iki türün polisakkaritlerinin ortalama molekül kütleleri, pik maksimumundaki molekül kütlesi (M_p) değerleri dikkate alınarak hesaplanmıştır. Farklı molekül kütlelerindeki dekstran standartlarının üst üste çakıştırılmış HPLC kromatogramları ve bu standartlara ait kalibrasyon eğrisi sırasıyla Şekil 4.1 ve 4.2'de, kalibrasyon eğrisine ait değerler ise Çizelge 4.2'de gösterilmektedir.



Şekil 4.1. Dekstran standartlarının Ultrahydrogel 2000–250 kolonundan elüsyonunun durumunu gösteren kromatogram



Şekil 4.2. Dekstran standartlarının GPC analizi sonucu oluşturulan kalibrasyon eğrisi

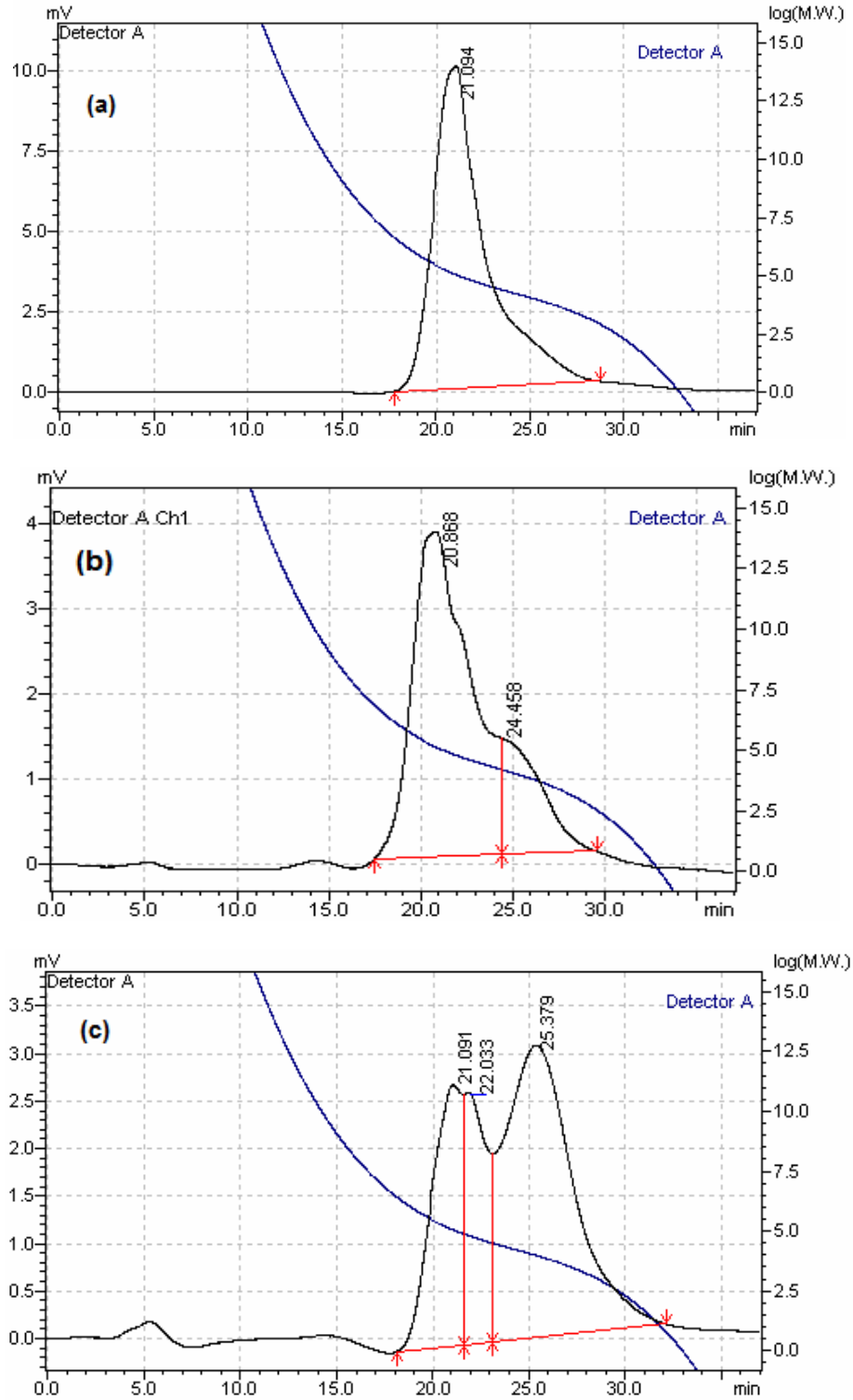
Çizelge 4.2. Dekstran standartlarının molekül kütleleri ve GPC kolonundan elüsyonları sonucunda belirlenen alıkonma zamanları

Standart No	Alıkonma Zamanı (dk)	Molekül Kütlesi, M_p (Da)
1	19,699	$4,010 \times 10^5$
2	19,921	$2,770 \times 10^5$
3	20,449	$1,960 \times 10^5$
4	20,980	$1,240 \times 10^5$
5	22,616	$4,350 \times 10^4$
6	23,674	$2,140 \times 10^4$
7	25,450	$9,900 \times 10^3$
8	26,676	$4,400 \times 10^3$

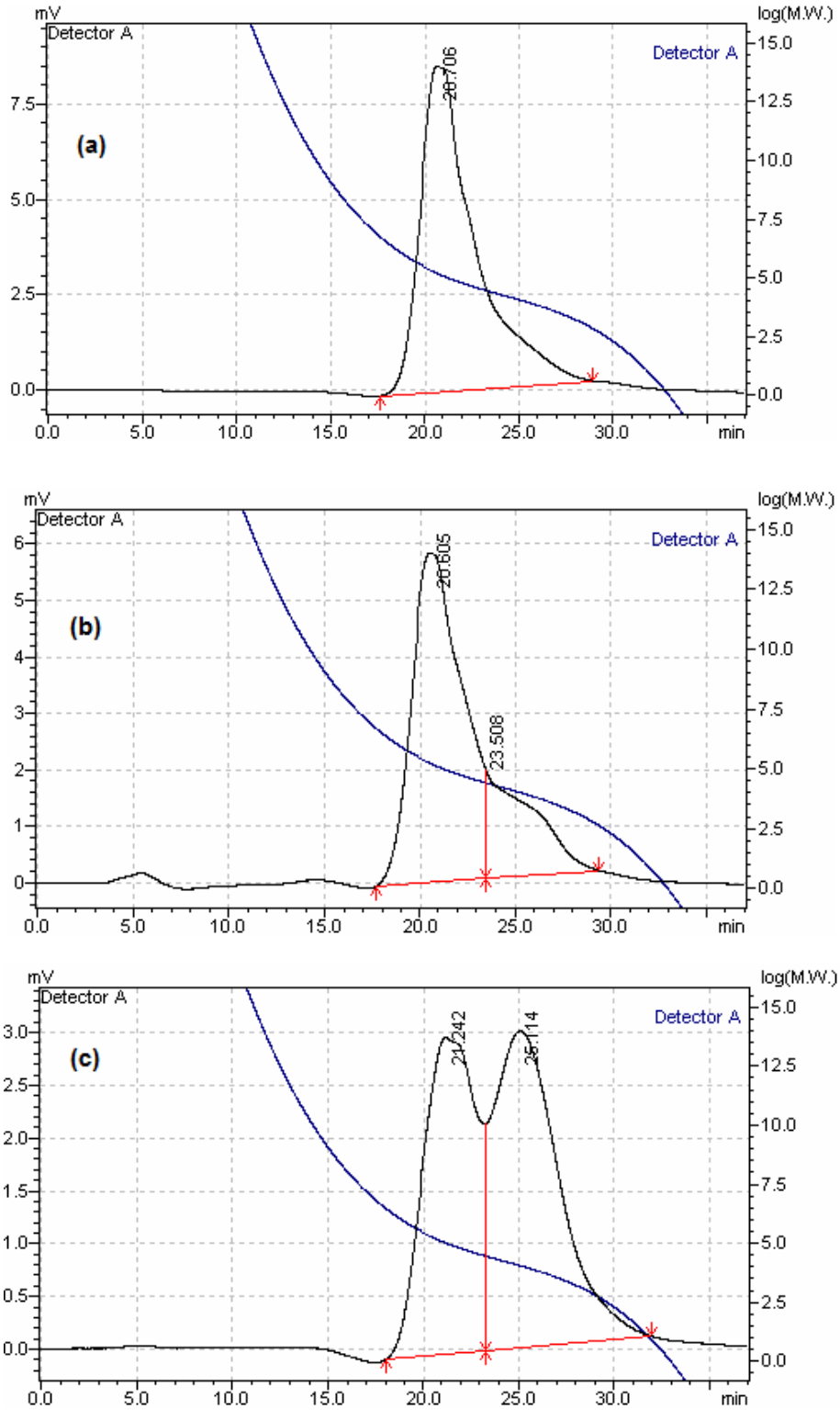
Hem Alata hem de Balcalı *Ganoderma lucidum*'un sırasıyla 50, 100 ve 150°C'de subkritik su ile ekstrakte edilen polisakkaritlerinin GPC analiz sonuçları ise Şekil 4.3 ve 4.4'deki kromatogramlarda gösterilmektedir. Her iki türün 50°C'de ekstrakte edilen polisakkaritlerinin kromatogramlarındaki pik profillerinde herhangi bir değişiklik gözlenmezken, daha yüksek sıcaklıklarda farklılıklar gözlenmiştir. Alata için 100°C'de iki farklı polisakkarit gözlenirken, 150°C'de daha ileri parçalanma sonucu üç farklı molekül ağırlıklı polisakkaritin oluştuğu gözlenmiştir. Aynı koşullarda Balcalı'da ise iki farklı polisakkarit oluşmuştur. Her iki türün polisakkaritlerinin hidrolizi artan sıcaklıkla artarken, Alata daha kolay parçalanmış ve daha küçük molekül ağırlıklı üçüncü bir polisakkarit oluşmuştur. Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi, 150°C'deki hidroliz sonucu Alata'dan oluşan üç farklı polisakkaritin molekül ağırlığı $1,128 \times 10^5$; $5,906 \times 10^4$ ve $9,667 \times 10^3$ Da iken Balcalı'dan oluşan iki polisakkarit $1,009 \times 10^5$ ve $1,114 \times 10^4$ Da molekül ağırlığına sahiptir.

Çizelge 4.3. Alata ve Balcalı *Ganoderma lucidum* mantarının subkritik koşullarda ekstrakte edilen polisakkaritlerin ortalama moleküler kütleleri (M_p)

Örnek Adı	Pik 1 (Da)	Pik 2 (Da)	Pik 3 (Da)
A50	$1,126 \times 10^5$	-	-
A100	$1,338 \times 10^5$	$1,566 \times 10^4$	-
A150	$1,128 \times 10^5$	$5,906 \times 10^4$	$9,667 \times 10^3$
B50	$1,524 \times 10^5$	-	-
B100	$1,656 \times 10^5$	$2,554 \times 10^4$	-
B150	$1,009 \times 10^5$	$1,114 \times 10^4$	-

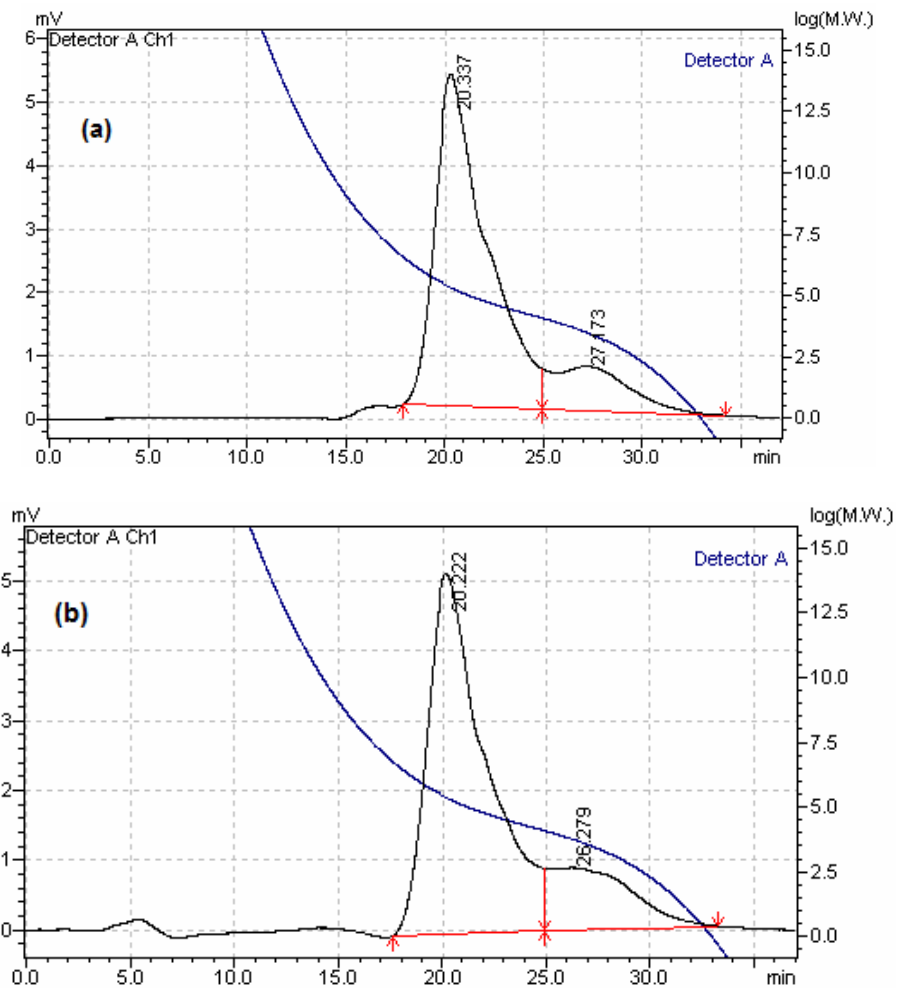


Şekil 4.3. Alata *Ganoderma lucidum* mantarının CO₂ atmosferinde sırasıyla a) 50, b) 100 ve c) 150°C ve 280 bar basınçta subkritik su ile ekstraksiyonu sonucunda elde edilen kaba polisakaritin GPC kromatogramları
log (M.W.): Pik maksimumundaki molekül kütlelerinin logaritması



Şekil 4.4. Balcalı *Ganoderma lucidum* mantarının CO₂ atmosferinde sırasıyla a) 50, b) 100 ve c) 150°C ve 280 bar basınçta subkritik su ile ekstraksiyonu sonucunda elde edilen kaba polisakkaritin GPC kromatogramları
log (M.W.): Pik maksimumundaki molekül kütlelerinin logaritması

Bu çalışmada, CO₂ atmosferinde subkritik su ile ekstrakte edilen polisakkaritlere ait veriler, atmosferik koşullarda sıcak su ile ekstrakte edilenlerle de kıyaslanmıştır. Her iki türün atmosferik koşullarda sıcak su ekstraksiyonundan elde edilen polisakkaritlerin GPC kromatogramları Şekil 4.5'te görülmektedir. Bu kromatogramlarda görülen iki pikin pik maksimumundaki ortalama molekül kütleleri (Mp) hesaplatılmış ve bu kütleler Alata için sırasıyla $2,083 \times 10^5$; $3,201 \times 10^3$ Da, Balcalı için ise $2,307 \times 10^5$; $5,774 \times 10^3$ Da olarak bulunmuştur.



Şekil 4.5. *Ganoderma lucidum* mantar türlerinin atmosferik koşullarda sıcak su ile ekstraksiyonu sonucunda elde edilen polisakkaritlerin GPC kromatogramları (a) Alata, (b) Balcalı
log (M.W.): Pik maksimumundaki molekül kütlelerinin logaritması

Su, çeşitli reaksiyonlara katalizörsüz olarak sağladığı için, yüksek sıcaklık ve basınçta cazip bir reaksiyon ortamı oluşturmaktadır (Katritzky ve ark., 1996; Bröll ve ark., 1999; Akiya ve ark, 2002). Bununla beraber su, toksik ve yanıcı olmadığı ve kolay kullanılabilir olduğundan, çevresel olarak da dost bir reaksiyon çözücüsüdür. Bilindiği gibi, su diğer tüm moleküler maddelere göre oldukça farklı fiziksel özelliklere de sahiptir. Bu da su molekülleri arasındaki kuvvetli hidrojen bağlarından kaynaklanmaktadır. Sıcaklık ve basınç koşullarının değişmesiyle bu hidrojen bağlarının nitelik ve niceliğinde meydana gelecek değişimler, suyun subkritik bölgedeki yoğunluğu, dielektrik sabiti, iyon çarpımı gibi değerlerle birlikte difüzyon ve polarite gibi özelliklerde de önemli değişikliklere yol açmaktadır. Sıcaklık ve basıncın artması ile su moleküllerinin polaritesinde azalma olurken, suyun hidrofob moleküllerle etkileşim gücü artmaktadır. Bununla birlikte, sıcaklık ve basınçtaki artış suyun iyon çarpımında büyümeye, yani ortamdaki hidroksil ve hidronyum iyonlarının derişiminin artmasına neden olmaktadır. Bu da polisakkarit moleküllerinin hidrolizinde arttırıcı bir etki sağlamaktadır. Buna göre, kromatogramlardan da anlaşılacağı gibi, subkritik su ile ekstraksiyon atmosferik koşullardakine göre daha etkili olmuş ve polisakkaritlerin hidrolizi artmıştır. Hunter ve Savage (2003), karbondioksit ilavesi ile basit, asit katalizli organik reaksiyonların yüksek sıcaklık sıvı ekstraksiyonunu hızlandırdığını; sudan karbonik asitin oluştuğunu ve karbondioksitin çözeltinin pH'sını düşürdüğünü ifade etmişlerdir. Bir başka çalışmada, yüksek sıcaklık ve basınç altında reaksiyon ortamına karbondioksit ilavesinin önemli derecede polisakkaritlerin hidrolizini hızlandırdığı ve molekül kütlelerinde azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (Miyazawa ark., 2005). Bunlara ilaveten, karbondioksitin, bilinen sıvı asitlerin aksine, bu koşullarda polisakkaritlerin hidrolizi için ılımlı bir asit katalizörü olarak rol oynadığı ve çözücü olarak su, katalizör olarak da karbondioksit kombinasyonunun çevresel olarak da tehlikesiz bir sistem oluşturduğu ve önerilmiştir (Miyazawa ark., 2005). Bu çalışma kapsamında subkritik su ile ekstraksiyonda ortamdaki CO₂ bir tür katalizör gibi rol oynayarak, hafif asidik bir ortam oluşturmuş ve polisakkaritlerin hidrolize uğramasını sağlamıştır. Atmosferik koşullarla kıyaslandığında, ekstraksiyonlarda sadece sıcaklık ve CO₂'in değil, basıncın da önemli bir etki sağladığı göz ardı edilmemelidir. Çizelge

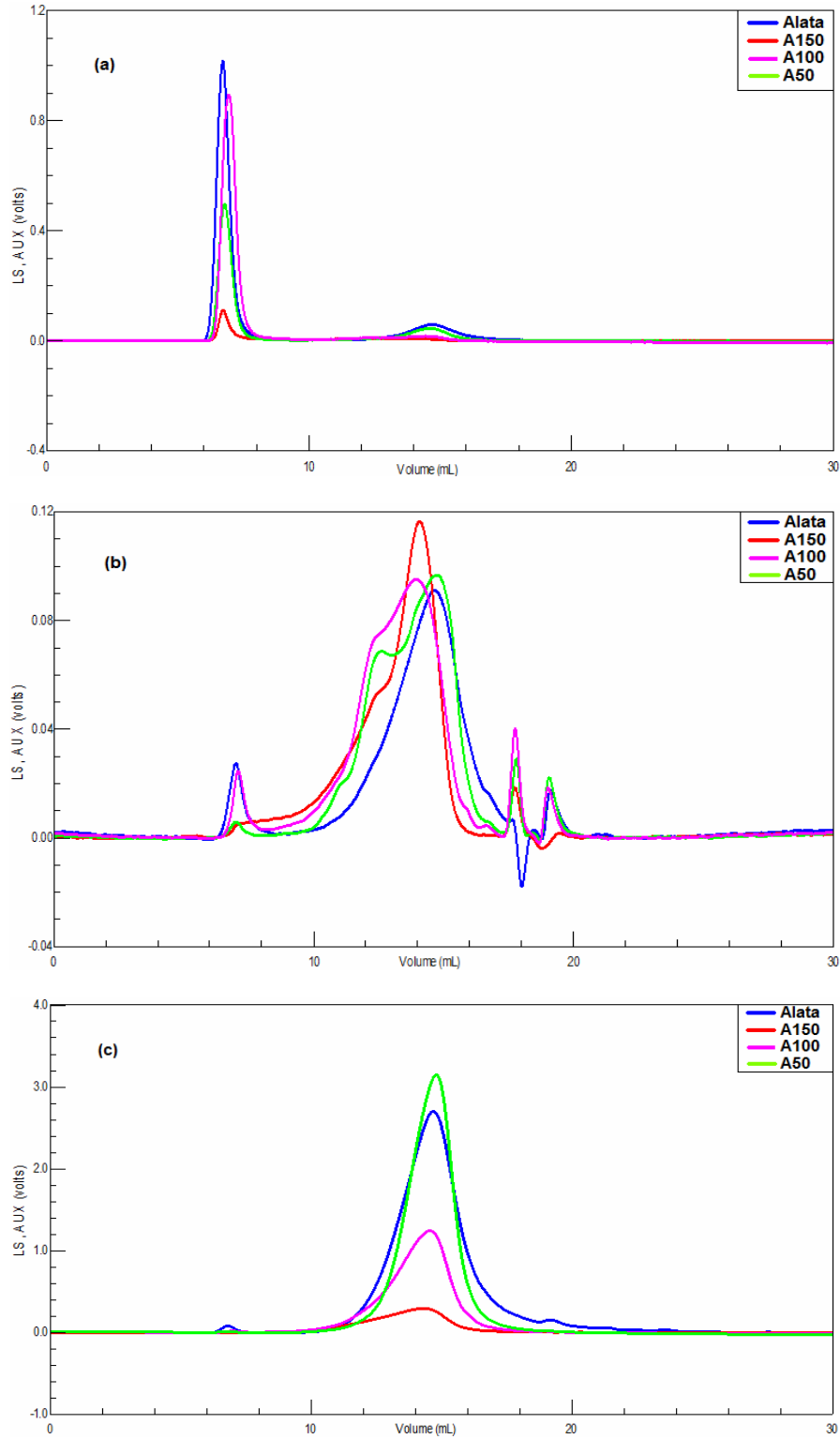
4.3'ten de görüleceği gibi, CO₂ atmosferinde subkritik bölgede yapılan ekstraksiyonlar sonucunda elde edilen polisakkarit ürünlerinin ortalama molekül kütlelerinin (M_p), atmosferik basınçta kaynayan su ile elde edilenden daha küçük değerlerde olması şu ana kadar söylenenleri desteklemektedir. Son olarak, Çizelge 4.1'de de görüldüğü gibi, sıcaklık artışı ekstraksiyon verimini de önemli derecede arttırmıştır.

4.2. HPSEC-MALLS Analizleri

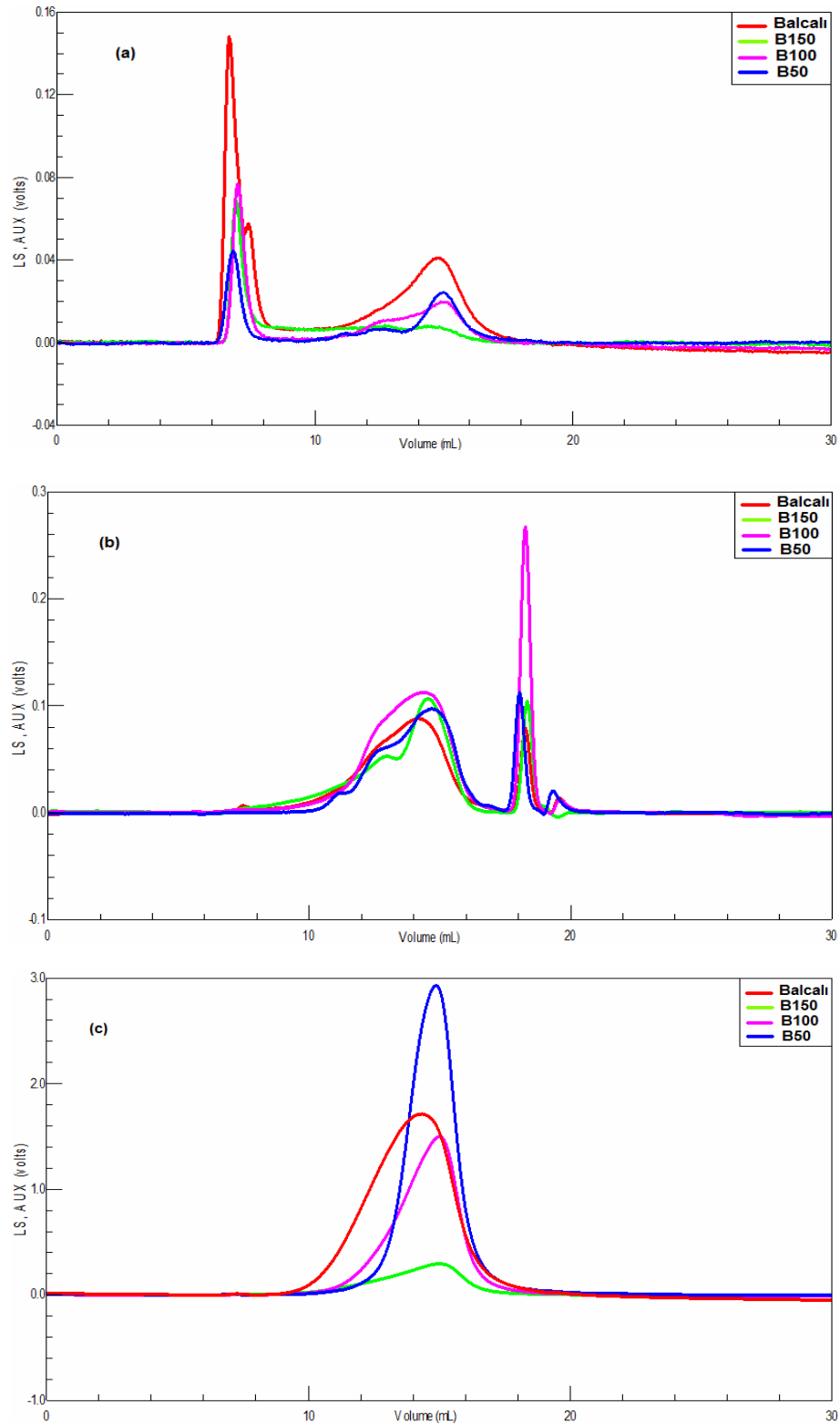
Çalışmanın bu kısmında, 50, 100 ve 150°C'de subkritik su ve sıcak su ile Alata ve Balcalı *Ganoderma lucidum*'un meyve kısımlarından ekstrakte edilen polisakkaritler, MALLS, RI ve UV dedektörleri ile birleştirilmiş bir HPSEC sistemi ile de analiz edilmiştir.

Bu analizlere ait kromatogramlar Şekil 4.6 ve 4.7'de gösterilmektedir. Her iki türün MALLS kromatogramlarında iki farklı polisakkarit fraksiyonu gözlenmiştir (Şekil 4.6a ve 4.7a). Bu fraksiyonların kütlece ortalama molekül kütleleri (M_w) Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Birinci fraksiyon, her iki türde de, polisakkarit çözeltisi içerisinde tam olarak çözünmeyen türleri (agregatlar) göstermektedir. Bu fraksiyonun M_w değerleri, Alata ve Balcalı türlerinin sıcak su ekstraktları için sırasıyla $5,282 \times 10^6$ ve $3,816 \times 10^6$ Da olarak hesaplatılmıştır. Çizelge 4.4'te görüldüğü gibi, bu kütleler, atmosferik koşullarla kıyaslandığında, subkritik su ekstraktlarında sıcaklık artışıyla yavaşça düşerken, pik yüksekliği 100 ve 150°C subkritik su ekstraktlarının MALLS kromatogramlarında bir düşüş göstermiştir (Şekil 4.6a ve 4.7a). Bu durum özellikle 150°C daha fazla olmuştur. Bu sonuçlar, sıcak su ekstraktında agregatların olabileceğini ve daha sert ekstraksiyon koşulları ile bunların kaybolabileceğini göstermiştir. RI dedektörü ise, bu agregatların çözeltideki konsantrasyonları çok düşük olduğu için, Balcalı'da herhangi bir sinyal vermemiştir (Şekil 4.7b). Ancak Alata *Ganoderma lucidum* polisakkaritinin Şekil 4.6b'de gösterilen RI dedektör cevabı, polisakkarit çözeltisinde tam olarak çözünmeyen türler diye adlandırdığımız bu agregatların düşük konsantrasyonda da olsa var olduğunu ve sıcaklık artışıyla çözünerek çözelti ortamına geçtiğini göstermektedir.



Şekil 4.6. Sıcak su, 50, 100 ve 150° C’de Alata *Ganoderma lucidum*’dan ekstrakte edilmiş polisakkaritlerin üst üste çakıştırılmış HPSEC kromatogramları. **a)** MALLS dedektör cevabı; **b)** RI dedektör cevabı; **c)** UV dedektör cevabı



Şekil 4.7. Sıcak su, 50, 100 ve 150° C’de Balçalı *Ganoderma lucidum*’dan ekstrakte edilmiş polisakkaritlerin üs üste çakıştırılmış HPSEC kromatogramları. **a)** MALLS dedektör cevabı; **b)** RI dedektör cevabı; **c)** UV dedektör cevabı

Çizelge 4.4. Alata ve Balcalı *Ganoderma lucidum* polisakkaritlerinin HPSEC-MALLS analizi sonucu hesaplanan ortalama molekül kütleleri (M_w)

Örnek Adı	Pik 1 (Da)	Pik 2 (Da)
A50	$1,253 \times 10^7$	$5,064 \times 10^4$
A100	$5,924 \times 10^6$	$4,687 \times 10^4$
A150	$2,901 \times 10^6$	$1,022 \times 10^4$
Alata*	$5,282 \times 10^6$	$8,535 \times 10^4$
B50	$6,279 \times 10^6$	$4,311 \times 10^4$
B100	$1,749 \times 10^6$	$2,662 \times 10^4$
B150	$8,140 \times 10^5$	$2,672 \times 10^4$
Balcali*	$3,816 \times 10^6$	$6,279 \times 10^4$

*Atmosferik koşullarda ekstrakte edilen *Ganoderma lucidum* mantar türlerinin polisakkaritleri

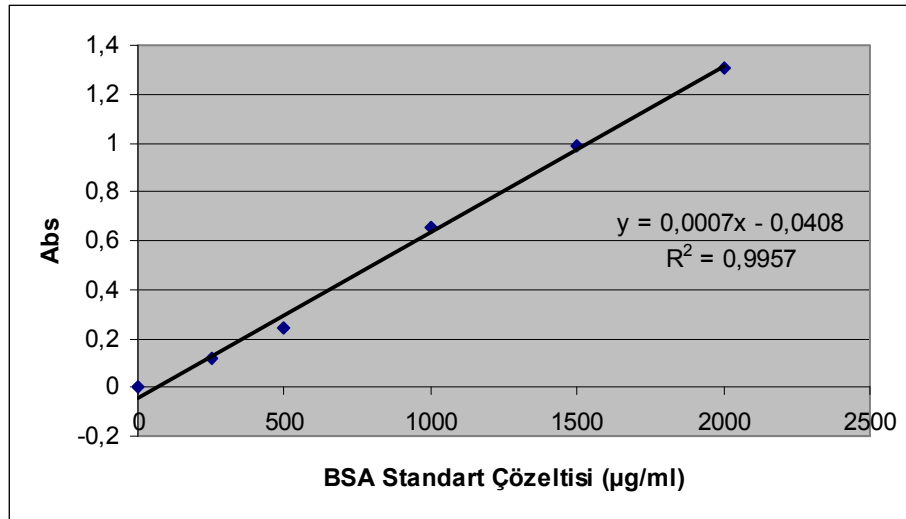
İkinci fraksiyonda da, farklı ekstraksiyon koşulları için, pik profili ve molekül kütlesi dağılımlarında değişiklik gözlenmiştir (bakınız: Ek-B, HPSEC kromatogramları (MALLS-RID)). Bu fraksiyona ait M_w değerleri Çizelge 4.4'te görülmektedir. MALLS dedektör cevabına göre (Şekil 4.6a ve 4.7a), sıcaklık artıka her iki türün polisakkaritlerinin molekül kütlelerinin yanı sıra piklerin şiddetinde de bir azalış gözlenmiştir. RI dedektörle alınan sonuçlara bakıldığında (Şekil 4.6b ve 4.7b) ise, her iki türün farklı koşullarda ekstrakte edilen polisakkaritlerinin üst üste çakıştırılmış kromatogramlarındaki pik şekillerinde farklılaşmaların olduğu görülmektedir. Atmosferik koşullarda ekstrakte edilen her iki türün polisakkaritlerinin pik şekilleri daha düzgün iken, subkritik koşullara geçildiğinde pik profillerinde bölünmelerin olduğu ve ekstraksiyon sıcaklığının artmasıyla kromatogramlardaki ikinci pikin şiddetinin arttığı görülmektedir. Buna göre, hesaplanan molekül kütlelerinden de anlaşılacağı gibi, ekstraksiyon koşullarının değişmesi (daha sert hale gelmesi) polisakkaritlerin hidrolize uğramasına neden olmakta ve molekül kütlesi azalmaktadır.

Son olarak, hem Alata hem de Balcalı *Ganoderma lucidum* polisakkaritleri için (Şekil 4.6c ve 4.7c), 280 nm'de yapılan HPSEC-UV analizleri bu polisakkaritlerin yapısal içeriğinde protein de bulunduğunu göstermiştir. Polisakkaritlerin protein içeriği ekstraksiyon sıcaklığının artmasıyla azalmıştır. Her

iki türdeki polisakkaritlerin protein içeriği Lowry protein metodu ile doğrulanmıştır. Buna göre, bu polisakkaritlerin yapısında protein de bulunduğundan glukoprotein olarak adlandırılmıştır. Ek olarak, Balcalı'nın UV kromatogramlarında subkritik su koşullarında sadece tek bir pik gözlenirken, Alata'nın sıcak su ekstraktında bir başka pik de gözlenmiştir. Bu sonuç, çeşitli etkilerle ana molekülden meydana gelen ve büyük moleküller olan agregatların da aynı çözelti ortamında bulunabileceğini göstermektedir.

4.3. Polisakkaritlerin Kimyasal Bileşimi

Alata ve Balcalı *Ganoderma lucidum*'un hem sıcak su hem de subkritik su ile ekstrakte edilen polisakkarit ekstraktlarının kimyasal bileşimi belirlenmiştir. Her iki türün polisakkarit ekstraktlarının % toplam protein miktarı, Lowry protein metoduna göre belirlenmiştir. Bunun için, farklı derişimlerde hazırlanan BSA standartlarının 595 nm dalga boyunda spektrofotometrik UV ölçümleri alınmış ve derişime karşı bu ölçüm sonuçları grafiğe geçirilerek bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir (Şekil 4.8). Bu kalibrasyon eğrisi kullanılarak polisakkaritlerin bileşimindeki protein miktarı yüzde olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.8. BSA standartına ait kalibrasyon eğrisi

Bu sonuçlara göre, sıcak su ile ekstrakte edilmiş polisakkaritin protein içeriği Alata ve Balcalı türleri için sırasıyla % 18,73 ve % 19,20 (kuru bazda) olarak bulunmuştur

(Çizelge 4.5). Ancak 150°C’de subkritik su koşullarında ekstrakte edilmiş polisakkaritlerin protein içeriği Alata için %11,03’e Balcalı için % 5,84’e düşmüştür. Buna göre, Alata’ya kıyasla Balcalı’nın polisakkaritinde (glukoprotein), proteinin uzaklaşması ve/veya denatürasyonu yüksek sıcaklık ve basınç koşullarında daha fazla olmuştur. Aynı zamanda, her iki türün polisakkaritlerinin HPSEC-UV kromatogramlarında pik şiddetinde gözlenen azalma da, subkritik koşullarda artan sıcaklıkla protein içeriğinin azaldığını göstermektedir (Şekil 4.6c ve 4.7c). Sıcak su ekstraktındaki UV dedektör sinyalinin şiddeti, 100°C’deki subkritik su ekstraktından daha fazladır. Bu profile göre, her iki türdeki proteinin azalışı 50°C (Sub-su)< sıcak su ekstraktı< 100°C (Sub-su)<150°C (Sub-su) şeklindedir.

Çizelge 4.5. Alata ve Balcalı *Ganoderma lucidum* polisakkaritlerinin temel bileşenleri (Bakınız: Ek-A Hesaplamalar)

Örnek Adı	Toplam Kütledeki % Şeker İçeriği				
	% Toplam Protein	% Glukoz	% Mannoz	% Galaktoz	% Üronik Asit
Alata	18,73	22,30	6,00	4,69	38,02
A150	11,03	-	-	-	-
Balcalı	19,20	55,35	2,37	1,68	28,76
B150	5,84	-	-	-	-

Alata ve Balcalı *Ganoderma lucidum* polisakkaritlerinin yapısal bileşimindeki monomerler (basit şekerler veya monosakkaritler) de belirlenmiştir. Çalışmanın bu kısmında, sıcak su ile ekstrakte edilen polisakkaritlerdeki şeker içeriğini tespit edebilmek için farklı derişimlerde glukoz, galaktoz, mannoz, ramnoz, arabinoz, ksiloz, fruktoz monosakkarit standartları kullanılmıştır. Bu standartlar ve sülfirik asit ile hidroliz edilen polisakkarit örnekleri Varian HPLC sisteminde analiz edilerek hem polisakkaritlerin yapısındaki monosakkaritler hem de bu monosakkaritlerin miktarları belirlenmiştir. Kantitatif HPLC analiz sonuçlarına göre, toplam kaba polisakkarit kütledeki % D-glukoz, D-mannoz ve D-galaktoz içeriği sırasıyla Alata için %22,30; 6,00; 4,69 ve Balcalı için %55,35; 2,37; 1,68 olarak

hesaplanmıştır. Buna göre, her iki türün polisakkaritlerindeki nötral şeker bileşimi temel olarak D-glukozdan oluşmaktadır. Bunun yanı sıra, farklı miktarlarda D-mannoz ve D-galaktoz da bu polisakkaritlerin bileşiminde bulunmaktadır.

Alata ve Balcalı *Ganoderma lucidum*'un atmosferik koşullarda sıcak su ile elde edilen polisakkarit ekstraktlarının üronik asit içerdiği, kolon kromatografisi ve titrimetrik yöntem ile birbiri ardına yapılan üç tekrar ile belirlenmiştir. Sonuçlar, kuru bazda Alata'nın % 38,02 ve Balcalı'nın ise % 28,76 üronik asit içerdiğini göstermiştir. Her iki türün mantarlarının polisakkaritleri yüklü moleküllerdir. Polisakkaritlerin ana zincirde veya yan gruplarda bu yüklü grupları bulundurması, bu moleküllerin elektrolit çözeltilerinde hidrodinamik hacminin büyümesine ve genişlemesine, bununla birlikte polisakkaritlerin çözünürlüğünün ve diğer fiziksel özelliklerinin de değişmesine neden olacaktır. *Ganoderma lucidum*'un polisakkaritlerinin hidrodinamik davranışı üzerinde iyonik güçlerin etkisi oldukça fazladır. Bu da olasılıkla polisakkarit yapısındaki üronik asit gruplarından kaynaklanmaktadır (Lai ve ark., 2006).

Her iki türün polisakkaritlerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri de belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Alata ve Balcalı *Ganoderma lucidum* polisakkaritlerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri (Bakınız: Ek-A Hesaplamalar)

Örnek Adı	% Nem	pH	% Çözünürlük		Polisakkaritlerdeki % Şeker İçeriği		
			JECFA1 (Bazik)	JECFA2 (Nötral)	% Glukoz	% Mannoz	% Galaktoz
Alata	10,29	6,69	1,53	3,43	72,00	18,55	9,45
A150	2,38	6,64	0,11	-	-	-	-
Balcalı	8,88	6,99	0,10	1,96	93,37	3,18	3,45
B150	1,99	6,66	0,10	-	-	-	-

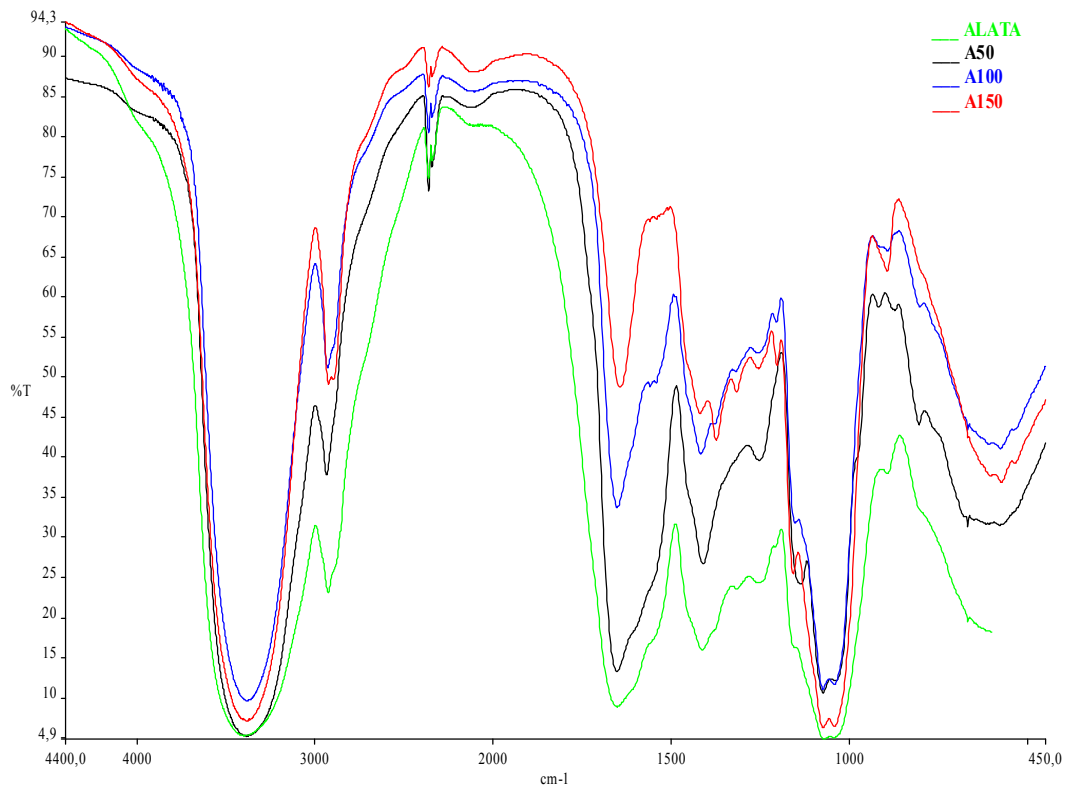
Alata ve Balcalı *Ganoderma lucidum* polisakkaritlerinin nem içerikleri, atmosferik koşullarda sıcak su ile ekstrakte edilenler için sırasıyla %10,29 ve %8,88 olarak hesaplanırken, 150°C'de subkritis su ile ekstrakte edilenler için sırasıyla %2,38 ve

%1,99 olarak belirlenmiştir (bakınız: Ek-A: Hesaplamalar). Bu sonuçlara göre, ekstraksiyon sıcaklığındaki artış bu polisakkaritlerin nem içeriklerinin azalmasında etkili olmuştur. Tüm polisakkaritlerin % 0,5'lik (w/w) sulu çözeltilerinin pH'sı her iki ekstraksiyon koşulunda nötrale yakın çıkmıştır. Kuru bazda polisakkarit örneklerinin nötral (JECFA2) ve alkali (JECFA1) çözeltilerdeki çözünürlük testlerine göre, atmosferik koşulda sıcak su ile ekstrakte edilen Alata ve Balcalı türlerinin polisakkaritlerinin alkali ortamda çözünmeyen kısımlarının miktarı sırasıyla % 1,53 ve % 0,10 iken, nötral ortamda % 3,43 ve % 1,96 olarak belirlenmiştir. 150°C'de subkritik su ile ekstrakte edilmiş Alata ve Balcalı polisakkarit ekstraktlarının alkali ortamdaki çözünmeyen kısımlarının değerleri ise sırasıyla, % 0,11 ve % 0,10 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, Balcalı'nın sıcak su ile elde edilen polisakkarit ekstraktlarının Alata'ya göre hem alkali hemde nötral çözeltilerde çok daha iyi çözüldüğünü göstermiştir. Her iki türün 150°C'de subkritik su ile ekstrakte edilen polisakkaritleri ise nötral ortamda tamamen çözünmektedir. Bu sonuçlar, çözücü olarak su kullanıldığında (nötral ortamda), çözeltide agregatların yoğun olarak bulunduğunu gösterebilir. Ancak alkali çözeltilerde ise sadece polisakkarit moleküllerinin değil, çok daha büyük moleküller olan ve çözelti ortamında birlikte bulunan agregatların da oldukça iyi çözüldükleri belirlenmiştir. Farklı çözücülerde polisakkaritlerin çözünürlüklerinde tespit edilen böyle farklılıkların, bu büyük moleküllerin farklı çözücü ortamında değişik konformasyonlarda bulunmalarından kaynaklanabileceği söylenebilir.

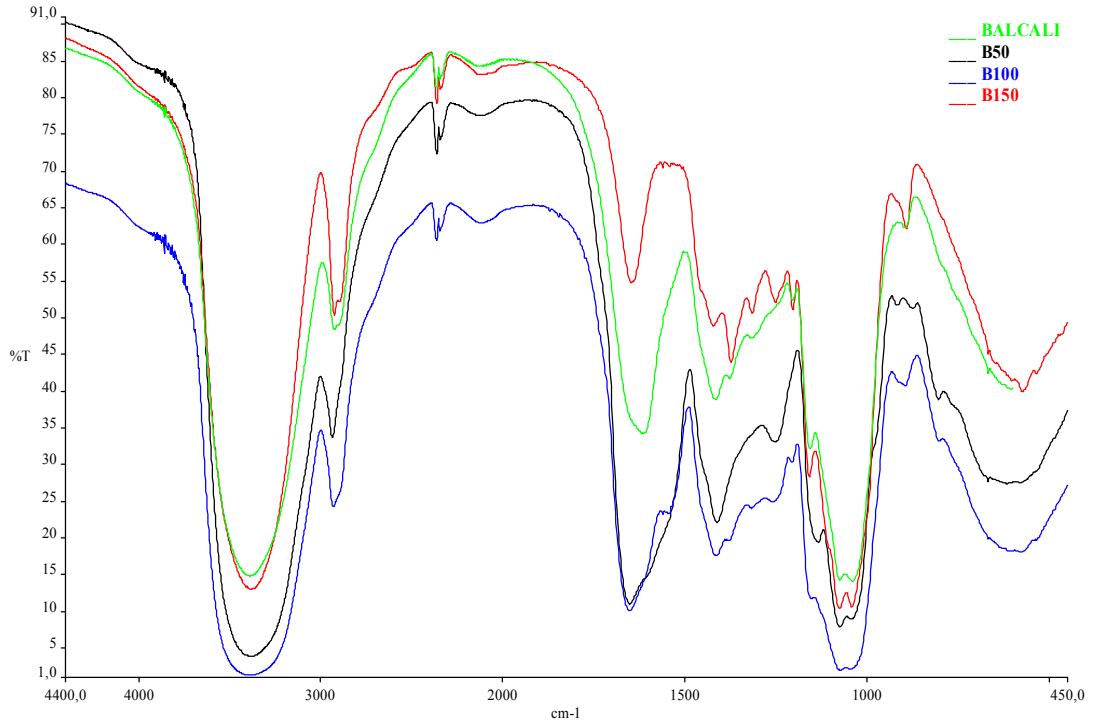
Atmosferik koşullarda ekstrakte edilen Alata ve Balcalı polisakkarit ekstraktlarının bileşiminde bulunan D-glukoz, D-mannoz ve D-galaktozun polisakkarit yapısındaki bileşimleri de hesaplanmıştır. Buradan elde edilen sonuçlara göre, Alata polisakkaritlerinin temel yapısı D-glukoz'dan meydana gelirken (%72,00); %18,55 ve %9,45 oranında sırasıyla D-mannoz ve D-galaktoz da içermektedir. Balcalı polisakkaritlerinin de yapısının büyük bir kısmını D-glukoz (%93,37) oluşturmaktadır ve bu Alata'ya kıyasla çok daha fazladır. D-mannoz ve D-galaktoz ise, Alata'ya göre, daha az miktarda bulunmuştur (sırasıyla % 3,18 ve %3,45).

4.4. Infrared Sonuçları

Bölüm 4.3’de bahsedildiği gibi, Alata ve Balcalı *Ganoderma lucidum*’un polisakkaritlerinin yapısal olarak bileşimini protein, glukoz, mannoz, galaktoz ve üronik asit grupları oluşturmaktadır. Polisakkaritlerin yapısındaki bu grupların bazılarını karakterize etmek için farklı sıcaklıklarda elde edilen her iki türe ait polisakkarit ekstraktlarının infrared spektrumları alınmıştır (Şekil 4.9 ve 4.10; bakınız: Ek-C, her bir türün infrared spektrumları).



Şekil 4.9. Alata *Ganoderma lucidum*’dan 50, 100, 150°C’de subkritik ve sıcak su ile ekstrakte edilen polisakkaritlerin IR spektrumu



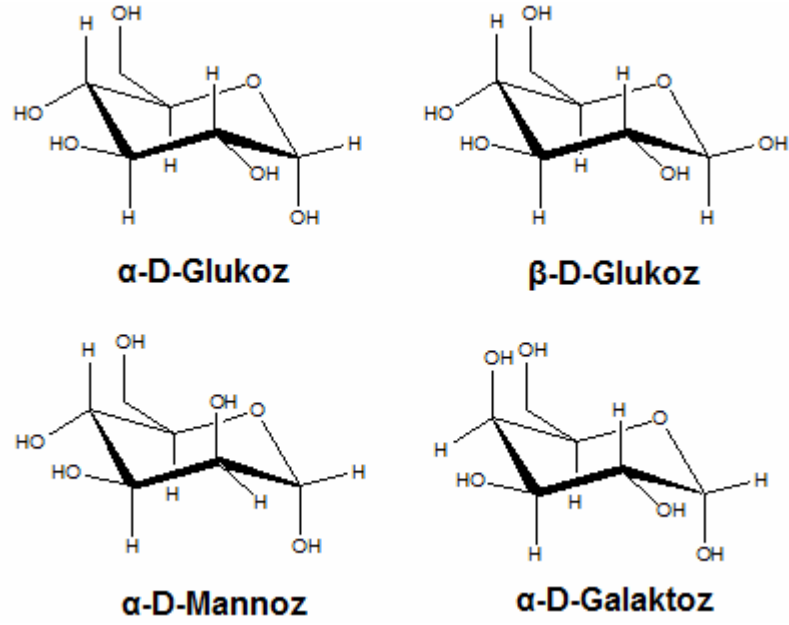
Şekil 4.10. Balcalı *Ganoderma lucidum*'dan 50, 100, 150°C'de subkritik ve sıcak su ile ekstrakte edilen polisakaritlerin IR spektrumu

Her iki türün farklı ekstraksiyon koşullarında ekstrakte edilen polisakaritlerinin üst üste çakıştırılmış infrared spektrumları benzerlik göstermektedir. Hem Alata hem de Balcalı'ya ait spektrumlara bakıldığında sıcaklık artışıyla birlikte spektrumun bazı bölgelerinde farklılıklar gözlenmiştir. 3600–1200 cm^{-1} 'e kadar olan ve yapıda hangi fonksiyonel grupların mevcut olduğunu gösteren *grup frekansları bölgesini* ele aldığımızda, bu bölgede 3500–3200 cm^{-1} 'de görülen geniş, yayvan ve şiddetli band C-OH grubundaki O-H (H-bağlı) geriliminden kaynaklanmaktadır. 1450-1200 cm^{-1} aralığında gözlenen bandlar ise O-H ve C-H eğilme titreşimlerini göstermektedir (El-Mahdaoui ve ark., 1997). Bununla birlikte, yaklaşık 2925 cm^{-1} frekansındaki bandlar C-H gerilimlerini göstermektedir. Grup frekansları bölgesinde dikkat çeken diğer bir band da 1600–1660 cm^{-1} aralığında gözlenen C=O gerilimine ait şiddetli banddır. Bu bandın şiddeti de sıcaklık artışıyla daha keskin hale gelmiştir.

Alata ve Balcalı *Ganoderma lucidum* polisakarit ekstraktlarının infrared spektrumlarında *parmak izi bölgesindeki* (1200–600 cm^{-1}) belirgin bandlarından ilki

1100-900 cm^{-1} aralığındaki C-O ve C-C gerilme titreşimlerine aittir. Daha önceki çalışmalarda, polisakkaritlerde mevcut olan bazı basit şekerlerin (monosakkaritler) infrared absorpsiyon bandları kaydedilmiştir. Buradan elde edilen bilgilere göre, mannan için 870 ve 810 cm^{-1} 'deki absorpsiyon bandları karakteristik iken (Mathlouthi ve Koenig, 1986), 920 ve 800 cm^{-1} 'deki bandlar mannozun varlığını göstermiştir (Peng ve ark., 2005b). Buna ek olarak, 920 ve 850 cm^{-1} 'de gözlenen absorpsiyon bandının α -D-glukan'ı ve 890 cm^{-1} 'deki bandının ise β -D-glukan'ı karakterize ettiği belirtilmiştir (Bao ve ark., 2001a, Peng ve ark., 2005a,). Bu bilgiler ışığında, A50 ve B50'nin infrared spektrumlarında sırasıyla 918 ve 917 cm^{-1} 'de gözlenen zayıf bandın α -D-glukan'ı ve yine bu bölgede 805 ve 803 cm^{-1} 'deki zayıf absorpsiyon bandının Alata ve Balcalı mantar türlerinin polisakkaritlerinin içeriğinde bulunan ve basit şekerlerden biri olan mannozu temsil ettiği söylenebilir. Bununla birlikte, Alata ve Balcalı'nın sıcak su polisakkarit ekstaktları ile A100, A150 ve B100, B150 polisakkaritleri için, sıcaklık arttıkça daha belirgin hale gelen ve yaklaşık 895 cm^{-1} 'de gözlenen absorpsiyon bandının D-glukanın β - konfigürasyonu (β -D-glukan) için karakteristik olduğu ifade edilebilir.

Grup frekansı ve parmak izi bölgesinden elde edilen sonuçlar karşılaştırılırsa, grup frekansı bölgesinde belirlenen –OH gruplarından kaynaklanan geniş, yayvan ve şiddetli absorpsiyon bandı ile C-H gerilimlerinin neden olduğu absorpsiyon bandı, her iki türün polisakkaritlerinde bulunan ve parmak izi bölgesinde de tanımlanan monosakkaritlerin yapılarındaki (Şekil 4.11) gruplarla eşdeğerlik göstermektedir. Spektrumlara bakıldığında, 1600–1660 cm^{-1} 'deki keskin bandın ise polisakkaritlerin yapısındaki karbonil gruplarına (C=O) ait olduğu söylenebilir. Parmak izi bölgesinde 1100–900 cm^{-1} aralığında görülen bandların ise basit şekerlerin yapısındaki C-O-C geriliminden kaynaklandığı söylenebilir.



Şekil 4.11. Bazı monosakkaritlerin (basit şekerler) halka şekilleri

Ayrıca, spektrumlardan da anlaşılacağı gibi sıcaklık yükseldikçe piklerin şiddeti de değişmektedir. Bununla birlikte, sıcaklık artışıyla mannoz ve α -D-glukan'a ait pikler kaybolmakta ancak β -D-glukan'a ait pikin şiddeti artmaktadır. Böyle bir sonuç, bu polisakkaritin ana zincirini β -D-glukan'ların oluşturduğunu, yan dallarda da mannoz ve α -D-glukan ünitelerinin bulunabileceğini göstermektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- 1) Alata ve Balcalı *Ganoderma lucidum* mantar türlerinin içeriğindeki bileşenlerden biri olan polisakkaritlerin ekstraksiyonu ve hidrolizinde, yüksek sıcaklık ve basınçta subkritik su koşullarının kullanımı, atmosferik koşullarda sıcak su ile yapılan ekstraksiyonlara göre daha etkili olmuştur. Yüksek sıcaklık ve basıncın yanı sıra, ortama karbondioksit gazının ilavesi de bu polisakkaritlerin hidrolizini hızlandırmıştır. Bu durum, polisakkaritlerin hidrolizinde karbondioksitin, bilinen asitlere kıyasla, ılımlı bir asit katalizörü olarak rol oynadığını göstermiştir. Çözücü olarak su katalizör olarak da karbondioksit birleşiminin kullanıldığı bu tür ekstraksiyon sistemleri çevresel olarak da tehlike arz etmemektedir.
- 2) Polisakkarit ekstraktlarının moleküler kütle dağılımlarının belirlenmesinde hem standart GPC (SEC) hem de MALLS, RID ve UV dedektör ile kombine edilmiş HPSEC-MALLS sistemleri kullanılmıştır. Bu analiz sonuçları, Alata ve Balcalı *Ganoderma lucidum* polisakkaritlerinin glukoprotein olduklarını ve polisakkarit çözeltisinde tam olarak çözünmeyen türleri (agregatlar) de içerdiğini göstermiştir. Her iki türün polisakkaritlerinin protein içerdiği hem 280 nm'de alınan UV sinyali hem de Lowry protein metodu ile kanıtlanmıştır. Bu polisakkaritlerin moleküler kütleleri ve protein içeriklerinin de yoğun ekstraksiyon koşullarında artan sıcaklıkla azaldığı belirlenmiştir.
- 3) GPC analizlerinde polisakkarit ekstraktlarının moleküler kütle dağılımları, bir standarda göre bağlı olarak hesaplanmıştır. Ancak biyopolimerler ve karbonhidratlar çözelti için de farklı konformasyonlara sahip oldukları ve yapılarındaki fonksiyonel gruplar kolonla farklı etkileşebileceği için bir standarda bağlı olarak hesaplatılan moleküler kütleler tam olarak doğru olmayacaktır. Ancak HPSEC-MALLS sisteminin kullanımı bu tür polimerik yapıların moleküler kütlelerini bir standarda bağlı olmaksızın mutlak olarak hesaplayabilme avantajı sağlamıştır. Bunun yanı sıra, bu yöntem, molekülün tersiyer yapısı ve dallanmaları hakkında da bilgi de verebilmektedir.

- 4) Monosakkarit analizleri, glukoprotein molekülünün temel olarak D-glukoz ve eser miktarda D-mannoz ve D-galaktozdan oluştuğunu göstermiştir. Bu glukoprotein yapısında uronik asit gruplarının da bulunduğu belirlenmiştir. Bütün polisakkarit ekstraktları için yapılan fiziksel analiz sonuçları ise, tüm polisakkaritlerin nötrale yakın bir pH'da olduğunu, subkritik koşullarında ekstrakte edilen her iki türün polisakkaritlerinin sıcak su ile ekstrakte edilenlere göre daha düşük nem içeriğine sahip olduğunu ve bu polisakkaritlerin nötral ve alkali ortamda çözünebildiklerini göstermiştir.
- 5) Polisakkarit ekstraktlarının kimyasal bileşiminde bulunan yapıları karakterize etmek için FT-IR spektroskopisinden yararlanılmıştır. Farklı ekstraksiyon koşullarında elde edilen polisakkaritlerin infrared spektrumlarında bazı frekanslarda gözlenen pik şiddetlerindeki değişikliklere göre, bu polisakkaritlerin ana zincirinin β -D-glukan ünitelerinden, yan dalların ise D-mannoz, α -D-glukan ünitelerinden oluşabileceği belirlenmiştir. Ancak bu polisakkarit yapılarındaki dallanma noktalarını ve ana zincirin nasıl bir bağlanma türüne sahip olduğunu tam olarak belirlemek için bir takım kimyasal yöntemlerle birlikte GC-MS analizleri ve ^1H , ^{13}C NMR spektroskopisi yöntemi kullanılabilir.
- 6) *Ganoderma lucidum*, vücut direncini artırmak için tıbbi olarak kullanılan mantarlardan biridir. Bu mantarın meyve kısmı ve miselinden izole edilen polisakkaritler anti-tümör, iltihap önleyici, anti-viral, kan basıncını düzenleyici, bağışıklık uyarıcı etkiler gösterdiği için özellikle dikkat çekmektedir. Özellikle bağışıklık uyarıcı ve anti-tümör etkileri üzerine pek çok araştırma ve çalışma yapılmıştır. Çalışmamızda kullanılan Alata ve Balcalı *Ganoderma lucidum* mantar türlerinden elde edilen polisakkarit ekstraktları üzerinde de bazı mikrobiyolojik ve immünolojik testler yapılarak, bunların anti-tümör ve bağışıklık uyarıcı etkileri de araştırılabilir.

KAYNAKLAR

- ADSCHIRI, T., HIROSE, S., MALALUAN, R. M., ARAI, K., 1993. Uncatalytic conversion of cellulose in subcritical and supercritical water. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 26, 676-680.
- AKIYA, N., SAVAGE, P.E., 2002. Roles of water for chemical reactions in high-temperature water. *Chemical Review*, 102, 2725–2750.
- BAO, X.F., DUAN, J., FANG X., FANG, J., 2001a. Chemical modifications of the (1→3)- α -D-glucan from spores of *Ganoderma lucidum* and investigation of their physicochemical properties and immunological activity. *Carbohydrate Research*, 336, 127–140.
- BAO, X.F., FANG, J., LI, X., 2001b. Structural characterization and immunomodulating activity of a complex glucan from spores of *Ganoderma lucidum*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 65 (11), 2384–2391.
- BAO, X. F., LIU, C., FANG, J., LI, X., 2001c. Structural and immunological studies of a major polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. *Carbohydrate Research*, 332, 67–74.
- BAO, X.F., WANG, X.S., DONG, Q., FANG, J.N., LI, X.Y., 2002a. Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 59, 175–181.
- BAO, X.F., ZHEN, Y., RUAN, L., FANG, J.N., 2002b. Purification, characterization, and modification of T lymphocyte-stimulating polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum*. *Chemical and Pharmacology Bulletin*, 50 (5), 623–629.
- BOBLETER, O. 1994. Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Progress in Polymer Science*, 19, 797–841.
- BONN, G., CONCIN, R., BOBLETER, O. 1983. Hydrothermolysis-a new process for the utilization of Biomass. *Wood Science Technology*, 17, 195–202.
- BORCHERS, A. T., STERN, J. S., HACKMAN, R. M., KEEN, C. L., GERSHWIN, M. E., 1999. Mushrooms, tumors and immunity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 221, 281–293.

- BRÖLL, D., KAUL., C., KRÄMER, A., KRAMMER, P., RÍCHTER, T., JUNG, M., VOGEL, H., ZEHNER, P., 1999. Chemistry in supercritical water. *Angewandte Chemie International Edition*, 38, 2998–3014.
- CHANG, R.Y., 1995. Effective dose of *Ganoderma* in humans. In *Ganoderma: Systematics, Phytopathology and Pharmacology*. 5 th International Congress, Vancouver.
- CHANG, Y.W., LU, T.J., 2004. Molecular characterization of polysaccharides in hot-water extracts of *Ganoderma lucidum* fruiting bodies. *Journal of Food and Drug Analysis*, Volume 12, 1, 59–67.
- CHEN, A.W. and MILES, P.G., 1996. Biomedical research and the application of mushroom nutraceuticals from *Ganoderma lucidum*. *Proceedings of 2 nd International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products* (ed. Roycse, D.J.), Penn State University, PA.
- CHURCH, J., WOOLDRIDGE, D. 1981. Continuous High Solids Acid Hydrolysis of Biomass in a ½ -in. Plug Flow Reactor. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development*, 20, 371–378.
- DI, X., CHAN, K.K.C., LEUNG, H.W., HUIE, C.W., 2003. Fingerprint profiling of acid hydrolyzates of polysaccharides extracted from the fruiting bodies and spores of Lingzhi by high-performance thin layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1018, 85–95.
- DUNNING, J.W., LATHROP, E.C. 1945. Saccharification of Agricultural residues—a continuous process. *Industrial & Engineering Chemistry*, 37, 24–29.
- EHARA, K., SAKA, S. 2002. A comparative study on chemical conversion of cellulose between the batch-type and flow-type systems in supercritical water. *Cellulose*, 9, 301–311.
- EL-MAHDAOUI, L., NEAULT, J.F., TAJMIR-RIAHÍ, H.A., 1997. Carbohydrate-nucleotide interaction. The effects of mono- and disaccharides on the solution structure of AMP, dAMP, ATP, GMP, dGMP, and GTP studied by FTIR difference spectroscopy. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 65, 123–131.
- FUJIMIYA, Y., SUZUKI, Y., KATAKURA, R., EBINA, T., 1999. Tumor-specific cytotoxic and immunopotentiating effects of relatively low molecular weight

- products derived from the Basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill. Anticancer Research, 19, 113–118.
- GILBERTSON, R. & RYVARDEN, L., 1986. North American Polypores: Volume I & II. Fungi Flora, Oslo, Norway.
- GLASSER, L., 2004, Water, water, everywhere. Journal of Chemical Education, 81, 414–418.
- HOBBS, C., 1995. Medicinal Mushrooms: An Exploration of Tradition, Healing and Culture. Botanica Pres, Santa Cruz, CA.
- HSEU, R. S., WANG, H. H., WANG, H. F., MONCALVO, J. M., 1996. Differentiation and grouping of isolates of the *Ganoderma lucidum* complex by random amplified polymorphic DNA-PCR compared with grouping on the basis of internal transcribed spacer sequences. Applied and Environmental Microbiology, 62, 1354-1363.
- HSIEH, C., HSU, T.H., YANG, F.C., 2005. Production of polysaccharides of *Ganoderma lucidum* (CCRC36021) by reusing thin stillage. Process Biochemistry, 40, 909–916.
- HSIEH, C., TSENG, M.H., LIU, C.J., 2006. Production of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (CCRC 36041) under limitations of nutrients. Enzyme and Microbial Technology, 38, 109–117.
- HUNTER, S.E., SAVAGE, P.E., 2003. Acid-catalyzed reactions in carbon dioxide-enriched high-temperature liquid water. Industrial & Engineering Chemistry Research, 42, 290–294.
- JONG, S.C. and BIRMINGHAM, J.M., 1992. Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. Advances in Applied Microbiology, 37, 101–134.
- JONG, S.C. ve DONOVICK, R., 1989. Antitumour and antiviral substances from fungi. Advances in Applied Microbiology, 34, 183–262.
- KATRITZKY, A.R., ALLIN, S.M., SISKIN, M., 1996. Aquathermolysis: reactions of organic compound with superheated water. Accounts of Chemical Research, 29, 399–406.

- KIRSCHER, K.N., WOODS, R.J., 2001. Solvent interactions determine carbohydrate conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 98, 10541–10545.
- KLEIN, M.T., TORRY, L.A., WU, B.C., TOWNSEND, S.H., 1990. Hydrolysis in supercritical water: Solvent effects as a probe of the reaction mechanism. *Journal of Supercritical Fluids*, 3, 222–227.
- LAI, L.S., YANG, D.H., 2006. Rheological properties of the hot-water extracted polysaccharides in Ling-Zhi (*Ganoderma lucidum*). *Food Hydrocolloids*, article in press.
- LEUNG, Y. M., FUNG, K. P., CHOY, Y. M., 1997. The isolation and characterization of an immunomodulatory and anti-tumor polysaccharide preparation from *Flammulina velutipes*. *Immunopharmacology*, 35, 255–263.
- LIN, Z.B., 2001. In: Lin, Z.B. (Ed.), *Modern Research of Ganoderma*. Beijing Medical.
- LIU, G-T., 1999. Recent advances in research of pharmacology and clinical applications of *Ganoderma* (P. Korst.) species (Aphyllophoromycetidae) in China. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 1, 63–67.
- MATHLOUTHI, H., KOENIG, J., 1986. Vibrational spectra of carbohydrate. *Advanced in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 44, 7–34.
- MAU, J.L., LIN, H.C., CHEN, C.C., 2001. Non-volatile components of several medicinal mushrooms. *Food Research International*, 34, 521–526.
- MAU, J.L., LIN, H.C., CHEN, C.C., 2002. Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6072–6077.
- MIZUNO, T. (ed.), 1995. *Mushrooms: the versatile fungus-food and medicinal properties*. *Food Reviews International (Special issue)*, Volume II, 1-235.
- MIYAZAWA, T., FUNAZUKURI, T., 2005. Polysaccharide hydrolysis accelerated by adding carbon dioxide under hydrothermal conditions. *Biotechnology Progress*, 21, 1782–1785.

- MOK, W.S-L., ANTAL, M.J., VARHEGYI, G., 1992. Productive and parasitic pathways in dilute acid-catalyzed hydrolysis of cellulose. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 31, 94–100.
- MONCALVO, J. M., WANG, H. H., HSEU; R. S., 1995a. Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia*, 87, 223–238.
- MONCALVO, J. M., WANG, H. H., HSEU; R. S., 1995b. Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complex based on ribosomal DNA sequences: comparison with traditional taxonomic characters. *Mycological Research*, 99, 1489–1499.
- MONDAL, S., CHAKRABORTY, I., PRAMANIK, M., ROUT, D., and ISLAM, S.S., 2004. Structural studies of water-soluble polysaccharides of an edible mushroom, *Termitomyces eurhizus*. Are investigation. *Carbohydrate Research*, 399, 1135–1140.
- NAKAHARA, M., YAMAGUCHI, T., OHTAKI, H., 1997. Structure of water and aqueous electrolyte solutions under extreme conditions. *Recent Research Developments in Physical Chemistry* 1, 17–49.
- OHTAKI, H., 2003. Effects of temperature and pressure on hydrogen bonds in water and in formamide. *Journal of Molecular Liquids*, 103/104, 3–13.
- PENG, Y., ZHANG, L. ZENG, F., KENNEDY, J. F., 2005a. Structure and antitumor activities of the water-soluble polysaccharides from *Ganoderma tsugae* mycelium. *Carbohydrate Polymers*, 59, 385–392.
- PENG, Y., ZHANG, L. ZHANG, Y., XU, X., KENNEDY, J. F., 2005b. Solution properties of water-insoluble polysaccharides from the mycelium of *Ganoderma tsugae*. *Carbohydrate Polymers*, 59, 351–356.
- SAKAKI, T., SHIBATA, M., MIKI, T., HIROSUE, H., 1996. Decomposition of cellulose in near-critical water and fermentability of the products. *Energy Fuels*, 10, 684–688.
- SASAKI, M., BERNARD, M.K., MALALUAN, R.M., HIROSE, S., TAKEDA, N., DSHIRI, T., ARAI, K., 1998. Cellulose in subcritical and supercritical water. *Journal of Supercritical Fluids*, 13, 261–268.

- SASAKI, M., FANG, Z., FUKUSHIMA, Y., ADSCHIRI T., ARAI, K. 2000. Dissolution and hydrolysis of cellulose in subcritical and supercritical water. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 39, 2883–2890.
- SHOTIPRUK, A., KIATSONGSEEM, J., PAVASANT, P., GOTO, M., and SASAKI M., 2004. Pressurized Hot Water Extraction of Anthraquinones from the Roots of *Morinda citrifolia*. *Biotechnology Progress*, 20, 1872–1875.
- SOLOMONS, T. W. G., FRYHLE B. C., 2000. *Organic Chemistry* (G. Okay, Y. Yıldırım). 7. baskı, Mart Matbaacılık, İstanbul, 1144–1147.
- STAMETS, P., 1993 and 2000 (3rd edition). *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. Ten Speed Press, PO Box 7634, Olympia, WA.
- STAMETS, P., 1999 and 2000 (3rd edition). *MycoMedicinals, an informative booklet on medicinal mushrooms*. Mycomedica, Olympia, Washington.
- STAMETS, P., 2000 (3rd edition). *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. Ten Speed Press, PO Box 7123, Berkeley, California, 352–366.
- THOMSON, D., GRETHLEIN H.E., 1979. Design and evaluation of a plug-flow reactor for the acid hydrolysis of cellulose. *Industrial & Engineering Chemistry Research and Development*, 18, 166–169.
- TOWNSEND, S.H., ABRAHAM, M.A., HUPPERT, G.L., KLEIN, M.T., PASPEC, S.C., 1988. Solvent effects during reactions in supercritical water. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 27, 143–149.
- UMEMURA, M., YUGUCHI, Y., HIROTSU, T., 2005. Hydration at glycosidic linkages of malto- and cello-oligosaccharides in aqueous solution from molecular dynamics simulation: Effect of conformational flexibility. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 730, 1–18.
- WAGNER, W. and PRUSS, A., 2002, The IAPWS formulation 1995 for the thermodynamic properties of ordinary water substance for general and scientific use. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 31, 387–535.
- WANG, S.Y., HSU, M.L., HSU, H.C., TZENG, S.S., LEE, S.S., SHIAO, M.S. and HO, C.R. 1997. The antitumour effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by

- cytokines released from activated macrophages and T-lymphocytes. *International Journal of Cancer*, 70 (6), 669–705.
- WANG, X.M., YANG, M., GUAN, S.H., LIU, R.X., XIA, J.M., BI, K.S., GUO, D.A., 2006. Quantitative determination of six major triterpenoids in *Ganoderma lucidum* and related species by high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 838–844.
- WASSER, S.P. and WEIS, A.L., 1999a. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives (Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 1, 31–62.
- WASSER, S.P. and WEIS, A.L., 1999b. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Critical ReviewsTM in Immunology*, 19, 65–96.
- YING, J.Z., MAO, X.L., MA, Q.M., ZONG, Y.C. and WENG, H.A., 1987. *Icons of Medicinal Fungi from China* (Transl. Xu, Y.H.). Science Press, Beijing.
- ZHAO, J.D., 1989. The Ganodermataceae in China. *Bibliotheca Mycologica*, 132.
- ZHAO, J.D. and ZHANG, X.-Q., 1994. Resources and taxonomy of Lingzhi (*Ganoderma*) in China. From program and extracts of the 1994 International Symposium in *Ganoderma* Research, Beijing, Beijing Medicinal University.
- Anonim, 2006a, http://www.fruiting-bodies.co.uk/cancer_research/cr_chapter3.htm
- Anonim, 2006b, [http://www.fungichina.com/mushroomextract/Ganodermalucidum\(reishi\)polysaccharide.htm](http://www.fungichina.com/mushroomextract/Ganodermalucidum(reishi)polysaccharide.htm)
- Anonim, 2006c, http://en.wikipedia.org/wiki/Ganoderma_lucidum
- Anonim, 2006d, <http://www.reishiessence.com/whatisreishi.html>
- Anonim, 2006e, www.mskcc.org/mskcc/html/69353.cfm
- Anonim, 2006f, <http://en.wikipedia.org/wiki/Reishi>
- Anonim, 2006g, http://www.thehealthspot.com/Ganoderma_Lucidum/Ganoderma_Lucidum.htm
- Anonim, 2006h, <http://www.lsbu.ac.uk/water/hypol.html>
- Anonim, 2006i, <http://www.chemicaland21.com/lifescience/phar/ERGOSTEROL.htm>

Anonim, 2006i, <http://www.icgeb.trieste.it/~p450srv/ligand/ergosterol.html>
Anonim, 2006j, <http://en.wikipedia.org/wiki/Alkaloids>
Anonim, 2006k, <http://en.wikipedia.org/wiki/Coumarin>
Anonim, 2006l, <http://en.wikipedia.org/wiki/Mannitol>
Anonim, 2006m, <http://en.wikipedia.org/wiki/Lactone>
Anonim, 2006n, <http://en.wikipedia.org/wiki/Riboflavin>
Anonim, 2006o, www.chemfinder.com
Anonim, 2006ö, http://en.wikipedia.org/wiki/Ascorbic_acid
Anonim, 2006p, <http://www.netsci-journal.com/97v4/97014/vitc2.html>
Anonim, 2006r, <http://web1.caryacademy.org/chemistry/rushin/StudentProjects/CompoundWebSites/2001/AscorbicAcid/referenc.htm>
Anonim, 2006s, http://www.biology.arizona.edu/biochemistry/problem_sets/aa/aa.html
Anonim, 2006ş, <http://www.cem.msu.edu/~reusch/VirtTxtJml/proteins.htm>
Anonim, 2007a, zeus.plmsc.psu.edu/~manias/MatSE443/chapter10-2.pdf
Anonim, 2007b, www.chromaceutical.com/cc103.pdf

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Adana'da doğdum. İlköğrenimimi Kasım Sacide Ener İlkokulu'nda, orta öğrenimimi okul birincisi olarak Sıtkı Kulak Ortaokulu'nda ve lise öğrenimimi Ahmet Kurttepelı Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi'nde tamamladım. 2000 yılında Çukurova Üniversitesi Kimya Bölümü'nde başladığım lisans eğitimini 2004 yılında tamamladım. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü yüksek lisans programına kaydoldum.

EK-A

HESAPLAMALAR

Protein Miktarı:

$$M_1 = \frac{A + m}{1000 \times 0,0007}$$

$$\text{Toplam Protein Miktarı (\%)} = \frac{M_1}{M_2 \times 1000} \times 100$$

A: Örneğin absorbans değeri

m: Eğim

M₁: Protein miktarı, mg

M₂: Örnek miktarı, g

Üronik Asit Miktarı:

$$\text{Eşdeğer gram asit} = \frac{m_1 \times 1000}{V_t \times M_{\text{NaOH}}}$$

$$\% \text{ Üronik asit} = \frac{MA_{\text{üronik asit}}}{\text{Esdeğer gram asit}}$$

m₁: Örneğin kütlesi, mg

V_t: Titrant hacmi, ml

M_{NaOH}: Sodyum hidroksit çözeltisinin derişimi, mol/L

MA_{üronik asit}: Üronik asitin molekül ağırlığı, 194 g/mol

Çözünürlük Testleri:

Bazık ortamda çözünürlük testi (JECFA1):

$$\text{Toplam çözünmeyen kısım (\%)} = \frac{(m_2 - m_1)}{m_0} \times 100$$

Nötral ortamda çözünürlük testi (JECFA2):

$$\text{Toplam çözünmeyen kısım (\%)} = \frac{(m_2 - m_1)}{m_0} \times 100$$

m_1 : Filtre kağıdının kütlesi, g

m_2 : Filtre kağıdı + örnek miktarı, g

m_0 : Başlangıçtaki örnek miktarı, g

Nem Miktarı:

$$\% \text{ Nem} = \frac{M_1 - M_2}{S} \times 100$$

M_1 : Kroze + Örnek miktarı, g

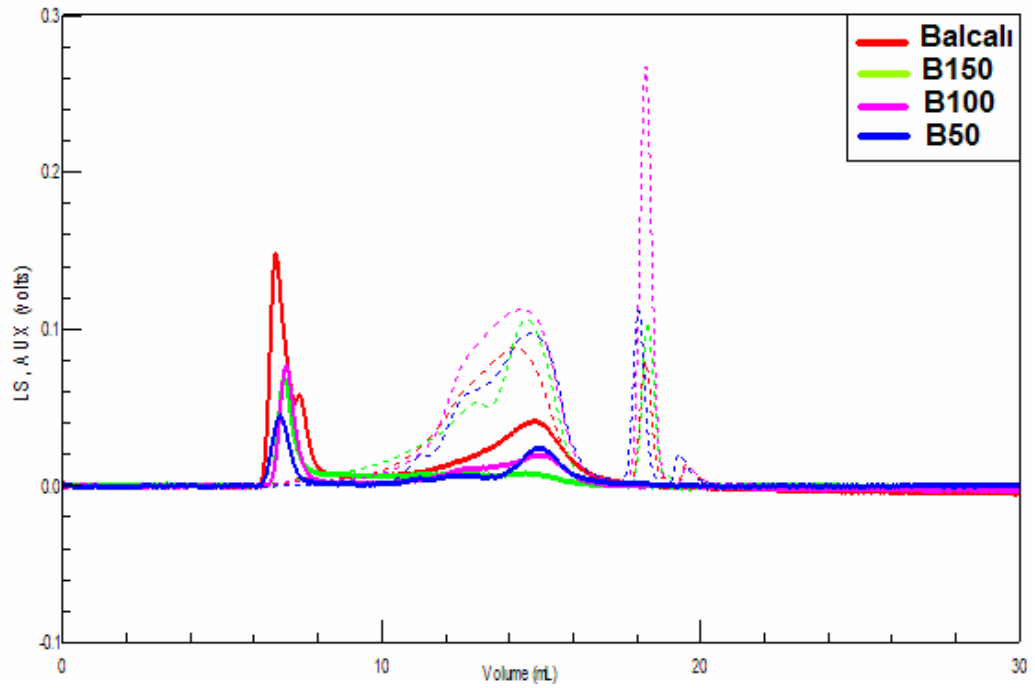
M_2 : Sabit tartıma getirilmiş kroze ağırlığı, g

S : Başlangıçtaki örnek miktarı, g

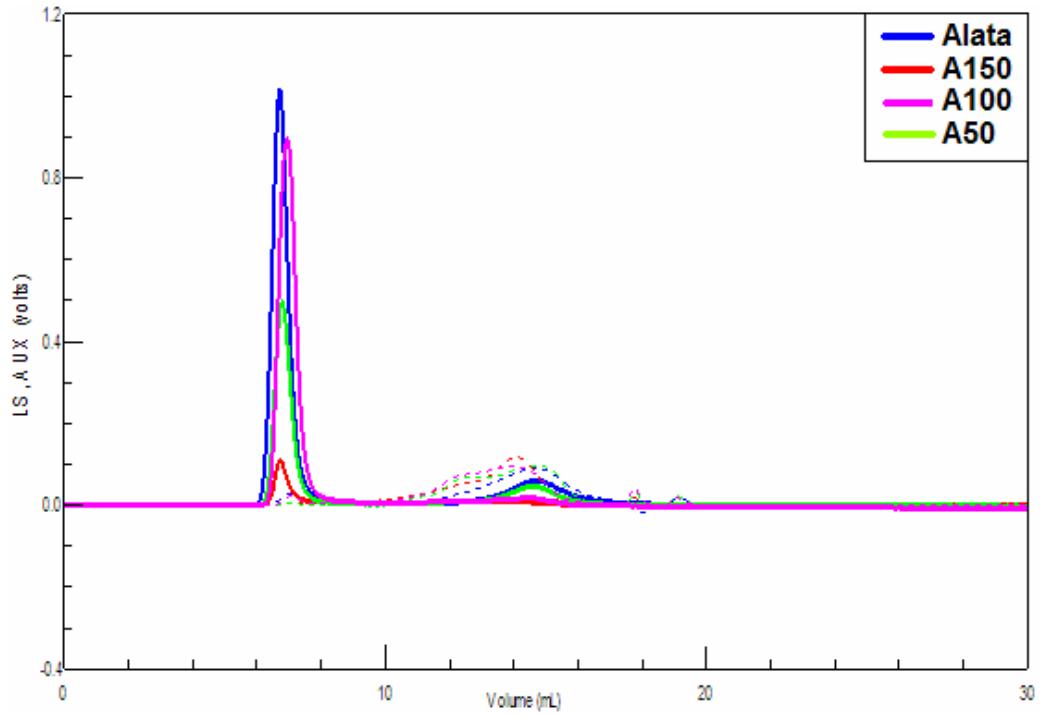
EK-B

HPSEC KROMATOGRAMLARI (MALLS-RID)

BALCALI



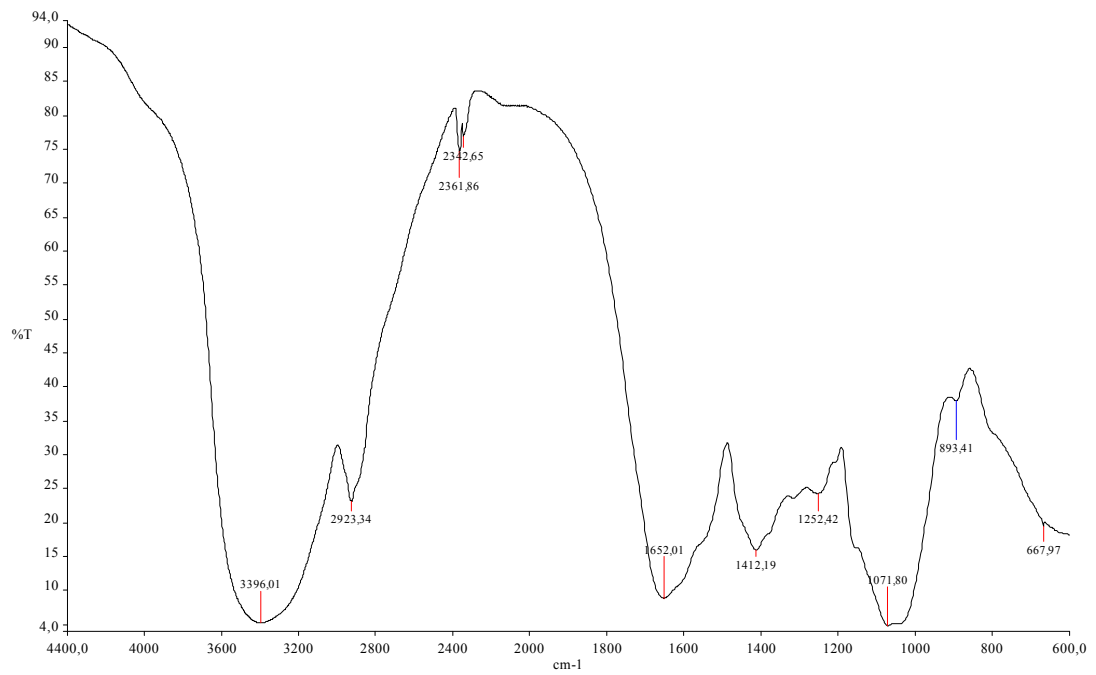
ALATA



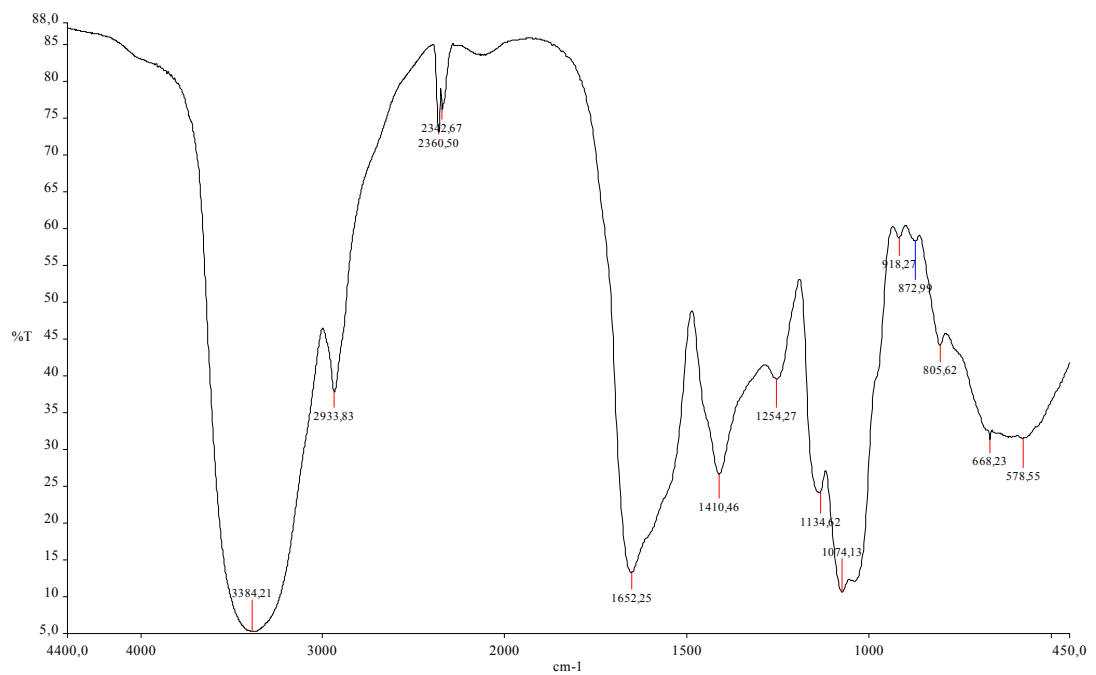
EK-C

FT-IR SPEKTRUMLARI

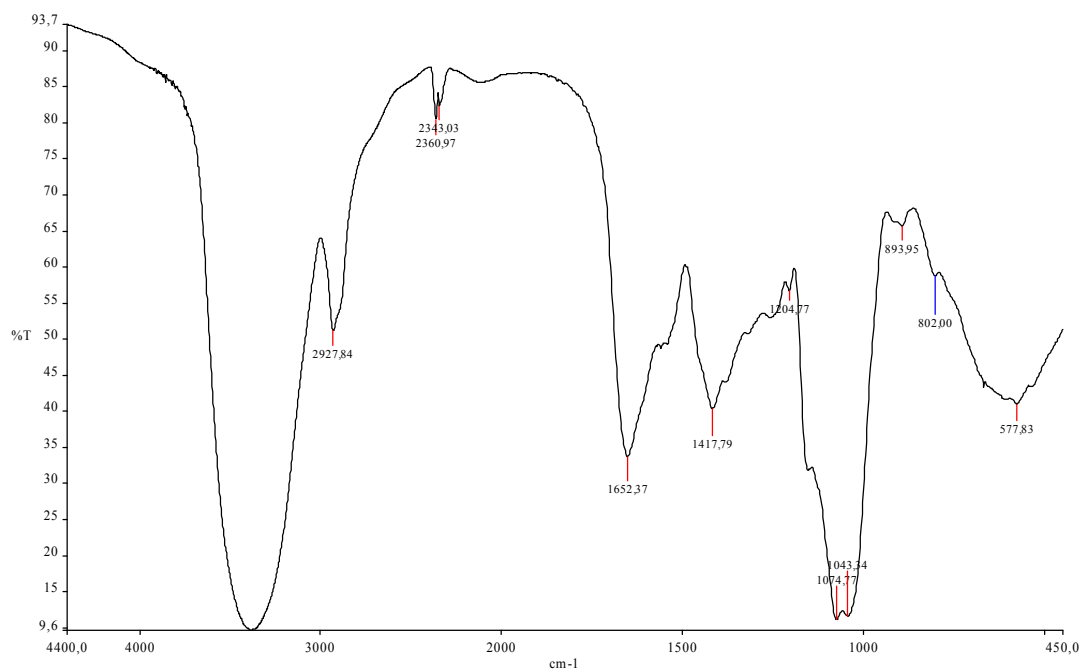
ALATA



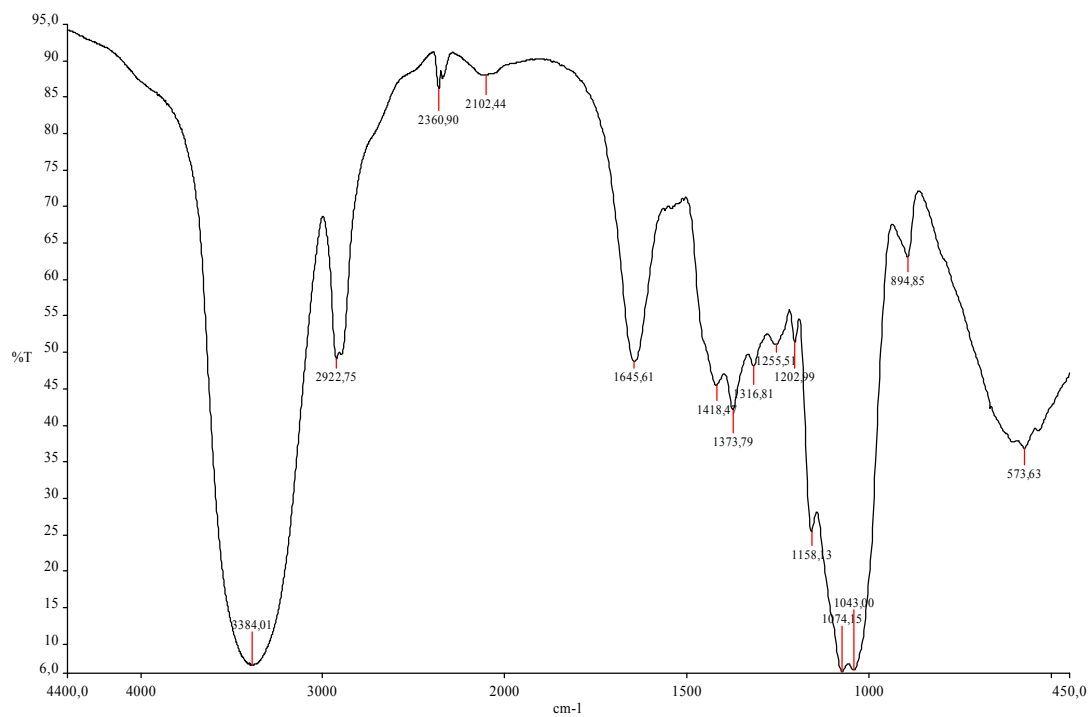
A50



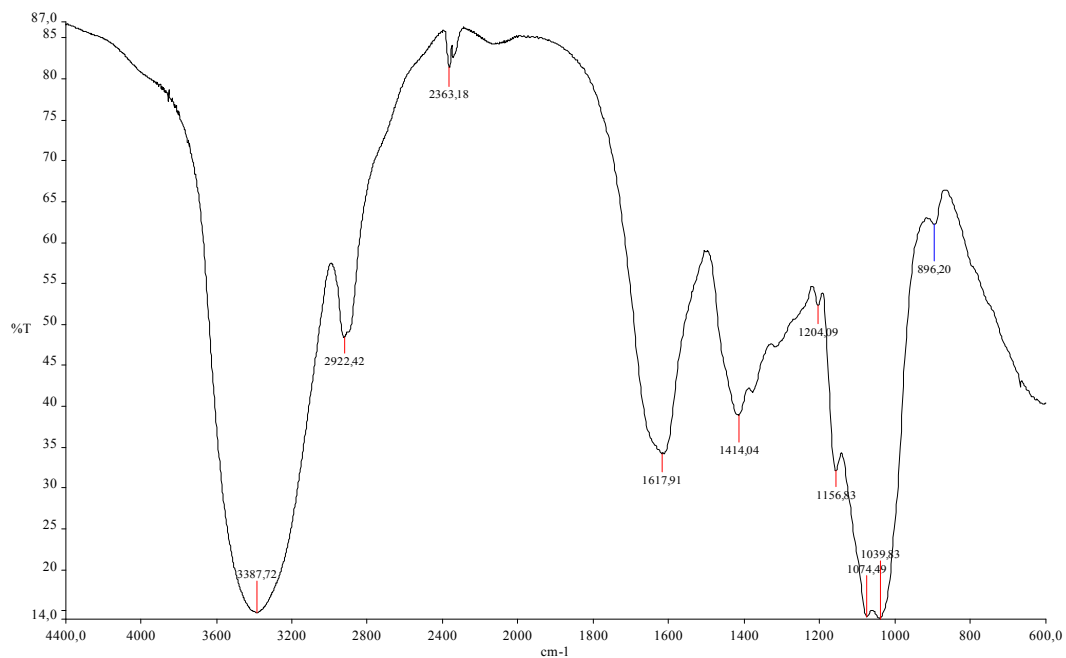
A100



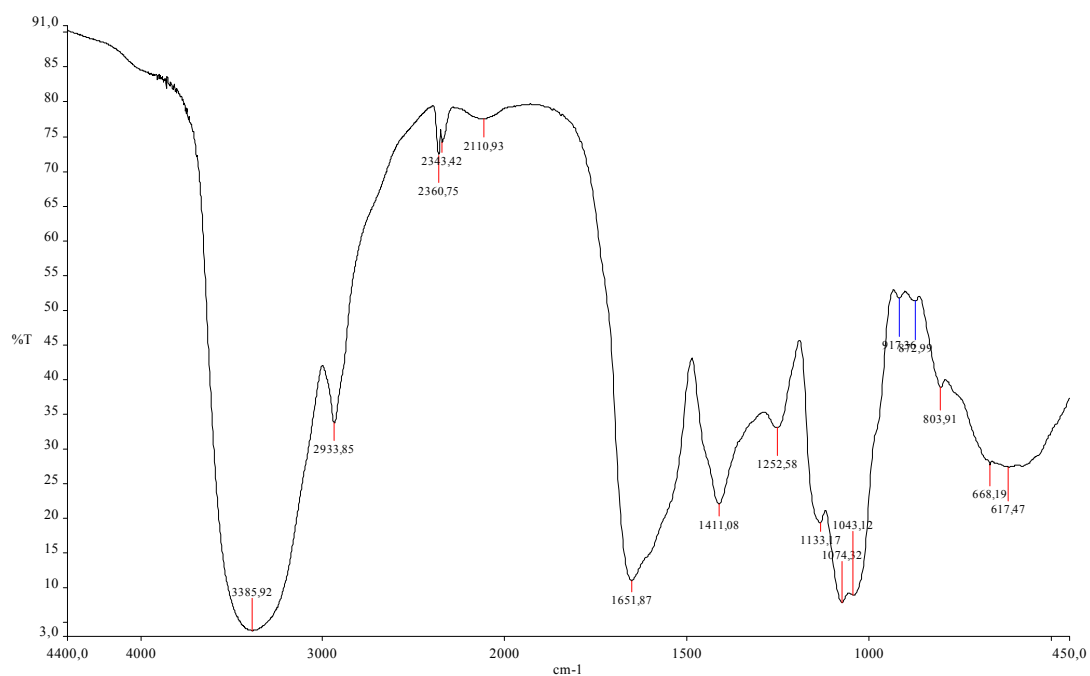
A150



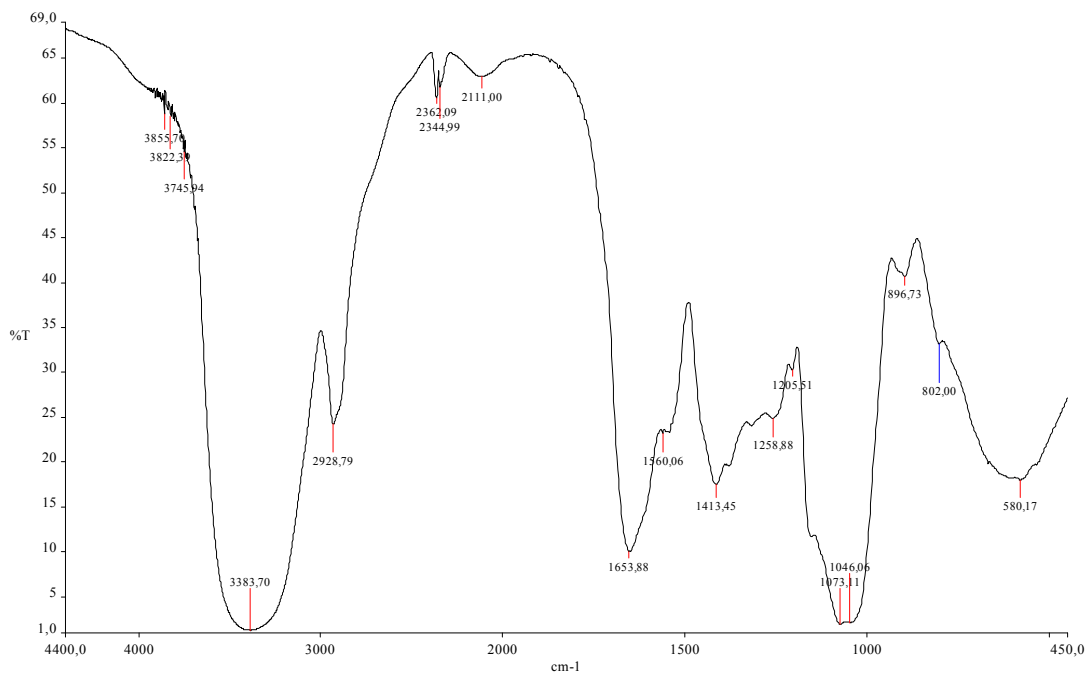
BALCALI



B50



B100



B150

