

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşe FIRAT

**SHIITAKE (*LENTINULA EDODES*) MANTARININ SUBKRİTİK SU İLE
EKSTRAKSİYONU VE BİLEŞENLERİNİN TANIMLANMASI**

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA, 2007

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SHIITAKE (*LENTINULA EDODES*) MANTARININ
SUBKRİTİK SU İLE EKSTRAKSİYONU VE
BİLEŞENLERİNİN TANIMLANMASI**

**Ayşe FIRAT
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

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

İmza.....	İmza.....	İmza.....
Öğr.Gör.Dr. Sibel IRMAK	Prof.Dr. Oktay ERBATUR	Yrd. Doç.Dr. Gülsün A. EVRENDİLEK
DANIŞMAN	ÜYE	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: FEF2006YL39

☐ **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

**SHİITAKE (*LENTINULA EDODES*) MANTARININ
SUBKRİTİK SU İLE EKSTRAKSİYONU VE
BİLEŞENLERİNİN TANIMLANMASI**

Ayşe FIRAT

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman : Öğr. Gör. Dr. Sibel IRMAK

Yıl: 2007, Sayfa:70

Jüri : Öğr. Gör. Dr. Sibel IRMAK

Prof.Dr. Oktay ERBATUR

Yrd. Doç. Dr. Gülsün A. EVRENDİLEK

Bu çalışmada, Shiitake (*Lentinula edodes*) polisakkaritleri atmosferik basınç altında sıcak su ve 280 bar (4060 psi) sabit basınçta CO₂ atmosferi altında subkritik su ile ekstrakte edilmiştir. Subkritik su ekstraksiyonları, üç farklı sıcaklıkta (50, 100 ve 150°C) gerçekleştirilmiştir. Polisakkaritlerin moleküler kütle karakterizasyonu, GPC ve HPSEC-MALLS analizleri yapılarak belirlenmiştir. Ekstraktların elüsyon profilinde, çözünürlüğü farklı iki polisakkarit fraksiyonu gözlenmiş ve Fraksiyon I ve Fraksiyon II diye adlandırılmıştır. Sıcak su ekstraktında, Fraksiyon I olarak adlandırılan pikin kütlece ortalama molekül kütlesi (Mw) 1,337x10⁶ Da olarak bulunmuştur. Fraksiyon I'in Mw değerleri, tüm subkritik su ekstraktlarında azalmıştır. Bu değerler 50, 100 ve 150°C subkritik ekstraktlar için sırasıyla 1,44x10⁶; 1,114x10⁶ ve 8,37x10⁵ Da'dır. Sıcak su ekstraktı için Fraksiyon II'nin değeri 1,282x10⁶ Da; 50, 100 ve 150°C subkritik su ekstraktları için sırasıyla 4,118x10⁴; 5,682x10⁴ ve 3,374x10⁴ Da'dır. Ekstraktların çözünürlük testleri; atmosferik basınçta sıcak su ile yapılan ekstraktların sırasıyla nötral ve alkali çözeltilerde %26,60 ve %8,46 çözünmeyen kısımların olduğunu göstermiştir. Bunun yanında, subkritik ekstraktların tamamının hem nötral hem de alkali çözeltide çözündüğü gözlenmiştir. 280 nm'de HPSEC-UV analizleri ve Lowry protein metodu sonuçlarına göre, Shiitake'nin sıcak su ekstraktı %6,49 oranında protein içermektedir. Polisakkaritlerin ve proteinlerin gerçek molekül kütlelerini belirlemek için, sıcak su ekstraktı protease enzimi ile 24 ve 48 saat boyunca muamale edilmiştir. HPLC'de yapılan monosakkarit analizleri ile Shiitake polisakkaritlerinin başlıca D-glukoz ve bir miktar D-mannoz içerdiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Lentinula edodes* (Shiitake), subkritik su ekstraksiyonu, polisakkarit, moleküler kütle dağılımı

ABSTRACT

MSc THESIS

SUBCRITICAL WATER EXTRACTION OF SHIITAKE (*LENTINULA EDODES*) AND CHARACTERIZATION OF ITS COMPONENTS

Ayşe FIRAT

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor : Öğr. Gör. Dr. Sibel IRMAK

Year: 2007, Pages: 70

Jury : Dr. Sibel IRMAK

Prof. Oktay ERBATUR

Assoc.Prof. Gülsün A. EVRENDILEK

In this study, polysaccharides in Shiitake (*Lentinula edodes*) mushroom were extracted by hot water under atmospheric pressure and by subcritical water at a constant pressure of 280 bar (4060 psi) in CO₂ atmosphere. Subcritical water extractions were carried out at three different temperatures (50°C, 100°C and 150°C) at 280 bar constant pressure. Molecular weight characterization of the polysaccharides were measured using high performance size-exclusion chromatography-multi angle light scattering system (HPSEC-MALLS). Two main peaks called, Fraction I and II were determined. Weight average molecular weight (Mw) of Fraction I obtained in hot water extraction was found to be 1.333×10^7 Da. Mw value of Fraction I was sharply decreased in all subcritical water extracts. These values were 1.644×10^6 , 1.114×10^6 , and 8.37×10^5 Da for 50°C, 100°C and 150°C, respectively. On the other hand, Fraction II from hot water extraction had 1.282×10^6 Da molecular weight and Fraction II of subcritical water extracts had 4.118×10^4 , 5.682×10^4 , and 3.374×10^4 Da for 50°C, 100°C and 150°C, respectively. Solubility tests showed that all subcritical water extracts were completely soluble in both neutral and alkali medium while hot water extracts left 26.60% and 8.46% insoluble residues in neutral and alkali, respectively. HPSEC analysis at 280 nm UV detector and Lowry protein assay results showed that hot water extract of Shiitake contained 6.49% of protein. The polysaccharide-protein complex was treated with protease enzyme for 24 and 48 h to identify the actual molecular weights of polysaccharide. The results of monosaccharide analysis in HPLC showed that polysaccharides of Shiitake composed of mainly glucose and some of amount of mannose.

Keywords: *Lentinula edodes* (Shiitake), subcritical water extraction, polysaccharide, molecular weight distribution

TEŞEKKÜR

Kimya eğitimim ve akademik çalışmalarımda maddi ve manevi her konuda benden desteğini esirgemeyen, anlayış gösteren ve tez çalışmam süresince yapmış olduğum araştırmalarda beni yönlendiren ve çalışmalarımda her türlü desteği sağlayan danışmanım Prof. Dr. Oktay Erbatur ve Öğr.Gör.Dr. Sibel Irmak'a teşekkürlerimi sunarım. Araştırmalarımda fikirleri ve çabalarıyla bana destek veren Arş. Gör. Osman Malik Atanur'a teşekkür ederim. Katkılarından dolayı Öğr.Gör.Dr. Arif Hesenov'a ve diğer analitik grubu üyelerine teşekkür ederim.

Aileme ve özellikle de annem Emine Fırat ve babam Hikmet Fırat'a eğitim ve öğretim hayatım boyunca bana maddi ve manevi her konuda destek oldukları için teşekkür ederim. Master tezi çalışmalarımda benden desteğini hiç esirgemeyen nişanlım Cuma Dörtbıyık'a da ayrıca çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
SİMGE VE KISALTMALAR.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Shiitake Mantarlarının Bulunuşu ve Taksonomisi.....	2
1.2 Shiitake (<i>Lentinula edodes</i>) Mantarının Bileşenleri.....	6
1.2.1 Polisakkaritler.....	6
1.2.1.1 Polisakkaritlerin Hidrolizi.....	8
1.2.1.2 Lentinan.....	8
1.2.1.3 <i>Lentinula edodes</i> Miselyum Ekstraktı.....	9
1.2.2 Proteinler.....	10
1.2.2.1 Eritadenin.....	10
1.2.3 Vitamin D.....	10
1.2.4 Vitamin B ₂ (Riboflavin).....	12
1.2.5 Vitamin B ₁₂ (Kobalamin).....	13
1.3 Subkritik ve Süperkritik Suyun Özellikleri.....	13
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	18
3. MATERYAL VE METOD.....	25
3.1 Materyal.....	25
3.1.1 Mantar Örneklerinin Hazırlanışı.....	25
3.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	25
3.1.3 Kromatografik ve Spektroskopik Analizlerde Kullanılan Standartlar.....	25
3.2 Metod.....	26
3.2.1 <i>Lentinula edodes</i> Mantarının Atmosferik Basınçta Su ile Ekstraksiyonu.....	26

3.2.2 Subkritik Su ile Ekstraksiyon Çalışmaları.....	26
3.2.2.1 <i>Lentinula edodes</i> Mantarının Subkritik Su ve CO ₂ ile Ekstraksiyonu.....	27
3.3.2.2 Ekstraksiyon Sonrası Bileşenlerin Belirlenmesi	28
3.3 <i>Lentinula edodes</i> Mantarından Ekstrakte Edilen Polisakkaritlerin Ortalama Moleküler Kütlelerinin Belirlenmesi.....	28
3.3.1 GPC Analizleri.....	28
3.3.2. HPSEC-MALLS Analizleri.....	29
3.4 Enzimle Parçalama.....	30
3.5 Polisakkarit Ekstraktlarının Kimyasal Bileşimin Belirlenmesi.....	31
3.5.1. Monosakkarit Analizleri.....	31
3.5.2. Lowry Protein Metodu.....	32
3.5.3 Üronik Asit İçeriği.....	32
3.5.4 Çözünürlük Testi.....	32
3.5.4.1 Bazik Ortamda Çözünürlük Testi (JECFA1).....	33
3.5.4.2 Nötral Ortamda Çözünürlük Testi (JECFA2).....	33
3.6 FT-IR Infrared Analizleri.....	33
4. BULGULAR VE TARTIŞMALAR.....	35
4.1 GPC Analizleri.....	35
4.2. HPSEC- MALLS Analizleri.....	41
4.3 Polisakkarit Ekstraktlarının Bileşimi.....	46
4.4 Infrared (FT-IR) Sonuçları.....	48
5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	51
KAYNAKLAR.....	54
ÖZGEÇMİŞ.....	66
EKLER.....	67

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

ÇİZELGE 1.1. <i>Lentinula edodes</i> mantarının biyolojik aktiviteleri ve farmakolojik etkileri.....	4
ÇİZELGE 4.1. <i>Lentinula edodes</i> mantarının farklı ekstraksiyon koşullarında elde edilen kaba polisakkarit miktarları.....	35
ÇİZELGE 4.2. Kalibrasyon eğrisi değerleri.....	37
ÇİZELGE 4.3. <i>Lentinula edodes</i> mantarının polisakkaritlerinin molekül kütlesi dağılımı.....	40
ÇİZELGE 4.4. <i>Lentinula edodes</i> polisakkaritlerinin farklı ekstraksiyon koşullarındaki molekül kütle Dağılımı.....	41
ÇİZELGE 4.5. <i>Lentinula edodes</i> mantarının temel bileşenleri.....	46
ÇİZELGE 4.6. <i>Lentinula edodes</i> mantarının farklı ekstraksiyon koşullarındaki fiziksel özellikleri	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1. <i>Lentinula edodes</i> (Shiitake).....	5
Şekil 1.2 . <i>Lentinula edodes</i> (Shiitake).....	5
Şekil 1.3. Şeker molekülünün 4C1 sandalye konformasyonunda anomerik bağlantı.....	7
Şekil 1.4. Lentinan (1→6): (1→3) β-Dglukan.....	9
Şekil 1.5. Eritadenin.....	10
Şekil 1.6. VitaminD ₂	11
Şekil 1.7. VitamiD ₃	11
Şekil 1.8. Riboflavin (B ₂) vitamini.....	12
Şekil 1.9. Kobalamin (B ₁₂) vitamini.....	13
Şekil 1.10. Suyun faz diyagramı.....	15
Şekil 1.11. Suyun sıcaklık, basınç ve yoğunluk ilişkisini gösteren üç boyutlu şekil.....	15
Şekil 1.12. Suyun dielektrik sabiti değerleri.....	16
Şekil 1.13. Suyun iyon çarpımı sabiti.....	16
Şekil 3.2. Parr Instrument Co., model 4575 HP/HT reaktörü.....	27
Şekil 3.3. HPSEC-MALLS sistemi.....	30
Şekil 3.4. Monosakkarit analizlerinde kullanılan Varian HPLC sistemi.....	31
Şekil 4.1. Dekstran standartların Ultrahydrogel 2000-250 kolondan elüsyonun durumunu gösteren kromatogram.....	36
Şekil 4.2. Dekstran standartlarının GPC analizi sonucu oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	36
Şekil 4.3. <i>Lentinula edodes</i> mantarının 50±5°C - 4025 psi basınçtaki ekstraksiyonu sonucu elde edilen polisakkarit ekstraktının GPC kromatogramı.....	38
Şekil 4.4. <i>Lentinula edodes</i> mantarının 100°C ±4 - 4150 psi basınçtaki ekstraksiyonu sonucu elde edilen polisakkarit ekstraktının GPC kromatogramı.....	38

Şekil 4.5. <i>Lentinula edodes</i> mantarının 150°C ±2- 4100 psi basınçtaki ekstraksiyonu sonucu elde edilen polisakkaritin GPC kromatogramı.....	39
Şekil 4.6. <i>Lentinula edodes</i> mantarının 100°C 1 atm basınçtaki ekstraksiyonu sonucu elde edilen polisakkaritin GPC kromatogramı.....	39
Şekil 4.7. Sıcak su, 50, 100, and 150° C’de Shiitake mantarının polisakkaritlerinin HPSEC kromatogramları a) RID b) MALLS c) UV dedektör ölçümleri.....	42
Şekil 4.8. İşlem görmemiş Shiitake mantarı ile enzim kör çözeltisinin protease enzimi ile 24 ve 48 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen HPSEC kromatogramları a) MALLS-RID-UV dedektör cevabı (24 saat) b) MALLS-RID- UV dedektör cevabı (48 saat) c) UV dedektör cevabı.....	44
Şekil 4.9. BSA standartına ait kalibrasyon eğrisi.....	46
Şekil 4.10.WPI standartına ait kalibrasyon eğrisi.....	47
Şekil 4.11. Shiitake mantarından sıcak su, 50, 100 ve 150°C de subkritik su ile ekstrakte edilen polisakkaritlerin FT-IR spektrumları.....	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

Satm	: Shiitake mantarı sıcak su ekstraktı
S50, S100, S150	: Shiitake mantarı subkritik su ekstraktları
SWE	: Sub-critical Water Extraction (Subkritik Su Ekstraksiyonu)
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
RID	: Refractive Index Dedector (Refraktif İndeks Dedektörü)
GPC	: Gel Permeation Chromatography (Jel -Geçirgenlik Kromatografisi)
HPSEC	: High Performance Liquid Chromatography- Size Exclusion Chromatography (Yüksek Performanslı Boyut-Eleme Kromatografisi)
MALLS	: Multi Angle Light Scattering Dedector (Çok Açılı Lazer Işık Saçılım Dedektörü)
HPSEC-MALLS	: High Performance Liquid Chromatography- Multi Angle Light Scattering Dedector (Yüksek Performanslı Boyut-Eleme Kromatografisi- Çok Açılı Lazer Işık Saçılım Dedektörü)
MWCO	: Molecular Weight Cut Off
MWR	: Molecular Weight Range

1. GİRİŞ

Mantarlar, Çin ve Japonya gibi Uzak Doğu ülkelerinde tıbbi yararları nedeniyle yüzyıllardan beri tüketilmektedir. Mantarlar genellikle, mineral ve vitaminlerce zengindirler ve düşük yağ içeriğine sahiptirler (Manzi ve ark., 2001). Shiitake (*Lentinula edodes*) mantarı, dünya üretiminde ikinci sırada yer alan, çok popüler ve yenilebilen bir mantardır. Bununla birlikte bu konuda son birkaç yıla kadar kapsamlı bir araştırma yapılmamıştır. *Lentinula edodes* dahil tıbbi mantarlar olarak adlandırılan yüksek Basidiomycota üyesi fungal maddelerin meyvesinden (fruiting body) veya misellerinden su ile kaynatılarak ekstrakte edilen bazı polisakkaritlerin immün sistemini güçlendirici ve bazı kanserli dokular üzerinde antikanser etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Reshetnikov ve ark., 2001). Bugüne kadar bu polisakkaritler sadece atmosferik koşullarda kaynar su ile ekstrakte edilmiş, suda çözünmeyen kesimlerin bir kısmı ise %5'lik veya bu civarda değişen derişimlerde alkali çözeltiler ile ekstrakte edilmişlerdir (Chang ve ark., 1996). Basidiomycetes grubuna dahil olan mantarlar, biyolojik aktivitelere sahiptir. Bazı mantarlar, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki Uluslararası Kanser Enstitüsü tarafından bağışıklık sistemini güçlendirici ve antitümör aktivitelere göre sınıflandırılmıştır (Ikekawa, 2001). Terapik aktivitelere sahip olan bileşenler; mantarların meyve kısımlarında veya misellerinde bulunan polisakkaritler, protein bağlı polisakkaritler (glukoprotein), glukanlar ve heterogalaktanlardır. Biyolojik aktiviteri fazla olan β -D-glukanlar *Grifola frandosa*, *Ganoderma lucidum*, *Trametes versicolor*, ve *Lentinula edodes* gibi mantarlardan ekstrakte edilirler (Wasser, 2001). β -D-glukanların biyolojik aktiviteri ise molekül yapılarına ve konformasyonlarına bağlıdır (Wagner, 1988; Bohn, 1995). *Tricholomataceae* familyasından olan *Lentinula edodes* 1994 istatistiklerine göre 826 000 ton ile kültür mantarları arasında *Agaricus bisporus*'tan sonra ikinci sırada en çok yetiştirilen mantardır. *Agaricus bisporus*, fermente edilerek hazırlanmış kompostta yetiştirilirken *Lentinula edodes*, bazı ağaçların kütük ve talaş ile hazırlanmış sentetik kültüründe de yetiştirilebilmektedir. Yetiştiricilik daha ziyade uzak doğu ülkelerinde yaygın olarak yapılmaktadır.

Bu çalışmada *Lentinula edodes* mantarlarındaki polisakkaritler subkritik su ile ekstrakte edilmiştir. Su için subkritik koşullar $99,97\text{ }^{\circ}\text{C} < t < 374,15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve $217,76\text{ atm} < P$ olarak alınmıştır (Ohtaki, 2003, Nakahara ve ark., 1997). Daha önce de belirtildiği gibi gerek *Lentinula edodes*, gerekse diğer tıbbi mantarlar bu koşullarda hiç ekstrakte edilmemişlerdir. Subkritik su ekstraksiyonunda sıcaklığın ve basıncın artırılmasıyla su moleküllerinin mantarların yapısında bulunan polisakkaritlerle etkileşimi daha fazla olmakta ve bunun yanı sıra ekstraksiyonun karbondioksit ortamında yapılması polisakkaritlerin hidrolizini arttırmaktadır. Bu çalışmada, subkritik su ekstraksiyonu ile bu mantarların yapısında bulunan polisakkaritlerin ekstrakte edilmesi ve ekstrakte edilen ve kısmen parçalanmış polisakkaritlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesi, karakterizasyonlarının yapılması hedeflenmiştir.

1.1 Shiitake Mantarlarının Bulunuşu ve Taksonomisi

Shiitake (*Lentinula edodes*) mantarı “Basidiomycetes” sınıfının üyelerinden biridir. Basidiomycetes grubu mantarlarında sporlar bazidyumların üzerinde oluşturulur. Grubun en önemli ortak özelliği, yaşam döngülerinde, hücrelerin iki çekirdek taşıdığı bir evrenin görülmesidir. Bir diğer ortak özellikleri de, hücre duvarlarının çift tabakalı olmasıdır. Bu grupta; şapkalı mantarlar, raf mantarları, kurt mantarları gibi yüksek yapılı mantarlar bulunduğu kadar, tehlikeli ve parazit olan daha ilkel mantar türleri de bulunur. Bu mantarların gelişmiş fertlerinde birçok bazidyumlar meydana gelir. Bazidyum topluluğuna bazidiokarp denilir. Bazidiokarp şapkalı, raflı, dişli olmak üzere 3 şekildedir. Eşey organları gelişmez. Eşeyli üreme somatogami ile olur. Hücrelerin birleşmesi farklı eşeye ait (-) ve (+) haploit monokaryotik misellerin toprakta birbirlerine yaklaşması sonucu olur. Nükleuslarda birleşme olmaz. Nükleuslar yan yana gelerek dikaryotik (iki çekirdekli) miseli meydana getirir. Dikaryotik misel hem yatay olarak gelişir, hem de negatif geotropizma göstererek dik olarak büyür. Üst kısımda miseller yoğunlaşarak furtifikasyon (şapka) oluşur. Eşeysiz üreme bazidiosporlar ile olur. Furtifikasyonun himeniyumundaki hiflerin bir kısmının ucu şişer ve aynı zamanda içindeki dikaryotik çekirdekler birleşerek diploit bir zigot çekirdeği oluşturur. Bunlar bazidyumun üç

kısımındaki eldiven parmağı şeklindeki sterigma denilen uzantıların içine girer. Çeper oluşumu ile her bazitten 4 haploit basidiospor meydana gelmiş olur (Ağaoğlu ve Ilbay, 1991).

Shiitake mantarı, Japonya, Çin ve Kore'nin geleneksel lezzetidir. Nemli ve ılık bir iklime sahip yerlerde ve sert dokulu ağaçlarda yetişir. Aşılamadan itibaren ilk meyve oluşumuna kadar geçen süre, kullanılan misel kültürü ağacın cinsine ve iklime bağlı olarak, 6-18 ay arasında değişir. Kütüklerin kullanım süresi ise 3-5 yıldır. Tıbbi mantar olarak tanınan bu mantar doğal sağlık maddesi ve uzun yaşamın sırrı olarak satılmakta, antitümör ve antiviral etkiye sahip olması ve cinsel gücü artırması nedeniyle popüleritesi hızla artan lezzetli ve değerli bir mantardır (Stamets, 1993). Bazı önemli bileşenleri, biyoaktif polisakkarit (lentinan), eritadenin, vitamin D, B₂, B₁₂, yağ asitleri ve minerallerdir. Shiitake mantarlarının bileşenlerinin, bazı sağlık problemlerinde tedavi amaçlı kullanıldığı bilinmektedir. Shiitake mantarının birincil bileşeni kolesterolü düşüren eritadenin'dir. Eritadenin, kolesterolün düşürülmesini hızlandırır (Chihata, 1969). Bu mantarların suda çözünebilen lifli kısımlarından hem homojen hem de heterojen polisakkaritler/glukan ve glukoprotein kompleksleri izole edilmiştir (Ooi, 2000). Suda çözünebilen homojen polisakkariti β -glukan lentinandır (Chang, 1996, Mizono, 1995). Lentinan; 500 kDa molekül ağırlığında, ana zincir olarak β (1-3) bağlı D-glukan, yan dal olarak da β -(1-6) bağlı glukoz ünitelerinden oluşmaktadır (Sasaki, 1976). Lentinan, bağışıklık sistemi rahatsızlıklarında, kanser çeşitlerinde ve AIDS gibi rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Jong, 1992). Ayrıca Sarcoma 180 tipi tümörler ve metilkloranten içeren birkaç tip tümöre karşı antitümör aktivitesinin olduğu bilinmektedir (Chihara, 1969). Diğer içerdiği faydalı bileşikler, glukanlar ve glukoprotein kompleksleri bugüne kadar tam olarak belirlenememiştir. Mantarların doğal antibiyotik kaynakları olduğu bilindiğinden dolayı, Shiitake ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri de araştırılmıştır (Smania, 1995). Shiitake'nin bir diğer bileşeni de miselyumundan ekstrakte edilen LEM (*Lentinula edodes* miselyum ekstraktı)'dir. LEM'in insan hücrelerinde oluşan HIV virüsünü inhibe ettiği, kronik Hepatit B'ye karşılık antiviral etkisinin olduğu ve karaciğer fonksiyonlarını düzelttiği kanıtlanmıştır (Tochikura, 1988; Suzuki, 1989). Bünyesinde yüksek düzeyde bulunan

ergesterol, ışıkta D vitaminine dönüşmektedir. Bu nedenle kemik ve kas gelişimini hızlandırır ve raşitizm ve lenf hastalıklarının önlenmesini sağlar.

Çizelge 1.1. *Lentinula edodes* mantarının biyolojik aktiviteleri ve farmakolojik etkileri (Anonim, 2005a)

Lentinula edodes Mantarının Biyolojik Aktivite ve Farmakolojik Fonksiyonları

<i>Lentinulaedodes/ Shiitake</i>	
Anti-Viral	+
Anti-Tümör	+
İmmünolojik Etkisi	+
Kan basıncı	+
Kardio-Vasküler	+
Düşük kolesterol	+
Lipid yükselmesi	+



ŞEKİL 1.1 Shiitake (*Lentinula edodes*) (Anonim 2005b)



ŞEKİL 1.2 Shiitake (*Lentinula edodes*) (Anonim 2005b)

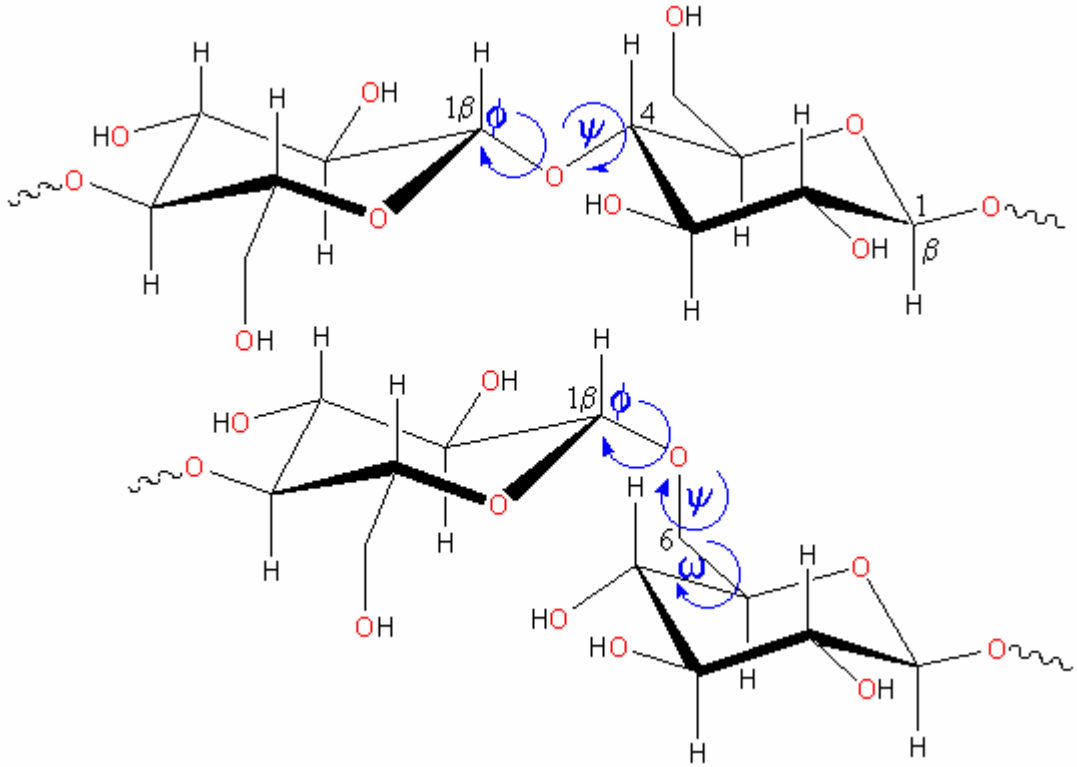
1.2. Shiitake (*Lentinula edodes*) Mantarının Bileşenleri**1.2.1. Polisakkaritler**

Polisakkaritler oluştukları monosakkarit bileşenleri, dizilim sıraları ve bağlantıları, bağlantıların anomerik konfigürasyonları, halka büyüklükleri (furanoz ya da piranoz), mutlak konfigürasyonları (D- veya L-) ve varsa diğer substituentleri de dikkate alınarak sınıflandırılır ve adlandırılır. Zincir konformasyonları ve molekül içi etkileşimleri polisakkaritlerin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde etkilidir. Belirli bir düzene sahip polisakkaritlerin, zincirdeki glikozit bağlantılar etrafında dönme hareketlilikleri üzerinde etkin sterik kısıtlamalar olması nedeniyle bulunabilecekleri konformasyon sayısı çok kısıtlıdır.

Nişasta içermeyen polisakkaritlerden selüloz ve ksilan (xylan) uzunlamasına (extended) olacak şekilde belirli konformasyonlarda bulunabilirler. Buna karşılık amilopektin gibi depo polisakkaritleri geniş, helikal konformasyonlarda bulunurlar. Polisakkaritin konformasyonunun az esnek yapıda oluşu ve yeniden düzenlenmesi ile fermentasyon, hidroliz gibi tepkimelere girebilme olasılığı arasında sıkı bir ilişki vardır. Pentoz şekerleri, örneğin arabinoz ve ksiloz iki konformasyondan birinde bulunabilir. Bunlardan arabinoz furanoz halkaları oluşturur ve daha esnek bir yapıya kavuşurken, ksiloz ve glikozun oluşturduğu piranoz halkaları daha az esnektirler. Fazla sayıda hidroksil grupları içeren karbonhidratlar genellikle hidrofilik olarak kabul edilirler. Oysa, monomerlerinin halka konformasyonları, epimerik yapı ve glikozidik bağlantıların türü bazı polisakkaritlerde oldukça apolar yüzeyler oluşmasına yol açabilir. Örneğin dektrin, α -(1→4)-bağlantılı glukanlar, apolar yüzeyler oluştururken, dektranlar, α -(1→6)-bağlantılı glukanlar ve selüloz, β -(1→4)-bağlantılı glukanlar çok daha az hidrofobik yüzey oluşturabilirler. Molekül içi hidrojen bağlarının fazlalığı, dış yüzeydeki serbest hidroksil gruplarının sayısını azaltacağından, hidrofobluğu arttıran önemli bir faktördür. 3- ve 4- pozisyonlarında β bağlantısı içeren mannoz veya glikoz homopolimerleri molekül içi hidrojen bağları çok olan, dolayısıyla hidratasyon oranı düşük, az esnek ve sağlam polisakkaritleri oluştururken, 2-, 3- ve 4- pozisyonlarına α bağlantısı olan mannoz ve glikoz

homopolimerleri daha fazla hidratasyona uğrayan ve daha esnek yapılara sahiptirler (Almond, 2005).

Şekil 1.3 de şeker moleküllerinin 4C_1 sandalye konformasyonunda anomerik bağlantı etrafında dönme açıları iki değişik bağlantıda, β -(1 $\rightarrow$ 4) ve β -(1 $\rightarrow$ 6), görülmektedir. Metil, hidroksil grubu ile β -(1 $\rightarrow$ 6) bağlantısı yapan yapı ω açısı ile bir fazla serbestlik derecesine sahip olduğu için daha esnek bir yapıya sahiptir. Moleküllerin esnekliği (anomerik bağlantı etrafında dönebilmeleri) molekül içi hidrojen bağlarının varlığı ile doğrudan ilgilidir. Bu bağlamda furanoz halkaları, piranoz halkalarından daha esnektir. Ancak, polisakkarit moleküllerinin 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 belirleyecek, bu da mevcut proses koşullarında polisakkarit moleküllerinin alacakları yeni konformasyonları belirleyecektir (Kirschner ve Woods, 2001).



Şekil 1.3. Şeker moleküllerinin 4C_1 sandalye konformasyonunda anomerik bağlantı etrafında dönme açılarının iki değişik bağlantıda β -(1 $\rightarrow$ 4) ve β -(1 $\rightarrow$ 6) gösterilmesi

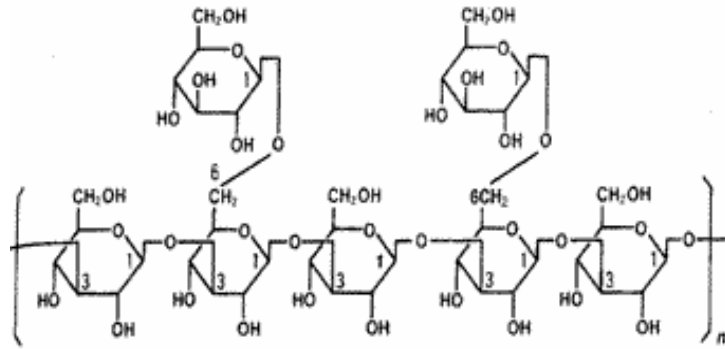
1.2.1.1. Polisakkaritlerin Hidrolizi

Polisakkaritlerin, özellikle selülozun hidroliz yoluyla esas ürün olarak glikoza dönüştürülmesi ve glikozdan da fermentasyon 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; Adschiri ve ark., 1993; Bobleter, 1994; Sakaki ve ark., 1996, 1998, 2000; Ehara ve Saka, 2002). Karbondioksit varlığında karbonik asitin katalitik etkisi ile daha ılımlı koşullarda (200 °C) nişasta ve bazı diğer polisakkaritler etkin bir şekilde hidroliz edilebilir (Miyazawa ve Funazukuri, 2005). Sakaki ve ark. (1996), selülozdan 355°C sıcaklıkta 15 s sürede oligomer ürünlerin yanı sıra % 40'lara varan glikoz oluşumunu bildirmişlerdir. Ancak prosesin devamında gaz ürünlere ve metanolde çözünen bozunma ürünlerine dönüşüm artarken karbonize (char) ürünler de gözlenmiştir. Sasaki ve ark. (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 s) glikoza kadar hidroliz olduğunu, ancak 320-350 °C sıcaklık aralığında hidroliz hızının düştüğünü, buna karşılık glikoz ve diğerlerinin bozunma tepkimelerinin gerçekleştiğini gözlemlemişlerdir. Ehara ve Saka, (2002) selülozu batch- ve flow-tipli reaktörlerde süperkritik su ile etkileştirdiğinde benzer sonuçlar elde etmişlerdir.

1.2.1.2. Lentinan

Lentinan, Shiitake mantarından ekstrakte edilen, suda çözünebilen bir polisakkarittir. Lentinan, anti-tümör etkisinin olduğu bilinen β -glukandan izole edilmiştir ve *Lentinula edodes*'in meyve kısmından sıcak su ile ayrılır (Chihara ve ark., 1969, 1970). Lentinanın yapısı β -1,3 ve β -1,6- D glukon şeklindedir. Lentinanın moleküler formülü $(C_6H_{10}O_5)_n$ dir ve moleküler kütlesi yaklaşık 500 kDa'dur. Lentinanın mafsaldaki habis tümörlerini azalttığı veya yok ettiği ve ayrıca makrofaj fonksiyonlarının aktivitesine karşı bağışıklık kazanılmış etkisinin olduğu

kanıtlanmıştır (Freunhauf et al., 1982, Ladanyi ve ark., 1983). Ayrıca fare derisindeki Sarcoma 180 tümör hücrelerine karşı kuvvetli antitümör aktivitesinin olduğu bilinmektedir (Maeda ve Chihara, 1969). Bunlardan başka beyin kanamaları, damar sertliği, virüs fonksiyonları ve birçok hastalıklar üzerinde yavaşlatıcı ve önleyici etkisi bulunmaktadır. Lentinan, T yardımcı hücrelerini ve makrofajları aktif hale getirerek ve ayrıca beyaz kan hücrelerini sararak, bakteri ve parazitlerin veya virüslerin sebep olduğu enfeksiyonlara karşı bağışıklık sistemini uyarır. Lentinan, bağışıklık sistemi rahatsızlıklarında, kanser çeşitlerinde ve AIDS gibi rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Jong, 1992).



Şekil 1.4. Lentinan (1→6): (1→3)-β-D-glukan (Chihara ve ark., 1989)

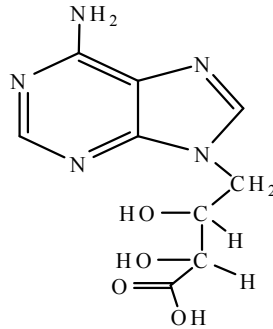
1.2.1.3. *Lentinula edodes* Miselyum Ekstraktı (LEM)

Lentinula edodes miselyum ekstraktı LEM (β-glukan-protein kompleksi), mantarın miselyumundan ekstrakte edilir (Lo, ve ark., 2007). Toz halindeki miselden sıcak su ekstraktı ile alınır ve 40-50 °C sıcaklık aralığında 50-60 saat spesifik bir enzim ile hidrolizlenerek inkübe edilir. Kalıntı 60°C’de su ile ekstrakte edilerek, süzülür ve dondurularak kurutulur. İşlemler sonunda toz halinde elde edilen ve açık kahverengteki madde LEM’dir, ortalama bir kg’lık miselyumda 6 ya da 7 gram dolayında olup insan hücresinde oluşan HIV virüsünü inhibe ettiği ve kronik Hepatit B’ye karşı antiviral etkisinin olduğu ve karaciğer fonksiyonlarını düzelttiği kanıtlanmıştır (Tochikura, 1988, Suzuki, 1989). Ayrıca LEM’in, kanser tedavisinde, kalp rahatsızlıkları, hipertansiyon ve bulaşıcı hastalıklarda tedavi amaçlı kullanıldığı bildirilmiştir (Bensky, 1993).

1.2.2 Proteinler

1.2.2.1 Eritadenin

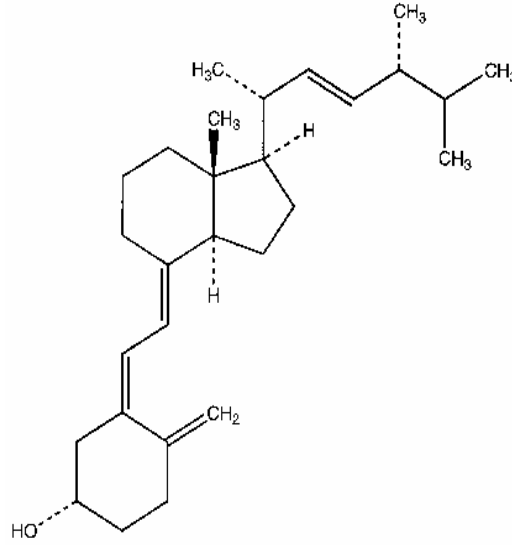
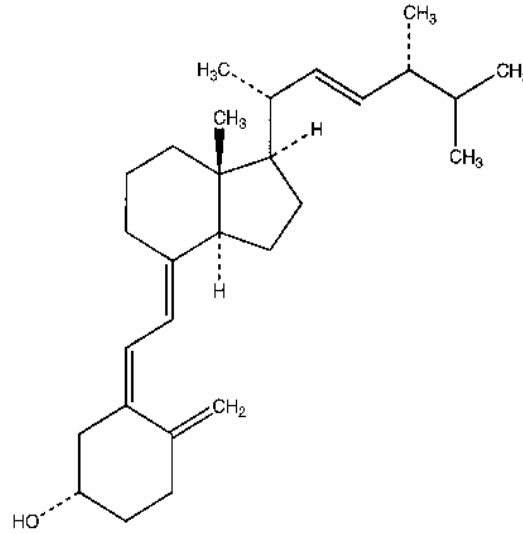
Shiitake'nin metabolizmayı hızlandırdığı ve kolesterolü düşürdüğü ilk kez Kaneda ve Tokuda (1966) tarafından açıklanmıştır. Shiitake'nin %36 oranında toplam plazma kolesterolünü azalttığı belirtilmiştir. Toplam plazma kolesterolünü azaltan Shiitake bileşeni amino asit eritadenin'dir. Eritadenin (2,3-dihidroksi-4-(9-adenil)-butirik asittir. Eritadenin, *Lentinula edodes* mantarından elde edilen hipokolesteromik bir faktör olup, lipid metabolizması üzerinde değişebilir oranlarda etkilidir. Eritadenin insan ve hayvanların bütün lipid bileşiklerinde bulunan ve serum halindeki lipoproteinleri azaltır. Çok düşük toksiste gösterir ve oral yoldan uygulandığında etkilidir.



Şekil 1.5. Eritadenin'nin kimyasal yapısı

1.2.3 Vitamin D

D vitamininin D₂ ve D₃ olmak üzere iki şekli vardır. D₂ vitamini (ergakalsiferol) D vitaminin sentetik şekli olup mayada bulunan ergosterolün UV ışınına tutulması ile elde edilmektedir. Vitamin D₃ (kolekalsiferol) ise insan ve hayvanların derisinde doğal olarak bulunan öncü bileşik 7-dehidrokolesterolden yapılır. Bu olayın gerçekleşmesinde de güneşin UV ışınları rol oynar. Yeterince güneş ışığı alan kişilerin D vitamini almasına gerek yoktur. D vitamini özellikle balık ve karaciğer yağında olmakla beraber süt ürünleri ve mayada da bulunur.

Şekil 1.6. Vitamin D₂Şekil 1.7. Vitamin D₃

Vitamin D₃ kendi başına aktif değildir ancak aktif şekli olan 1,25-dihidroksikolekalsiferol için öncü bileşiktir. Vitamin D₃ önce karaciğerde 25. karbon atomunda, sonra böbreklerde 1. karbon atomundan hidroksillenir ve vücudun diğer bölümlerine yollar. Bu olay aşağıdaki sırada gerçekleşir:

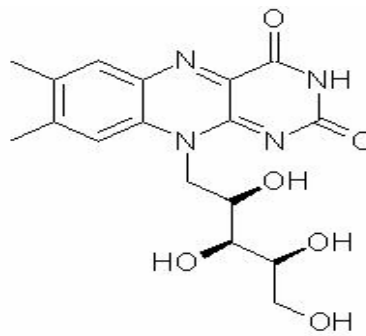
7- dehidrokolesterol → kolekalsiferol (D_3) → 25-hidroksikolekalsif

→ 1,25- dihidroksikolekalsiferol

1,25-dihidroksikolekalsiferolün birinci derecede etkisi bağırsaktan Ca absorpsiyonunu arttırmaktadır. D vitamini eksikliğinde Ca ve P metabolizması bozulur ve özellikle çocuklarda raşitizm ve diğer kemik bozukluklarına neden olur. Fazla D vitamini alınmasının bir faydası yoktur aksine fazla D vitamini alınmasına bağlı olarak kandaki kalsiyum seviyesi yükselir bu böbreklere zarar verir ve yumuşak dokularda kalifikasyona neden olur (De Luca, ve ark., 1998).

1.2.4 Vitamin B₂ (Riboflavin)

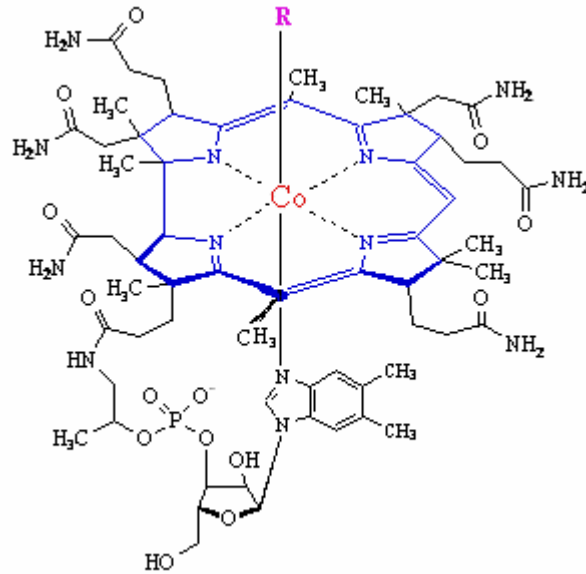
Riboflavin et, karaciğer, böbrek, kalp, fermentasyon yapan aneorobik bakteriler, süt ve bitkisel kökenli besinlerde bulunur. Bağırsak florasında bulunan enzimler tarafından sentezlenir. Bu nedenle riboflavin eksikliğinin insanda yarattığı sonuçlar hakkındaki bilgiler azdır, ancak ağız, burun, ve dilde doku parçalanmasına neden olduğu olduğu bildirilmektedir. Riboflavin, flavinmononükleotid (FMN) ve flavin adenin dinükleotid (FAD) olarak bilinen iki koenzimin yapısında bulunur ve dehidrojenasyon reaksiyonlarında rol oynayan enzimlerin sıkı grubudur (Breen ve ark., 2003).



Şekil 1.8. Riboflavin(B₂) vitamini

1.2.5 Vitamin B₁₂ (Kobalamin)

B₁₂ vitamini elzem eser elementlerden kobalt içeren kompleks yapılu bir vitamindir. B₁₂ vitamini eksikliğinde folat eksikliğinde görülen anemi tablosuna benzer bir anemi görülür. Bu anemi çeşidi mide mukozasında sentezlenen B₁₂ vitaminin bağırsaktan absorblanmasında etkili olan protein yokluğunda ortaya çıkar. Bu anemi çeşidi ve buna bağlı olarak gelişen sinir sistemi bozukluklarında parenteral yolu ile B₁₂ vitaminin hastalara verilmesi gerekir. B₁₂ vitamini et, karaciğer, böbrek gibi daha çok hayvansal besinlerde bulunur. Bu nedenle sadece sebze ile beslenen kişilerin B₁₂ vitamini almaları gerekir. Vitamin B₁₂ bitki ve hayvanlar tarafından yapılmaz sadece az sayıdaki mikroorganizmalarca oluşturulur (Pratt, 1972).



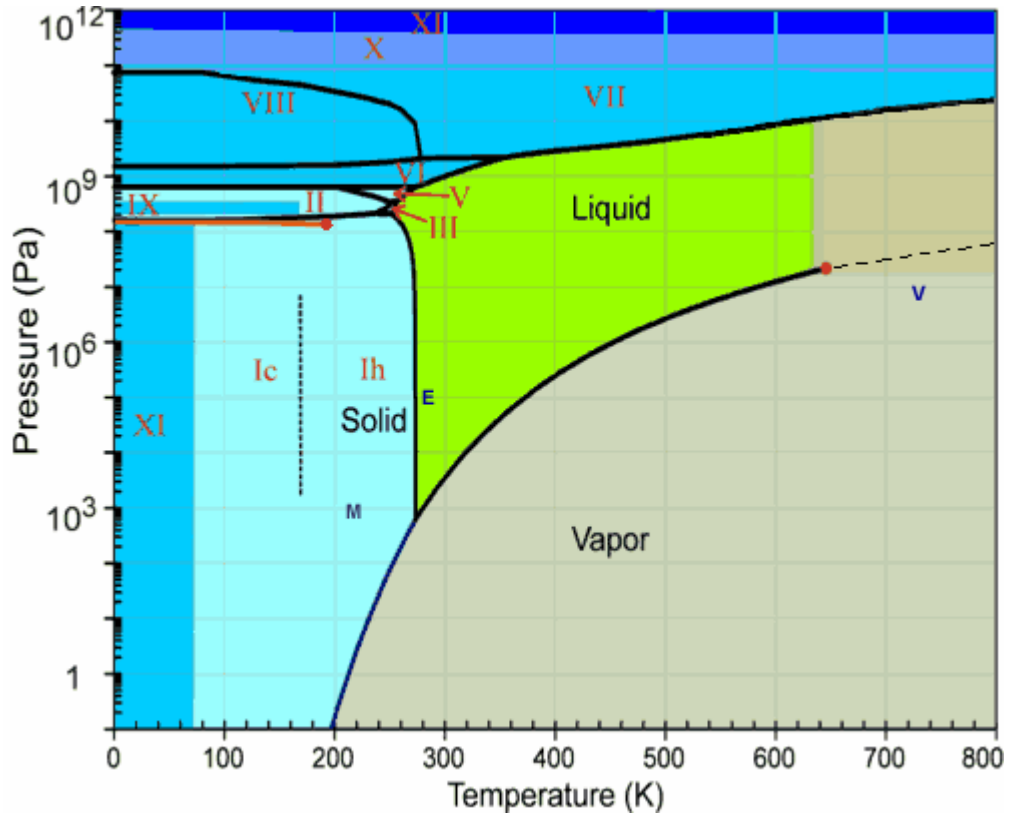
Şekil 1.9. Kobalamin (B₁₂ Vitamini)

1.3. Subkritik ve Süperkritik Suyun Özellikleri

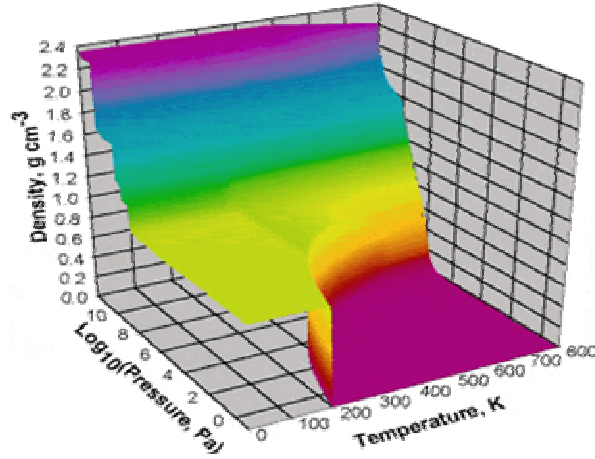
Saf bir maddenin kendine özgü bir kritik sıcaklık değeri vardır. Bu sıcaklıkta maddenin buhar basıncına kritik basınç adı verilir. Bir madde kritik sıcaklığının üstünde bir sıcaklıkta basınç ne kadar yüksek olursa olsun sıvı fazda bulunamaz. Bu

faza süperkritik faz adı verilir. Süperkritik fazda maddenin kritik koşullarda vizkosite ve yoğunluk değerleri gaz ve sıvı faz değerleri arasında olmakla beraber vizkositesi sıvı halinden on kat daha düşük, buna karşılık difüzyon hızı sıvınıninkinin on katı kadar büyük olabilmektedir. Şekil 1.10 suyun faz diyagramını göstermektedir. Su diğer tüm moleküler maddelerden oldukça farklı fiziksel özelliklere sahip olup, faz diyagramı da diğer maddelere kıyasla oldukça karmaşıktır. Bunun temel nedeni su molekülleri arasında oluşan kuvvetli hidrojen bağları olup, sıcaklık ve basınç koşullarının değişmesine koşut olarak hidrojen bağlarının nitelik ve niceliğindeki değişimler, suyun yoğunluğu, dielektrik sabiti, iyon çarpımı gibi değerlerinde önemli değişikliklere yol açar. Şekil 1.10'da mavi renkli bölge katı hali, yeşil sıvı hali ve gri buhar (gaz) halini göstermekte, 374,15 °C (647,15 K) sıcaklık ve 217,76 atm (22064 kPa) basınçla belirlenen kritik noktanın üzerinde ise bej rengi süperkritik fazı göstermektedir. Ancak kritik sıcaklığın üzerinde, basınç 1010 kPa'nın üzerindeki değerlere çıkıldığında 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. Çalışmamızı ilgilendiren kısımlar süperkritik faz ile subkritik diye adlandırılan yüksek basınçlı sıvı faz bölgesidir. Değişik yayınlarda suyun subkritik faz bölgesine ilişkin sıcaklık ve basınç sınır değerleri farklı olarak ele alınmaktadır. Burada esas alınacak olan Ohtaki (2003) ve Nakahara ve ark. (1997), tanımındır. Buna göre subkritik bölge $t_b < t < t_c$ ve $P_c < P$ sınır değerleri ile tanımlanır. Su için bu değerler $99,97\text{ °C} < t < 374,15\text{ °C}$ ve $217,76\text{ atm} < P$ şeklinde olacaktır.

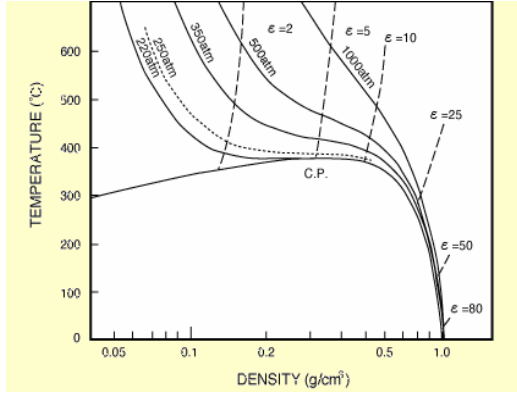
Suyun sıcaklık, buhar basıncı ve yoğunluk ilişkisi Şekil 1.11 de verilmiştir. Bu çalışmada kullanılacak bazı sıcaklık noktalarında ayrıntılı buhar basıncı değerlerini vermek gerekirse 100, 200, 300 ve 374°C noktalarında sırasıyla 102,32, 1554,43, 8590,33 ve 22060 kPa'dır (Weast, 1976). Süperkritik bölgede artık sıvı fazın varlığı söz konusu olmadığı için, buhar basıncından bahsetmek de söz konusu değildir. Kritik noktada yoğunluk 0.323 g.cm^{-3} olup normal çevre sıcaklığı koşullarındaki değerin yaklaşık üçte biridir.



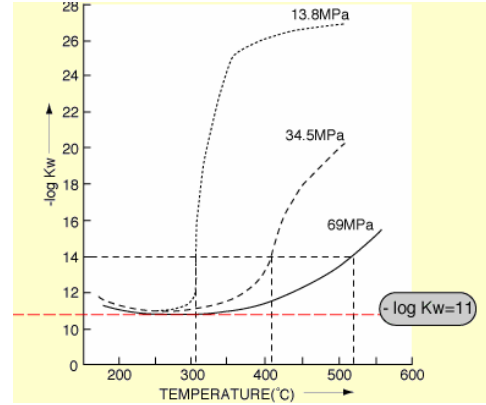
Şekil.1.10. Suyun Faz Diyagramı (Glasser, 2004).



Şekil.1.11. Suyun sıcaklık, basınç ve yoğunluk ilişkisini gösteren üç boyutlu diyagramı (Wagner ve Pruss, 1995)



Şekil 1.12. Suyun dielektrik sabiti değerleri (Glasser, 2004)



Şekil 1.13. Suyun İyon Çarpım Sabiti (Glasser, 2004)

Su ile subkritik ve süperkritik koşullarda yapılacak ekstraksiyonlarda önemli bir parametre dielektrik sabiti değeridir. Şekil 1.12'de suyun çeşitli sabit basınç değerlerinde sıcaklık ve yoğunluk değişkenleri ile dielektrik sabitin (ϵ) ilişkisi görülmektedir. Görüldüğü gibi suyun normal koşullardaki bağıl ϵ değeri 80 civarında iken, süperkritik bölgede bu değer 2'ye doğru bir düşüş göstermektedir. Hekzan, heptan ve karbonditetraklorür gibi tamamen apolar olan organik çözücülerin bağıl ϵ değerleri 2 civarında olduğuna göre, süperkritik suyun da tamamen apolar nitelikli bir çözügen olduğu anlaşılmaktadır. Buna karşılık, sıcaklık ve basınç parametrelerini ayarlayarak sub-kritik bölgede ve daha ılımlı sıcaklık ve basınçlarda orta polarlıkta veya yüksek polarlıkta su çözügeni ile polariteleri oldukça farklı bileşenleri bir katı matriksten seçici olarak ekstrakte etmek mümkündür.

Suyun iyon çarpım değerleri de sıcaklık ve basınç parametrelerindeki değişikliklere bağlı olarak oldukça ilginç bir değişim göstermektedir. 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 büyüktür. Sıcaklığın 200-300 °C aralığında olan bölgede ise basınçtan oldukça bağımsız bir şekilde iyon çarpım değerinin en yüksek değerlere ($\sim 10^{-11}$) ulaştığı görülmektedir. Bu bölgede hidronyum ve hidroksil derişimleri oda sıcaklığı koşullarına göre yaklaşık 30 kat daha büyük değerlere sahiptir.

Polisakkaritlerin su ile ekstraksiyonu sürecinde, ekstraksiyon koşullarına göre kısmen ya da tamamen yakınının hidroliz olma durumu söz konusudur. Hidronyum ve hidroksil iyonlarının derişimlerinin göreceli olarak yüksek olması, hidroliz tepkimelerini de katalizleyerek ekstraksiyon sonucu elde edilecek polisakkaritlerin/oligosakkaritlerin ortalama mol kütlelerinde azalma, buna karşılık monosakkarit ve diğer çözünür ürün miktarında artışa sebep olacaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Lou ve ark. (1994), çalışmalarında mantarlardaki serbest temel nükleikler, nükleotidler ve nükleik asitleri belirlemek için bir metot geliştirmişlerdir. Mantarlardan nükleo-bileşiklerin izole edilmesinde; ilk önce ekstraksiyon yöntemi uygulanmış, daha sonra nükleik asit grup bileşiklerini birbirinden ayırmak için boyut eleme kromatografisi kullanılmıştır. Nükleik asitlerden hidrolizle ayrılan nükleotidler ve temel nükleikler HPLC yöntemi ile tanımlanmıştır. Nükleotidler analiz etmek için iyon çifti kromatografisi kullanılmıştır. Nükleotidler ve nükleosidler diyot serili dedektör kullanılarak ($\lambda=260$ nm) analiz edilmiştir.

Lelik ve ark. (1997), Shiitake misellerinin kültürlerini üretmek için ekonomik metod bulunması ve *Lentinus* misellerinden biyoaktif bileşen eritadenin ve temel bileşik olan lentinanı tanımlamak için araştırma yapmışlardır. Shiitake miselleri submerged kültüründe başarılı bir şekilde üretilmiştir. Shiitake misellerinde üretilen biyoaktif bileşik olan eritadenin için GC-MS ölçümleri yapılmıştır. Lentinan, trithiolan ve diğer aromatik bileşikler tanımlamışlardır.

Vitanyi ve ark. (1998), çalışmalarında Shiitake mantarının ekstraktlarından eritadenini GC-MS sistemini kullanarak tanımlamışlardır. Gaz kromatografisi ve kütle spektrometrisinde apolar kapiler kolon ve kütlede iyonlaştırma kaynağı olarak elektron impakt kaynağı kullanılmıştır. Örnek hazırlama iki basamak içermektedir; ilk önce Shiitake mantarından eritadenin ekstrakte edilmesi ve sonra N-metoksi-N,O-bis(trimetilsilyl) karbomat ile 80°C'de etkileştirilmesidir. Bu basit ve hızlı metod iyi bir ayırım sağlar ve mantarın şapka kısmındaki eritadeninin tanımlanması için oldukça faydalı bir metottur.

Zhang ve ark.(1999), çalışmalarında alfa-glukan (L-FV-II) ve beta-glukan (L-FV-I)'ı *Lentinula edodes* mantarının meyve gövdesinden ekstraksiyonla izole etmişlerdir. Ekstraksiyon aşamasında %5 NaOH, %0.5 NaBH₄ kullanılmış ve daha sonra 1 M asetik asit ile çöktürme yapılmıştır. HPLC, C-13 NMR ve infrared analiz sonuçlarına bakıldığında L-F-II yani α (1-3)-D glukanın hafif (1 - 6) dallanmasının olduğu belirtilmiştir. L-F-I yani β (1- 3)-D glukanın %10 oranında protein içerdiğini ve dallanmaların olduğu sonucuna varılmıştır.

Jang ve ark. (1999)'nın yaptığı çalışmanın amacı, *Flammulina velutipes*, Shiitake ve *Aparicus bisporus* mantarlarındaki polisakkarit ekstraktlarının insan hepatoma SMMC 7721 hücreleri ve fare derisindeki Sarcoma 180 tümörünün in vivo üzerindeki etkilerini incelemektir. Bu mantarların polisakkaritleri meyve gövdesinden sıcak su ekstraksiyonu, Sevag'la proteinlerin uzaklaştırılması, etanol çöktürülmesi, tripsin dinlendirilmesi ve etanolün fraksiyonlu çöktürülmesi gibi yöntemlerle izole edilmiştir. İnsan hepatoma SCMM 7721 hücreleri 50 mg/L polisakkarit ekstraktları ile muamele edilmiş ve mitoz içerikleri ve mitokondri aktiviteleri farklı zamanlarda ikili kontrollerle deneysel grup çalışmalarıyla bulunmuştur. Fare derisindeki S-180 tümörleri vücut ağırlığının kilogramı başına 24 mg olacak şekilde, 9 gün boyunca polisakkarit ekstraktlarına enjekte edilmiş ve tümörün ağırlığı 15. günde ölçülmüştür. Mitozun, in vitro hepatoma hücreleri üç çeşit yenilebilir mantarların polisakkarit ekstraktları ile muamele edildiğinde, önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Hücre numaraları ve mitokondri aktivitesine ait SCMM 7721 hücreleri, diğer kontrol gruplarınınkinden daha az polisakkarit ile etkileştirilmiştir. Polisakkarit ekstraktlarının farenin S-180 tümörlerine karşı inhibisyon oranları %52.8, %56.6, %51.9' dur. Yenilebilir üç çeşit mantarın polisakkarit ekstraktlarının sadece vitrodaki kötü huylu hücreleri değil, vivodaki S-180 hücrelerini de azalttığı gözlenmiştir.

Cheung ve ark. (2002), Shiitake ve *Volvarielle volvacea* mantarlarının metanol ve saf su ekstraktlarındaki antioksidant kapasitelerini üç farklı metotla araştırmışlardır. Bunlar β -karoten, linoleik asit sistemi, 1-1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikal aktiviteleri ve peroksi radikalleri tarafından fare eritrositinin hemolizinin yavaşlatılması gibi yöntemlerdir. Dört mantar ekstraktı arasında *Lentinula edodes*'in su ekstraktı radikal aktivitesi açısından her metotta en fazla aktivite göstermiştir. Örneğin, β -karoten metodunda 20 mg/ml'de %75,9 oranında; DPPH radikal aktivite metodunda 6 mg/ml'de %55,4 oranında; eritrositin hemolizinin yavaşlatma metodunda ise 5 mg/ml'de %94,9 oranında radikal inhibisyonu gözlenmiştir. Sonuç olarak su ekstraktındaki toplam fenoliklerin, metanol ekstratındaki fenoliklerden daha yüksek olduğu ve bu nedenle bu ekstraktların güçlü antioksidant aktivitelerinin olduğu saptanmıştır.

Akamutsu ve ark. (2004), yenilebilir mantarın miselini bir kütük üzerinde kültüre etmişler ve mantar olgunlaştıktan sonra iki fraksiyon yöntemi uygulamışlardır. Bunlardan birincisi sıcak-su ekstraksiyonu (LEM) diğeri ise etanol ekstraksiyonudur (ESMe). Farenin dimetilnitrozaminle etkileştirilmesiyle LEM'in ve ESMe'nin hepatokoruma etkilerinin olup olmadığı kontrol edilmiştir. İki fraksiyonun da kan aspartat aminotransferaz ve alain aminotransferaz seviyelerini düşürdüğünü, kollojen liflerin toplanmasını kısmen inhibe ettiği görülmüştür. Her iki fraksiyonun ayrıca morfolojik değişimleri ve izole edilmiş fare hepatatik stallete hücrelerini inhibe ettiği belirtilmiştir. İki fraksiyonun polifenollerini içerdiği saptanmıştır.

Mondal ve ark. (2004), yenilebilir bir mantarın, *Termitomyces eurhizus*, meyve kısmından suda çözünebilen polisakkaritleri ekstrakte etmişler ve bu polisakkaritlerin yapısını araştırmışlardır. PS-I ve PS-II olarak kodlanan iki homojen polisakkarit fraksiyonunun monosakkarit olarak sadece D-glukozu içerdiğini bulmuşlardır. Metilasyon analizleri ve periyodat oksidasyonu çalışmalarının ardından GLC-MS (gaz-sıvı kromatografisi-kütle spektroskopisi) 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.

Vuillaud ve ark. (2004), *Lentinula edodes*, *Agaricus bisporus* ve *Boletus edulis* gibi yenilebilir mantarlardaki önemli ve toksik elementlerin fraksiyonlama yöntemlerini nelerin etkilediğini incelemişlerdir. Bu incelemeler yapılırken de elementel ayrımları belirlemek için boyut eleme kromatografisiyle birleştirilmiş ICP-MS cihazı kullanılmıştır. Maddelerin büyük yada küçük molekül ağırlıklarına sahip oldukları UV dedektör ve ICP-MS kullanılarak belirlenmiştir. Ayrımlar için Superdex 75 kolonu kullanılmıştır. Ayrımların değişkenliği üç ayrı ekstraksiyon yöntemi kullanılarak ($0.05 \text{ mol}^{-1} \text{ NaOH}$, $0.05 \text{ mol}^{-1} \text{ HCl}$ veya 60°C de dolayındaki sıcak su) yapılmış ve mantarların özellikleri değerlendirilmiştir. Çalışılan bu mantarda yani *Boletus edulis*, *Agaricus bisporus* ve *Lentinula edodes*'te bulunan gümüş, arsenik, kadmiyum, civa, kurşun gibi elementlerin fraksiyonlamadaki farklılıkları da incelenmiştir.

Choi ve ark. (2005), çalışmalarında ısı değişimlerinin antioksidant aktivitelerine etkilerini incelemişlerdir. Shiitake 100 ve 121 °C'de 15 yada 30 dakika boyunca otoklavda ısıtılmış ve mantar içerisindeki serbest, bağlı polifenolikler ve flavanoidler ekstrakte edilmiştir. 2,2-Azino-bis(3-etilenbenzothiazalin-6-sülfonik asit)(ABTS) radikali ve 1,difenil-2-pikrilhidrazil radikal aktivitelerinin ekstraktaki antioksidant aktiviteleri ölçülmüştür. Isı arttırıldıkça ekstraktaki polifenolik bileşikler ve antioksidant etkileri de artmıştır. Örneğin, ekstrakt içindeki polifenolik bileşiklerin konsantrasyonu 121°C'de 30 dakika boyunca ısıtılırsa ham örnek ekstraktına göre 1,9 oranında artmaktadır. ABTS ve DPPH ile muamele edilirse ham örnek ekstraktına göre 2 yada 2,2 oranında daha fazla antioksidant özellik göstermektedir. Sonuç olarak, ısıl işlem hücre duvarlarını parçalayarak daha çok çözünen polifenoliklerin ekstrakt çözeltisine geçmesine neden olmaktadır.

Yen ve ark. (2005), Fungal çitosan B veya C, ham çitinin B veya C alkali N-deasetilasyonu ile 60, 90, 120 dakika'da hazırlanmalarının antioksidant özellikler üzerinde nasıl etkili olduğunu incelemişlerdir. Çitosanın 1 mg/ml'de %61,6-%82,4 oranında antioksidant etki gösterdiği ve 10 mg/ml'de ise 0.42-0.57 oranında indirgeme gücüne sahip olduğu belirlenmiştir.

Liu ve ark. (2005), çalışmalarında Shiitake mantarlarında bulunan formaldehitin sıvı-faz mikroekstraksiyon ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemleriyle tanımlamaya çalışmışlardır. Shiitake mantarı su ile ekstrakte edilmiştir. Difenilhidrazinle türevlendirilmiş ve süzölmüş formaldehit mikroşırınga içerisindeki aynı hacimli süspanse edilen iyonik sıvı ile ekstrakte edilmiş ve son olarak tanımlanmak için HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Önerilen prosedürde ekstraksiyon çözeltisi içerisindeki formaldehitin bulunma sınırı 5 $\mu\text{g l}^{-1}$ 'dir. 53,5 $\mu\text{g l}^{-1}$ formaldehit standartları için metodun bağıl standart sapması %3,5'dir. Shiitake mantarında sağlığa zararlı formaldehite 119-494 $\mu\text{g g}^{-1}$ (ıslak ağırlıkta) konsantrasyonunda rastlanmıştır.

Dikeman ve ark. (2005), Farklı olgunluk hallerindeki karbonhidrat profilleri pişmiş ya da pişmemiş olmalarına göre birbirine yakın özellikte seçilmiş mantarlar kullanılarak çalışılmıştır. Küçük beyaz mantarların (*Agaricus bisporus*) yüksek oranda kül içerdiği (%12,5 olgunlaşmamış mantarlarda; % 11,9 ise olgunlaşmış

mantarlarda) belirtilmişlerdir. Nişasta ve toplam diyet lif konsantrasyonlarının Maitake ve Shiitake mantarlarında daha fazla olduğu belirtilmiştir. Ham protein ve asit hidrolizli yağ miktarının *Agaricus bisporus*, Maitake ve küçük beyaz mantarlarda daha fazla olduğu gözlenmiştir. Çitin konsantrasyonlarının ise *Agaricus bisporus*’ta %8, *Flammunila velutipes* mantarlarında ise %7,7 oranında olduğu saptanmıştır. Nişasta ve toplam diyet lif ve asit hidrolizli yağ miktarlarının, pişirildikçe arttığı, ham protein ve çitin konsantrasyonlarının ise azaldığı, mantarın olgunlaşmasıyla ise çitin konsantrasyonunun arttığı belirtilmiştir.

Unursaikan ve ark. (2006), çalışmalarında *Lentinula edodes* mantarının dört farklı türünün meyve kısımlarından dört tane suda çözünmeyen farklı moleküler kütlelere sahip (1→3) α - glukanlar elde etmişler ve bunları LII₁, LII₂, LII₃, LII₄ olarak kodlamışlardır. Bu dört α -D glukanı O- sülfolanmış türevlerine dönüştürülme dereceleri 0,9 ile 2,1 arasındadır. Örneklerin yapı tayinlerinde FT-IR, 13C NMR ve elementel analiz cihazları kullanılmıştır. Doğal α -glukanlar ve O-sülfolanmış türevlerinin dönüş yarıçapları ve gerçek viskozitelerinin ortalama moleküler kütleleri ölçümleri sırasıyla SEC-LLS, LLS ile; viskozimetre ölçümleri ise 25°C’de DMSO içerisinde 0.25 M LiCl ve 0.2 M sulu NaCl çözeltisi ile yapılmıştır. O-sülfolanmış türevlerin ortalama moleküler kütle değerleri, α - glukanlarınkinden daha düşük bulunmuştur. Deney sonuçları; O-sülfolanmış türevlerin, etrafındaki grupların etkileşimleri veya molekül içi hidrojen bağlarından dolayı sulu çözeltide geniş bükülgen zincir yapıda bulunduğunu ve çözünebilir olduğunu göstermektedir. α - D-glukanların ve O-sülfolanmış türevlerinin anti-tümör etkileri, canlı ve laboratuvar ortamında Sarcoma 180 hücrelerine karşı ölçülmüştür. İlginç bir şekilde, O-sülfolanmış türevlerin Sarcoma 180 hücrelerine karşı antitümör etkisinin α -glukanlara göre daha fazla olduğu saptanmıştır.

Kitzberger ve ark. (2006), çalışmalarında yüksek basınçlı sistemler ve düşük basınçlı metodlar olmak üzere farklı ekstraksiyon metodu kullanarak Shiitake mantarını ekstrakte etmişlerdir. Ekstraksiyon işlemi saf CO₂ ve CO₂ ile birlikte modifiye bir çözücü kullanılarak 30 MPa (4135 psi) basınç yapılmıştır. Düşük basınçlı ekstraksiyon yöntemlerinde, organik çözücü olarak n-hekzan, etil asetat ve diklormetan kullanılmıştır. Farklı ekstraksiyon yöntemlerinden elde edilmiş

ekstraktlar, DPPH (2,2 difenil-1-pikril-hidrozil-hidrat) antioksidant aktivitesi ve denemeleri ile değerlendirilmiş ve sonuçlar toplam fenolik bileşenlerin ölçümlerini gösteren Folin-Denis metodu ile karşılaştırılmıştır. Ekstraktların, antimikrobial aktiviteleri dört tane denek bakteri kullanılarak incelenmiştir. CO₂ ve modifiye çözücü olarak %15 etanol kullanıldığında (40 °C, 20 MPa) düşük basınçta diklormetanin kullanılarak yapıldığı metodtakine benzer antioksidant içerikli ekstraktlar elde edilmiştir. Bunun yanında sadece süperkritik akışkan ekstraktlarının, *Micrococcus luteus* ve *Bacillus cereus* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Süperkritik akışkanlarla ekstraksiyonda (CO₂ ve etanol modifiye) ekstraksiyon verimi %1,01 ile 3,81 arasındadır. Hekzanın çözücü olarak kullanıldığı düşük basınç ekstraksiyonunda ise ekstraksiyon verimi %1,25'tir.

Enman ve ark. (2007), çalışmalarında eritadenin içeren dört farklı Shiitake mantarı kullanmışlardır. Bunları Le-1, Le-2, Le-A, Le-B olarak kodlamışlardır. Mantar hücrelerinden mümkün olduğunca hipokolesteromik ajanları geri kazanabilmek için metanol ekstraksiyonu yapılmıştır. Eritadenini analiz etmek için güvenilir, tekrarlanabilir HPLC metodları geliştirilmiştir. Çalışmada, Shiitake mantarında diğer çalışmalarda belirtilen miktardan 10 kat fazla eritadenin olduğu belirtilmiştir. Metanol ekstraksiyondan önce mantarların hidrolitik enzimle ön muamele edilmesi sonucu, eritadenin miktarının arttığı gözlenmiştir.

Lo ve ark. (2007), *Lentinula edodes* mantarından basınçlandırılmış su ekstraksiyonu (PWE) ile elde edilen polisakkaritlerin ikincil metabolit olarak uygulanabilirliğini incelemişlerdir. Bu nedenle bir seri deney yapılmış, ekstraksiyon zamanları ve basınçları incelenmiştir. Misel peletlerindeki polisakkaritlerden %90 civarındaki maksimum kazanımın olduğu koşulların basıncın 10,1 MPa, ekstraksiyon süresinin 70 dk ve sıcaklığın 28 °C' olduğu gözlenmiştir. Kaynatılarak yapılmış su ekstraksiyonunda (BWE) 0.1 MPa basınç ve 40°C sıcaklıkta ve % 27,9'luk kazanım sağlanmıştır. Jel kromatografisi ve NMR deneyleri, hem PWE hem de BWE polisakkaritlerinin, dört tane α -(1→4)-D-glukopronosil ve β -(1→6)-D-glukoprironosil bağlı benzer molekül kütleli bileşikler olduğunu göstermiştir. Basınçlandırılmış su ekstraksiyonunda; yüksek basınç sayesinde, polisakkaritlerin

hidrojen bağlarının kısmen parçalanması, yapının elastikliğini ve suda çözünübilirliğini arttırmaktadır.

3. MATERYAL VE METOD**3.1. Materyal**

Shiitake (*Lentinula edodes*) mantar şuşları Denizli'nin Hacıyüplü Köyü'ndeki Agroma Mantar Üretim Çiftliği'nden temin edilmiştir.

3.1.1 Mantar Örneklerinin Hazırlaması

Lentinula edodes mantarları küçük parçalar halinde doğranarak parçalayıcıda (blendarda) öğütülmüştür. Öğütülmüş mantar örnekleri, sıvı azot ile dondurulup -48 °C'de vakum altında 72 saat boyunca liyofilizatörde kurutulmuştur. Kuru mantar örnekleri paketlenerek ekstraksiyon işlemlerine kadar desikatörlerde saklanmıştır.

3.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada aseton (Merck), asetonitril (Merck), baryum karbonat (Merck), CuSO₄.5H₂O (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, sülfürik asit (Merck), pH 7,2 fosfat tamponu (NaCl, KCl, KH₂PO₄, Na₂HPO₄) (Merck), trikloroasetik asit (Merck) kimyasal maddeleri temin edildikleri şekilde (ekstra saflaştırma işlemi yapılmadan) kullanılmıştır.

3.1.3. Kromatografik ve Spektroskopik Analizlerde Kullanılan Standartlar

Çalışmada aşağıdaki standart maddeler kullanılmıştır:

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, immunoglobulin white protein (Sigma).

3.2. Metod**3.2.1 *Lentinula edodes* mantarının atmosferik basınçta su ile ekstraksiyonu**

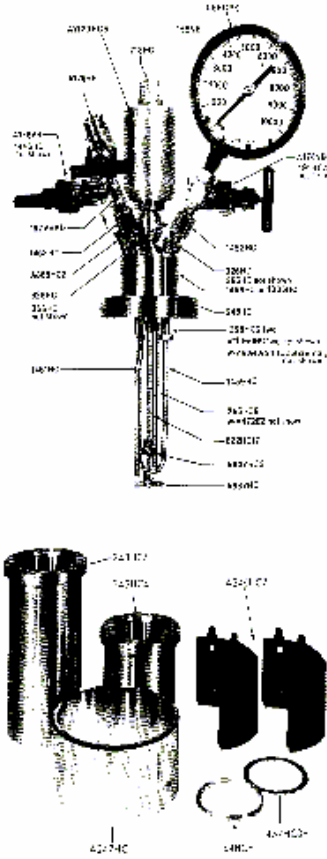
Yaklaşık 130 g kuru Shiitake mantarı, 4 litrelik balona konularak atmosfer basıncında 100 °C’ de 3 kez 8 saatlik ardışık ekstraksiyona tabi tutulmuştur. İşlem sonunda elde edilen tüm ekstraktlar birleştirilmiştir.

3.2.2. Subkritik Su ile Ekstraksiyon Çalışmaları

Lentinula edodes mantarının subkritik su ile ekstraksiyonu 500 mL hacimli Parr 4575 model HP/HT yüksek basınç reaktörü (Şekil 3.2.) ile gerçekleştirilmiştir.

Bu reaktörde, 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 alyan vida bulunduran bir kapak sistemi daha mevcuttur.

Yeterli miktarda mantar örneği ve su reaktöre konduktan sonra grafit gasket yerleştirilip manometreli, karıştırıcılı ve valfli kapak kapatılmıştır. Isıtma işlemi Parr 4842 model manyetik karıştırıcılı ısıtıcı ile gerçekleştirilirken, reaktör içindeki sıcaklığın kontrolü bir ısılıçifti (thermocouple) aracılığı ile sağlanmıştır. İstenen sıcaklığa ulaşıldıktan sonra reaktöre karbondioksit gazı basılarak ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon deneyleri suyun kritik basıncı üzerinde 50-200°C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2. Parr Instrument Co., Model 4575 HP/HT 500 ml yüksek basınç reaktörü

3.2.2.1 *Lentinula edodes* mantarının Subkritik su ve CO₂ ile ekstraksiyonu

Lentinula edodes mantarının ekstraksiyon deneyleri suyun kritik basıncı üzerinde (280 bar) ve 50, 100 ve 150°C sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir. Kurutulmuş yaklaşık 40 g mantar örneği 500 ml hacimli yüksek basınçlı reaktöre yüklendikten sonra üzerine 400 ml su eklenmiştir. İstenen sıcaklığa (50, 100 ve 150°C) ulaşıldıktan sonra reaktöre 260D Model ISCO yüksek basınç pompası ile reaktörün basıncı 280 bar oluncaya kadar karbondioksit gazı basılmıştır. Bu koşulda bir saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda reaktör buzlu suya daldırılarak soğumaya bırakılmıştır. Daha sonra reaktörün kapağı açılarak ekstraktlar alınmıştır.

3.2.2.2 Ekstraksiyon Sonrası Bileşenlerin İzolasyonu

Ekstraksiyon sonrasında elde edilen sıvı ekstrakt süzildükten ve belirli bir hacme kadar (yaklaşık 25-30 ml) deriştirildikten sonra, polisakkaritler dışındaki suda çözünen yapıları uzaklaştırmak için yaklaşık 4 g trikloroasetik asit ile deprotenize edilmiştir. Santrifüjlenen örnekten elde edilen çözelti kısmı, üç gün akan suda ve bir gün de deiyonize suda molekül ağırlığı 3500 Da'dan küçük olan moleküllerin uzaklaştırılması için diyaliz edilmiştir (Serva Membra-Cell Dialysis Tubing, MWCO 3500 Da). Diyaliz kesesinde kalan kısım bir balonda toplanarak, yapıda suda çözünen polisakkarit dışında hiçbir bileşen kalmaması için üzerine sıvı ekstrakt hacminin 4 katı kadar etanol ilave edilmiş ve bir gece -10°C'de bekletilmiştir. Etanol ile muamele sonrasında oluşan çökelti kısımları 15 dk (5000 rpm ve -4°C) santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında çöken kısımlar (polisakkarit içerikli katı) alınarak saf suda çözünmesi sağlanmıştır. Suda çözünen kısımlar birleştirilip, kuruluğa kadar deriştirildikten sonra sıvı azot ile dondurulup liyofilizatörde -48 °C'de vakum altında kurutulmuştur.

3.3 *Lentinula edodes* Mantarından Ekstrakte Edilen Polisakkaritlerin Ortalama Moleküler Kütlelerinin Belirlenmesi**3.3.1 GPC Analizleri**

Boyut eleme kromatografisi (GPC) özellikle büyük molekül kütlesine sahip polimerlerin moleküler kütlelerini (M_w) belirlemede kullanışlı bir tekniktir. Boyut eleme kromatografisi, linear homo polimerlerin moleküler kütlelerinin belirlenmesinde ve polimerlerin polimer zincirleri boyutuna göre ayrılmasında önemlidir (Yau ve ark., 1979; Mori ve ark., 1999). GPC kolonu, küçük moleküllerin daha uzun süre kolonda kalmasını sağlayacak gözenekler içerir. GPC metodu molekülleri boyutlarına göre ayırmaktan çok çözelti içindeki polimer molekülünün hidrodinamik hacmine göre ayırımı yapmayı sağlar. Moleküller sadece etkin büyüklüklerine bağlı olarak gözeneklerde farklı sürelerde kalırlar. Gözenekten daha büyük boyuttaki moleküller gözeneklere giremezler ve dolayısıyla dolgu maddesi tarafından tutulamazlar. Bu nedenle de hareketli fazla kolayca sürüklenip kolondan

ilk çıkarlar. Öte yandan çapı gözenek çapından çok daha küçük olan moleküller gözenek içinde sağa sola yalpaladıklarından gözeneklerde kalma süreleri artar ve kolonu en son terk ederler. Bu iki sınır değeri arasındaki büyüklükte olan moleküller birbirlerinden ayrılabilirler. Bunlar molekül çaplarına ve bir dereceye kadar da şekillerine bağlı olarak farklı zamanlarda kolonu terk ederler.

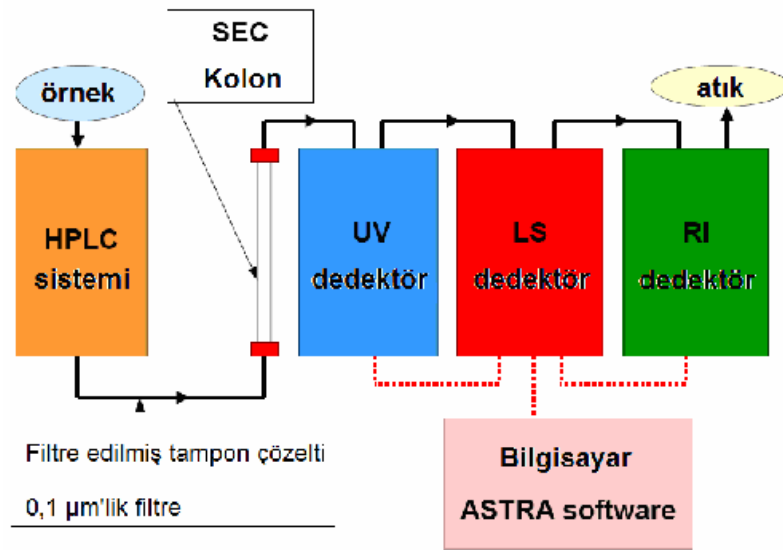
GPC metodunda molekül kütlesinin hesaplanması, kullanılacak materyal ile benzer özelliklere sahip standartların kullanımını gerektirir. Ancak bu yöntem her zaman doğru sonuç vermeyebilir. Elde edilen polisakkaritlerin yapısı ile kullanılan standartlarının yapılarının farklı olması nedeniyle sonuçların gerçeğe yakınlığı biraz şüphelidir.

Bu çalışmada, *Lentinula edodes* mantarının bileşenlerinden bir kısmını oluşturan polisakkaritlerin, ortalama molekül kütleri Shimadzu 10A_{VP} HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için moleküler ağırlıkları 4400, 9900, 21400, 43500, 124000, 196000, 277000 ve 401000 Da olan dekstran standartları kullanılmıştır. Analizlerde Waters Ultrahydrogel 2000 (MWR: 50 kDa-5 000 kDa ve 300 mm x 7,8 mm x 2000 Å) ve Ultrahydrogel 250 (MWR:1 kDa-80 kDa ve 300 mm x 7,8 mm x 250 Å) kolonları Shimadzu HPLC sisteminde molekül büyüklüklerine göre seri bağlı şekilde birleştirilerek kullanılmıştır. Analitik modda, refraktif indeks (Shimadzu RID-10A) dedektör ile 70°C fırın sıcaklığında çalışılmıştır. Standartlar ve örnekler SIL-10AF (Shimadzu Automatic Sample Injector) otomatik örnekleyici ile HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Her bir örnek enjeksiyon hacmi 50 µl olarak şekilde verilmiştir. Mobil faz olarak 0,001 M NaOH çözeltisi 0,7 ml/dk akış hızında kullanılmış ve örnekler 37 dakika boyunca elue edilmiştir.

3.3.2 HPSEC-MALLS Analizleri

Lentinula edodes mantarının polisakkaritlerinin ortalama molekül kütleleri HPSEC-MALLS ile de belirlenmiştir. Wyatt DAWN-DSP çok açılı ışık saçılım dedektörü (Multi Angle Light Scattering, MALLS), Duratec Analysentechnik RI2000 refraktif indeks dedektör ve Shimadzu SPD-6A UV dedektör bu sistemde seri bağlanarak kullanılmıştır. Shiitake mantarının bütün polisakkarit ekstraktlarının

analizi, oda sıcaklığında Superose™ 12, 10/300 GL kolonda izokratik olarak yapılmıştır. Elüsyonlarda hareketli faz olarak 0.005M NaN₃ + 0.2M NaCl karışımı kullanılarak 0.45 mL/dk akış hızında çalışılmıştır. Elde edilen veriler ve sonuçların değerlendirilmesi Astra Software (Wyatt Technology, USA) ile yapılmıştır. Bütün örnekler 2 mg/ml olacak şekilde hazırlanmış ve bir gece boyunca karıştırıcıda hidrate edilmiştir. Örnekler enjeksiyondan önce naylon filtrelerden (0.1 µm) filtre edilmiş ve 100 µl örnek, manuel olarak enjekte edilmiştir.



Şekil 3.3 HPSEC-MALLS sistemi

3.4 Enzimle Parçalama

Enzimle parçalama deneylerinde biyolojik protein-glukan bandını kırmada etkili olan “Protease” enzimi (Sigma, Almanya) kullanılmıştır. 0,2 M NaCl tuz çözeltisi içeren pH 7.5 fosfat tamponu kullanılarak $1,6 \times 10^3$ g/ml protease çözeltisi hazırlanmıştır. Örnekler 4 mg/ml konsantrasyonunda bu çözeltide çözülerek hazırlanmış ve örnekler ve enzim çözeltisi 4 saat boyunca döner çalkalayıcıda hidrate edilmiştir. Kontrol örneği de aynı yol izlenerek hazırlanmıştır.

1 ml örnek çözelti ve 1 ml protease çözeltisi karıştırılarak 37 °C’de 24 ve 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürecinden sonra, örnekler 0,1 µm filtreden süzildükten sonra HPSEC-MALLS sistemine enjeksiyonları yapılmıştır. İnkübe

edilmiş örnekler ve kontrol örneğinin HPSEC-MALLS sonuçları; protein-glukan kompleksindeki protein yüzdesini ve molekül kütlelerini vermektedir.

3.5 Polisakkarit Ekstraktlarının Kimyasal Bileşiminin Belirlenmesi

3.5.1 Monosakkarit Analizleri

Lentinula edodes mantarının monosakkarit bileşimlerini belirlemek için Varian HPLC sistemi kullanılmıştır. 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 (250x4.6 mm, 5 µm), asetonitril (C₂H₃N)/su (H₂O) % (80/20) mobil fazı ile 0.3mL/dk. akış hızında kullanılmıştır. Monosakkarit standartları (glukoz, galaktoz, mannoz, ramnoz, arabinoz, ksiloz, fruktoz, Sigma) kaba ekstraktaki gerçek şeker miktarını belirlemek için farklı derişimlerde kullanılmıştır. Shiitake mantarı örneklerinin polisakkarit ekstraktları (10mg/mL) %4'lük H₂SO₄ çözeltisi (örnek başına 5 ml) ile 6 saat boyunca 100 °C'de ağzı kapaklı viallerde hidroliz edilmişlerdir. Hidrolizden sonra, çözelti ayrı tüplere aktarılmıştır. Asidin fazlası, oluşan kabarcıkların taşmasını önlemek için son derece yavaş bir şekilde BaCO₃ eklenerek tamamen uzaklaştırılmıştır. Çözelti bir gece beklemeye bırakılmış ve ertesi gün 20 dakika boyunca 3000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen çözelti 0.45 µm'lik filtreden süzöldükten sonra HPLC sistemine 20 µl olacak şekilde enjekte edilmiştir.



Şekil 3.4. Monosakkarit analizlerinde kullanılan Varian HPLC sistemi

3.5.2 Lowry Protein Metodu

Kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında Bovine Serum Albumin (BSA) ve Immunoglobulin White Protein (WPI, Sigma) protein standartları kullanılmıştır. BSA ve WPI stok çözeltileri (2 mg/ml) pH'sı 7.2 olan 0,2 M fosfat tamponu içinde hazırlanmıştır. Örnekler %1'lik (w/v) konsantrasyonda yine fosfat tamponu içinde hazırlanmıştır. Standartlar ve örnekler bir gece hidrate edilmiştir. Protein standartları stok çözeltilerden 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 absorbans değerleri okunmuş ve oluşturulan kalibrasyon eğrisinden polisakkaritlerin içeriğindeki % toplam protein miktarı hesaplanmıştır (bakınız: Ek A, Hesaplamalar).

3.5.3 Üronik Asit İçeriği

Örneklerin üronik asit içeriği kolon elüsyonundan sonra titrimetrik nötralizasyon titrasyonu ile belirlenmiştir. Amerlite-120 reçine (asit formu) ile doldurulmuş bir katyon değıştirici reçine bu amaç için kullanılmıştır. 10 ml %3'lük (w/v) polisakkarit çözeltisi kolona verilmiş ve 100 ml deiyonize su ile yıkanmıştır. Eluent ve yıkama sonucunda alınan çözelti 0.01 M sodyum hidroksit çözeltisi ile fenolftalein indikatörü kullanılarak titre edilmiştir(bakınız: Ek A, Hesaplamalar).

3.5.4 Çözünürlük Testi

Polisakkarit ekstraktlarının çözünürlük testi hem nötral hem de bazik sulu çözeltilerde yapılmıştır.

3.5.4.1 Bazik ortamda çözünürlük testi

70 mm'lik cam bir fiber filtre 105°C'de 1 saat boyunca fırında kurutulmuş ve desikatörde soğutulup tartılmıştır (m_1). 300 ml'lik bir deney tüpüne yaklaşık 0,01 g örnek tartılıp (m_0) 5 ml 2-propanol ile karıştırılmıştır. Örnek magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırılırken, üzerine 100 ml %0.1 (w/w) etilen diamintetra 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 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).

3.5.4.2 Nötral ortamda çözünürlük testi

70 mm'lik cam bir fiber filtre 105°C'de 1 saat boyunca fırında kurutulmuş ve desikatörde soğutulup tartılmıştır (m_1). Yaklaşık 80-100 ml %1 ve %2'lik örnek çözeltisi hazırlanıp ve bunlar oda sıcaklığında 30 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra çözelti 20°C'de 2500 rpm'de 30 dakika santrifüjlenmiştir. Bu işlem sonunda çözelti cam fiberden vakum altında filtre edilmiş ve 105°C'de 1 saat kurumaya bırakılmıştır. Desikatörde soğutulan filtre tartılarak (m_2) çözünmeden kalan kısmın miktarı aşağıdaki formülle hesaplanmıştır(bakınız: Ek A, Hesaplamalar).

3.6 FT-IR (Infrared) Analizleri

Lentinula edodes mantarının polisakkaritlerindeki bileşenleri belirlemek için, 400–4000 cm^{-1} aralığında FT-IR (Perkin Elmer Spektrum RXI FT-IR) spektroskopi sistemi kullanılmıştır. Katı halde bulunan polisakkarit ekstraktlarının spektrumları, potasyum bromür (KBr) kullanılarak alınmıştır. Yaklaşık 100 mg iyice kurutulmuş KBr havanda iyice öğütülmüş, 15000 psi'lik basınç uygulanarak saydam bir disk haline getirilmiştir. Daha sonra, Shiitake mantarının sıcak su ve subkritik su ekstraktları da yine her biri için en az 1 mg civarında olacak şekilde tartılıp, 100 mg

KBr ile karıştırılarak havan içerisinde iyice öğütülmüştür. Saydam birer disk haline getirilmiş örneklerin FT-IR spektrumları saf KBr'ye karşı alınmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMALAR**4.1 GPC Analizleri**

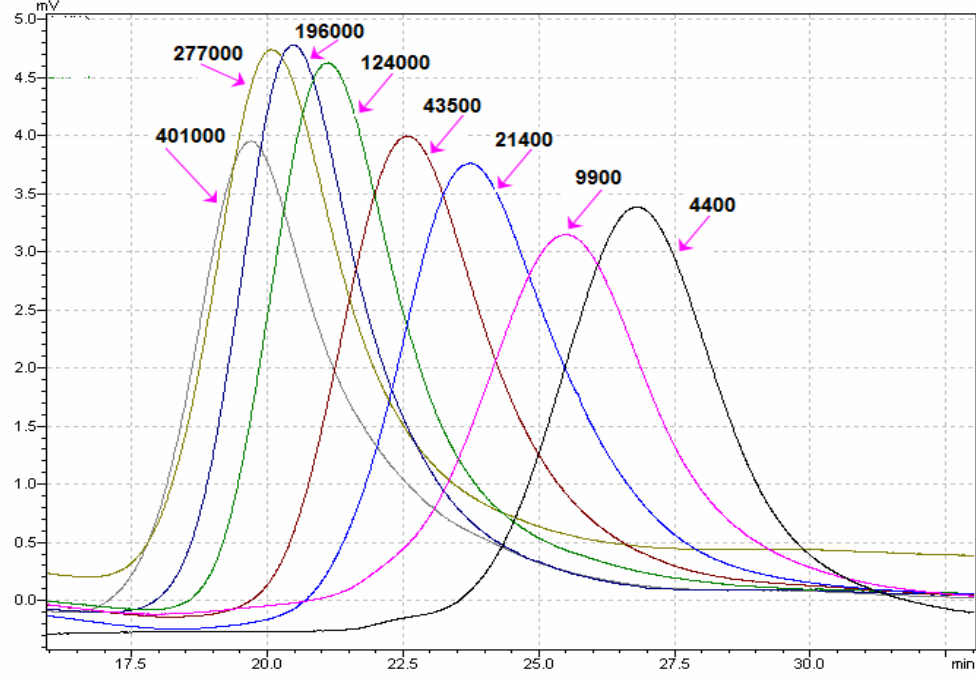
Lentinula edodes (Shiitake) mantarından 50, 100, 150°C’de ve 4060 psi sabit basınç CO₂ atmosferi altında subkritik su ile ve 100°C’de atmosferik koşullarda sıcak su ile ekstrakte edilen kaba polisakkarit miktarları Çizelge 4.1’de verilmiştir. Ekstraksiyon işlemlerinde yaklaşık aynı miktarlarda mantar örnekleri ve aynı hacimde su kullanılmış olmasına rağmen farklı miktarlarda polisakkarit ekstraktları elde edilmiştir.

Çizelge 4.1. *Lentinula edodes* mantarının farklı ekstraksiyon koşullarında elde edilen kaba polisakkarit miktarları

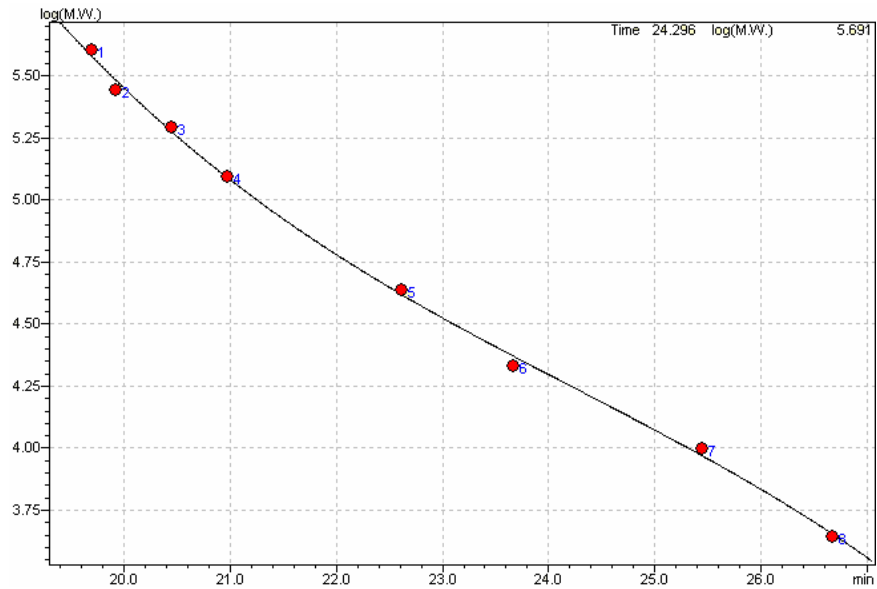
Ekstraksiyon Koşulları	Shiitake (g)	Polisakkarit içerikli katı örnek miktarı (g)
50±5°C-4025 psi	40,1832	0,0729
100±4°C-4150 psi	40,2284	0,1093
150±2°C-4100 psi	40,3194	0,3128
100°C- 1 atm	130,025	0,9675

Subkritik su koşullarında, ekstraksiyon sıcaklığının artırılmasıyla elde edilen kaba polisakkarit miktarları da artmıştır. Yüksek basınçlı ekstraksiyonların, çözücülerin fiziksel özelliklerini önemli derecede değiştirerek ekstraksiyonun daha verimli olmasına sebep olduğu bilinmektedir (Barbero ve ark., 2006).

Elde edilen kaba polisakkarit ekstraktlarının ortalama molekül kütleleri GPC analizleri ile belirlenmiştir. Molekül ağırlıkları 4400, 9900, 21400, 43500, 124000, 196000, 277000 ve 401000 Da olan dekstran standartlarının GPC’deki alıkonma zamanları belirlenmiş ve alıkonma zamanı-log MW(pik maksimumundaki molekül kütlelerinin logaritması) kalibrasyon eğrisi yardımıyla liyofilize edilmiş mantar örneklerinin ortalama molekül kütleleri, pik maksimumundaki molekül kütlesi (Mp) değerleri dikkate alınarak hesaplanmıştır. Dekstran standartlarına ait elüsyon profilleri Şekil 4.1’de, kalibrasyon eğrisi Şekil 4.2’de, kalibrasyon eğrisi değerleri ise Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Dekstran standartların Ultrahydrogel 2000-250 kolonundan elüsyonunu gösteren kromatogram

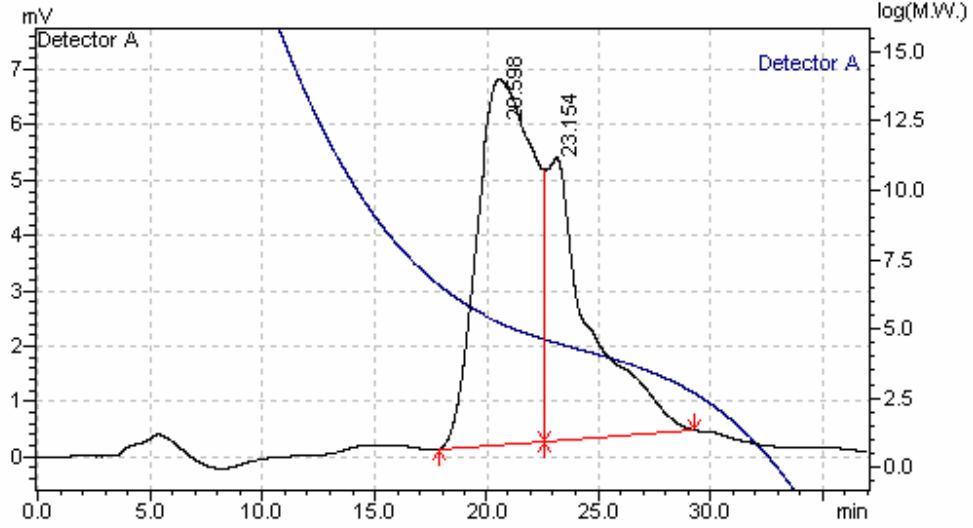


Şekil 4.2. Dekstran standartlarının GPC analizi sonucu oluşturulan kalibrasyon eğrisi

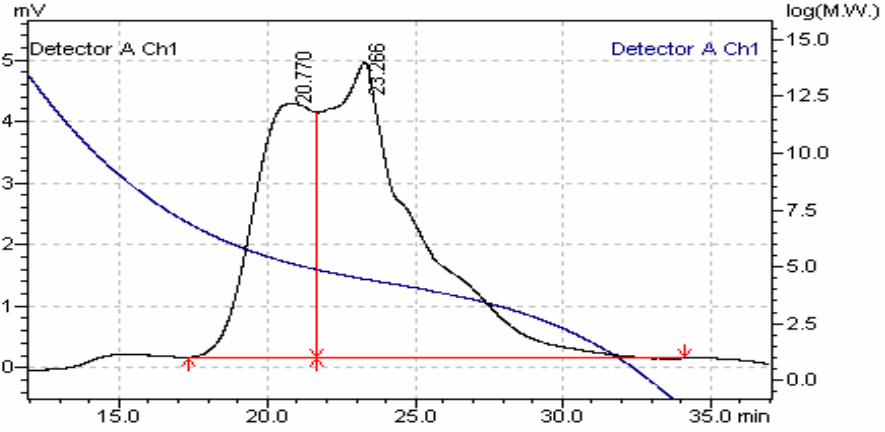
Çizelge 4.2. Kalibrasyon eğrisi değerleri

Standart No	Alıkonma zamanı (dk)	Ort.Moleküler Kütle, Mp (Da)
1	19,699	401000
2	19,921	277000
3	20,449	196000
4	20,980	124000
5	22,616	43500
6	23,674	21400
7	25,450	9900
8	26,676	4400

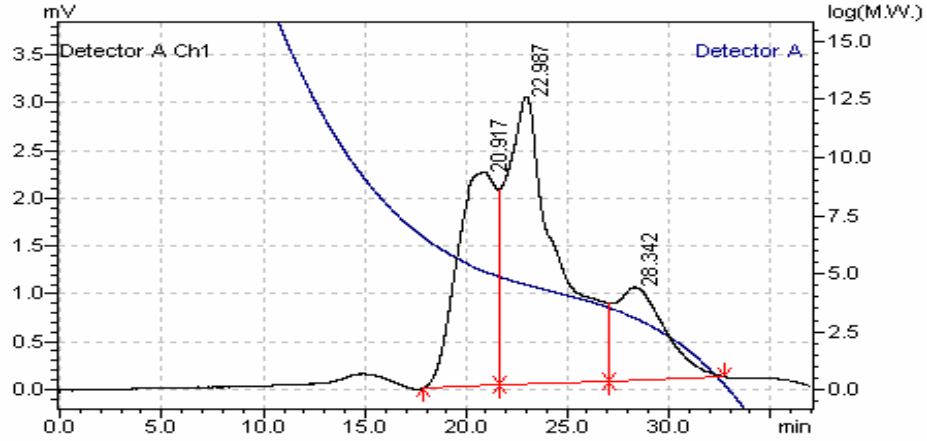
Bu çalışmada, CO₂ atmosferinde subkritik su ile ekstrakte edilen polisakkaritler ile atmosferik koşullarda sıcak su ile ekstrakte edilen polisakkaritlerin karakterizasyonu yapılarak özellikleri kıyaslanmıştır. 50, 100, 150°C sıcaklık ve 4060 psi sabit basınçta ve 100°C atmosfer basıncı altında ekstrakte edilen Shiitake mantarının GPC analiz kromatogramları sırasıyla Şekil 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6 'da gösterilmiştir. Farklı sıcaklıklarda subkritik su ile ekstrakte edilen polisakkaritlerin GPC sonuçlarına bakıldığında, ekstraksiyon sıcaklığının artmasıyla kromatogramlarda bir takım farklılıkların ortaya çıktığı görülmektedir (Şekil 4.3; 4.4 ve 4.5).



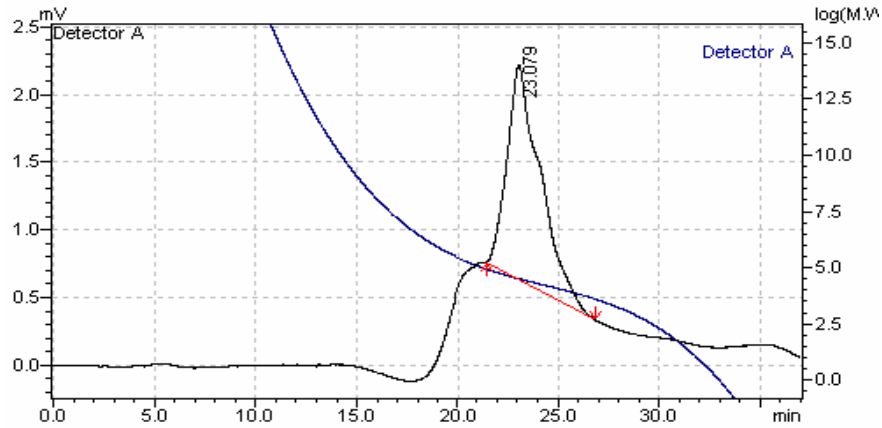
Şekil 4.3. *Lentinula edodes* mantarının 50±5°C sıcaklık ve 4025 psi basınçtaki ekstraksiyonu sonucu elde edilen polisakkarit ekstraktının GPC kromatogramı



Şekil 4.4. *Lentinula edodes* mantarının 100°C ±4 sıcaklık ve 4150 psi basınçtaki ekstraksiyonu sonucu elde edilen polisakkarit ekstraktının GPC kromatogramı



Şekil 4.5 *Lentinula edodes* mantarının 150°C $\pm$ 2 sıcaklık ve 4100 psi basınçtaki ekstraksiyonu sonucu elde edilen polisakkarit ekstraktının GPC kromatogramı



Şekil 4.6. *Lentinula edodes* mantarının 100°C sıcaklık ve 1 atm basınçtaki ekstraksiyonu sonucu elde edilen polisakkarit ekstraktının GPC kromatogramı

Polisakkarit moleküllerinin 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 belirleyecek, bu da mevcut proses koşullarında polisakkarit moleküllerinin alacakları yeni konformasyonları belirleyecektir (Kirschner ve Woods, 2001). Subkritik ekstraktların kromatogramlarında sıcaklık ve basıncın artmasıyla polisakkaritlerin daha fazla hidroliz olduğu ve moleköl kütlelerinin azaldığı dikkat çekmekte, daha büyük alıkonma zamanlarında yeni ve küçük

molekül kütleli polisakkaritlerin olduğu gözlenmektedir. Subkritik su ile farklı sıcaklıklarda ekstraksiyonlardan elde edilen ekstraktların GPC analiz verileri incelendiğinde, alıkonma zamanı sırasıyla 50°C'deki ekstraksiyon için 20,598 dk-23,154 dk. 100°C'deki ekstraksiyon için 20,771 dk-23,265 dk ve 150°C'deki ekstraksiyon için 20,904 dk-22,989 dk-28,337 dk olan farklı Mp değerlerine sahip polisakkaritlerin olduğu görülmektedir. Mp değerleri 50°C'deki ekstraksiyon için sırasıyla $1,665 \times 10^5$ Da- $3,084 \times 10^4$ Da, 100°C'deki ekstraksiyon için $1,447 \times 10^5$ Da- $2,903 \times 10^4$ Da ve 150°C'deki ekstraksiyon için $1,288 \times 10^5$ Da- $3,377 \times 10^4$ Da- $1,245 \times 10^3$ Da olarak hesaplanmıştır. Sıcak su ekstraktının kromatogramı incelendiğinde ise polisakkaritlerin çok fazla hidrolize uğramadığı ancak oluşan polisakkaritlerin molekül kütlelerinin subkritik polisakkaritlerinkinden daha küçük olduğu gözlenlenmiştir (Şekil 4.6). Sıcak su ekstraktında alıkonma zamanı 23,697 dk olan polisakkaritin Mp değeri ise $2,308 \times 10^4$ Da'dır. Çizelge 4.3'de Shiitake mantarının subkritik su ve atmosferik koşullardaki sıcak su ile ekstraksiyonu sonucu elde edilen polisakkaritlerinin Mp değerleri birlikte gösterilmiştir. Subkritik ekstraktlar kendi aralarında ortalama molekül kütleleri açısından kıyaslandığında, sıcaklığın artmasıyla polisakkaritlerin molekül kütlelerinin azaldığı ve daha küçük molekül kütleli yeni polisakkaritlerin olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.3. *Lentinula edodes* mantarı polisakkaritlerinin molekül kütlesi dağılımı(Mp)

Örnek Adı	Pik 1 (Da)	Pik 2 (Da)	Pik 3(Da)
100°C, atmosferik	$2,308 \times 10^4$	-	-
50°C, subkritik	$1,665 \times 10^5$	$3,084 \times 10^4$	
100°C, subkritik	$1,447 \times 10^5$	$2,903 \times 10^4$	-
150°C, subkritik	$1,288 \times 10^5$	$3,377 \times 10^4$	$1,245 \times 10^3$

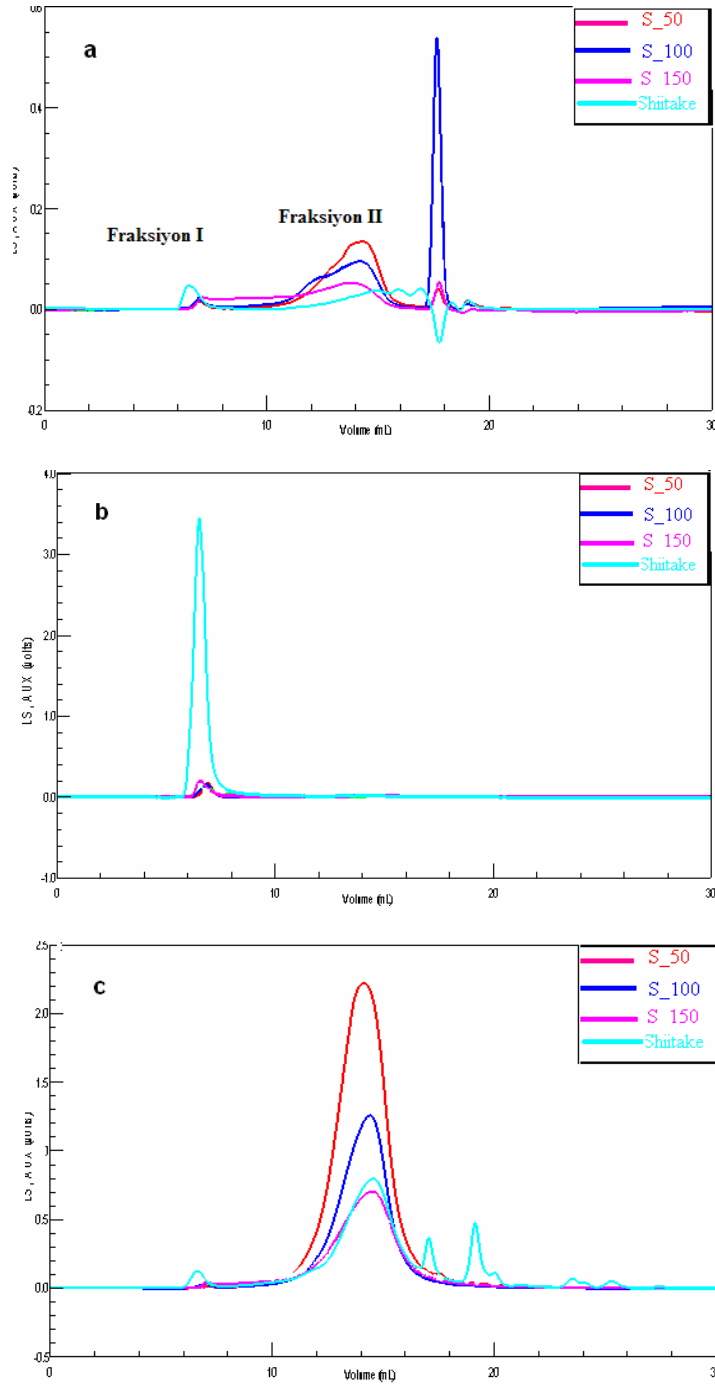
4.2. HPSEC- MALLS ANALİZLERİ

Boyut eleme kromatografisi ile yapılan analizler, MALLS (Multi Angle Light Scattering), RI (Refraktif İndeks) ve UV dedektörleri ile birleştirilmiş bir HPSEC (High Performance Size Exclusion) sistemi ile de analiz edilmiştir. Sıcak su ve subkritik su ile ekstrakte edilen *Lentinula edodes* polisakkaritlerinin HPSEC-MALLS analizlerine ait kromatogramlar Şekil 4.7’ de, bu analize ait kütlece ortalama molekül kütlesi(Mw) değerleri de Çizelge 4.4 de gösterilmektedir.

Çizelge 4.4. *Lentinula edodes* polisakkaritlerinin farklı ekstraksiyon koşullarındaki molekül kütle dağılımı(Mw)

Örnek adı	Mw (pik1) Da	Mw (pik2) Da
100°C, atmosferik	$1,333 \times 10^7$	$1,282 \times 10^6$
50°C, subkritik	$1,644 \times 10^6$	$4,118 \times 10^4$
100°C, subkritik	$1,114 \times 10^6$	$5,682 \times 10^4$
150°C, subkritik	$8,37 \times 10^5$	$3,374 \times 10^4$

Lentinula edodes mantarının HPSEC-MALLS analizlerinin kromatogramlarında çözünürlüğü farklı iki polisakkarit (Şekil 4.7.a) fraksiyonu gözlenmiştir. Bu mantarın α ve β olmak üzere iki çeşit glukan molekülüne sahip olduğu ve suda çözünmeyen kısmın α -(1,3)-D glukan, suda çözünenebilen fraksiyonun ise (1,6) dallanmış β -(1,3)-D glukan olduğu belirlenmiştir (Zhang, 2005). Çözünürlüğü farklı iki polisakkarit fraksiyonu, Fraksiyon I ve Fraksiyon II olarak adlandırılmıştır. Fraksiyon I olarak adlandırılan ve Şekil 4.7.a’daki kromatogramda 6. ile 8. dk arasında gözlenen pik, polisakkarit çözeltisi içerisinde çözünmeyen türleri (agregatları) göstermektedir. Bu pik α -D-glukanın çözünmeyen kısımları olabilir. Fraksiyon II piki 10-17 dk. arasında gözlenmektedir (Şekil 4.7.a). Sıcak su ekstraktının Fraksiyon I adı verilen pikinin Mw değeri $1,333 \times 10^7$ Da iken, aynı fraksiyonun 50, 100 ve 150°C’deki ekstraktlarının Mw değerleri sırasıyla $1,644 \times 10^6$, $1,114 \times 10^6$ ve $8,37 \times 10^5$ Da’dır. Bu fraksiyonun ortalama molekül kütlesi subkritik su ekstraktlarında, sıcaklığın artmasıyla düşüş göstermektedir.



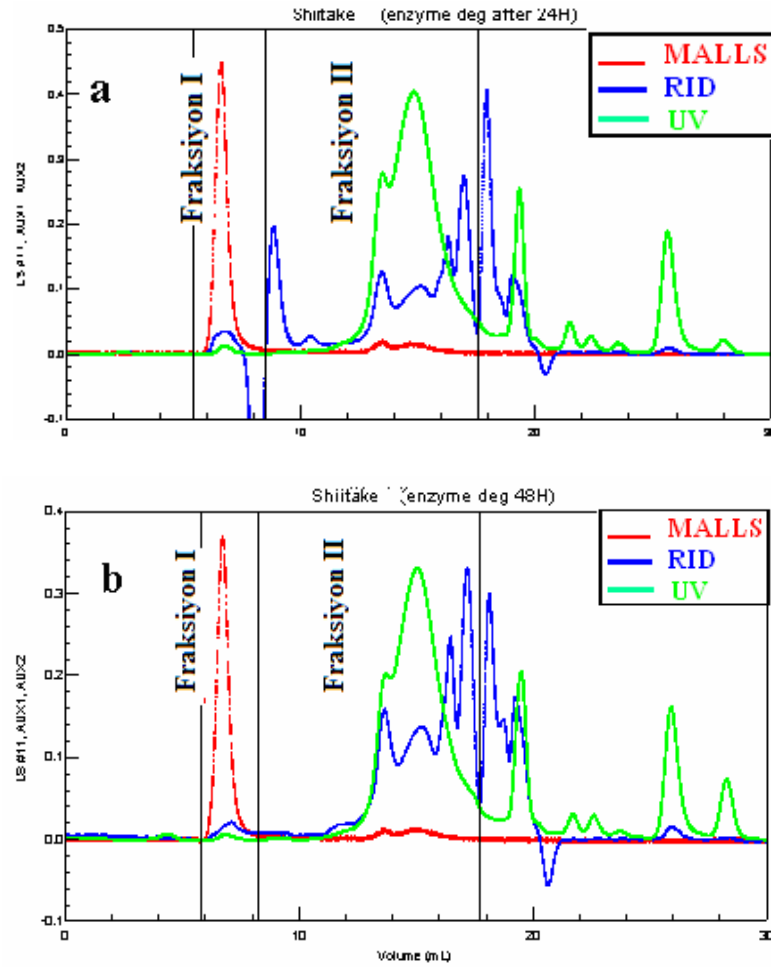
Şekil 4.7. Sıcak su, 50, 100 ve 150° C subkritik su ile ekstrakte edilmiş polisakkaritlerin HPSEC kromatogramları **a)** RI **b)** MALLS **c)** UV dedektör ölçümleri

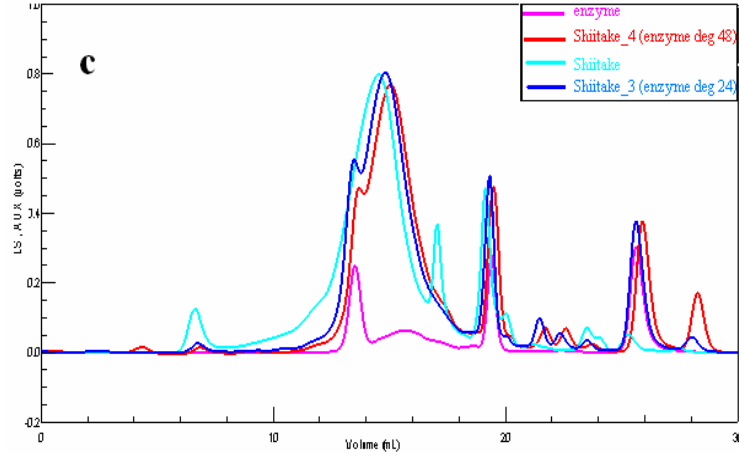
Moleküllerin MALLS kromatogramlarındaki pik yoğunluğu özellikle Fraksiyon I için, sıcaklığın giderek arttığı ekstraksiyon koşullarında önemli ölçüde azalmıştır (Şekil 4.7b). Bu olay yine ekstraktaki α -D-glukanın yapısal değişikliği ile ilişkilendirilebilir. Yani sıcaklığın ve basıncın artırılması ile çözünmeyen kısımların, çözündüğü söylenebilir. Fraksiyon II pikinin, farklı ekstraksiyon koşullarında, pik profili ve molekül kütlesi dağılımlarında değişiklikler gözlenmiştir (Şekil 4.7a). Sıcak su ve subkritik su ekstratlarının Mw değerleri karşılaştırıldığında, sıcak su ekstraktı için Fraksiyon II pikinin Mw değeri $1,282 \times 10^6$ Da iken, subkritik su ekstraktları 50, 100, 150°C için sırasıyla $4,118 \times 10^4$; $5,682 \times 10^4$; $3,374 \times 10^4$ Da'dur. Bu sonuçlardan ekstraksiyon koşullarının değişmesi ile (sıcaklığın artırılması) hidrolize uğrayan glukanların 3 boyutlu yapısında değişikliklerin meydana geldiği görülmektedir. Çizelge 4.4'de görüldüğü gibi, subkritik su ekstraktlarının sıcaklığının yükselmesiyle ortalama moleküler kütle değerlerinde azalmalar gözlenmiştir.

UV dedektörle 280 nm'de yapılan HPSEC analizleri ve Lowry protein metodu polisakkarit ekstraktlarının farklı miktarlarda protein içerdiğini göstermektedir. Bu proteinler polisakkarit yapısı içinde bulunduğundan glukoprotein olarak adlandırılabilir. Şekil 4.7c'de HPSEC-UV analizlerinden görüldüğü gibi artan sıcaklıkla birlikte protein miktarında azalma gözlenmektedir. Proteinlerin denaturasyonunda ve yapıdan uzaklaştırılmasında sıcaklık temel faktör iken, basıncın da etkisinin önemli olduğu görülmektedir. Ekstraksiyon sıcaklığının artmasıyla birlikte yapıdaki proteinlerinin miktarlarında düşüş gözlenmektedir. Şekil 4.7c'deki pik profillerine göre, ekstraktların protein içeriğinin miktarı 50°C, subkritik su>100°C, subkritik su>sıcak su>150°C, subkritik su şeklinde azalmaktadır.

Hem karbohidratların hem de protein kalıntılarının gerçek molekül ağırlıklarını belirlemek için, sıcak su ekstraktı 'Protease' enzimi ile 24 ve 48 saat boyunca muamele edilmiş ve daha sonra inkübe edilmiş örnekler HPSEC sistemine enjekte edilmiştir. MALLS, RID ve UV dedektörlerinin birlikte kullanımıyla yapılan analiz sonuçlarına göre (Şekil 4.8a ve b) Fraksiyon I'de bazı yapısal veya konformasyonel değişiklikler gözlenirken, Fraksiyon II'de hiçbir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.8a ve b).

Fraksiyon II'nin glukan-protein kompleksi (mantar bileşenlerinden LEM'de bulunan kısım) olabileceği (Lo ve ark., 2007) ve işlem sonucunda protein-karbohidrat bağının kırılmadığı söylenebilir. Ya da glukan-protein bağı kırılmış olup protein veya amino asit kalıntıları, molekülün üç boyutlu yapısından çıkamamaktadır.





Şekil 4.8. İşlem görmemiş Shiitake mantarı ile enzim kör çözeltisinin protease enzimi ile 24 ve 48 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen HPSEC kromatogramları **a)** MALLS-RID-UV dedektör cevabı (24 saat) **b)** MALLS-RID-UV dedektör cevabı (48 saat) **c)** UV dedektör cevabı. Pembe renkli kromatogram: enzim kör çözeltisi, kırmızı renkli kromatogram: 24 saat enzimle muamele edilmiş sıcak su ekstraktı, mavi renkli kromatogram: İşlem görmemiş sıcak su ekstraktı, koyu mavi renkli kromatogram: 48 saat enzimle muamele edilmiş sıcak su ekstraktı.

Sonuç olarak Şekil 4.8c'deki sadece UV dedektör kullanılarak yapılan analizin kromatogramından anlaşıldığı gibi, enzimle parçalanma sonucunda örneğin toplam protein içeriği değişmemektedir.

MALLS, RI ve UV sinyallerine bağlı metodlar, proteinin bileşiminin molekül kütlesi ile bileşim derecelerini belirler (Kendrick ve ark., 2001). MALLS ile ek açılardaki saçılmalar ölçülerek MDa aralığındaki kütlelerin direkt mükemmel ölçümleri yapılabilir ve r.m.s (geometrik boyutun bir ölçüsü) yarıçapı da belirlenebilir. Bu sistemde dedektörlerin üçü aynı zamanda kullanılmak zorunda değildir. Örneğin, protein karbohidrat içermiyorsa, moleküler kütlelerini belirlemede çok açılı lazer ışık saçılım ve refraktif indeks dedektörlerinin kullanımı yeterlidir. Ancak, protein karbohidrat içeriyorsa, polipeptidin moleküler kütlelerini ve stokiyometrisini belirlemek için üç dedektörün de kullanılması gerekir (Wen ve ark. 1996). Geleneksel GPC metodlarının aksine, ışık saçılımında elde edilen bu moleküler kütleler elüsyon hacminden

bağımsızdır. Ayrıca, molekül kütlesi hesaplamada standartlara, kolon kalibrasyonu, molekül konformasyonu gibi etkenlere bağlı değildir.

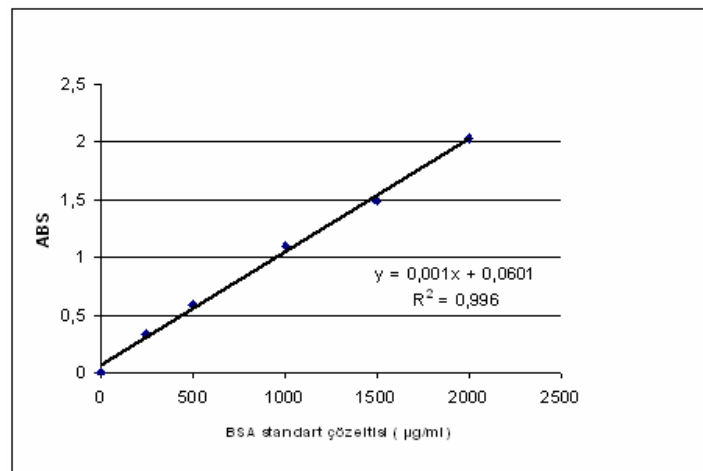
4.3 Polisakkarit Ekstraktlarının Bileşimi

Shiitake mantarının sıcak su ile ekstrakte edilen polisakkaritlerinin kimyasal bileşimleri Çizelge 4.5’ de gösterilmiştir.

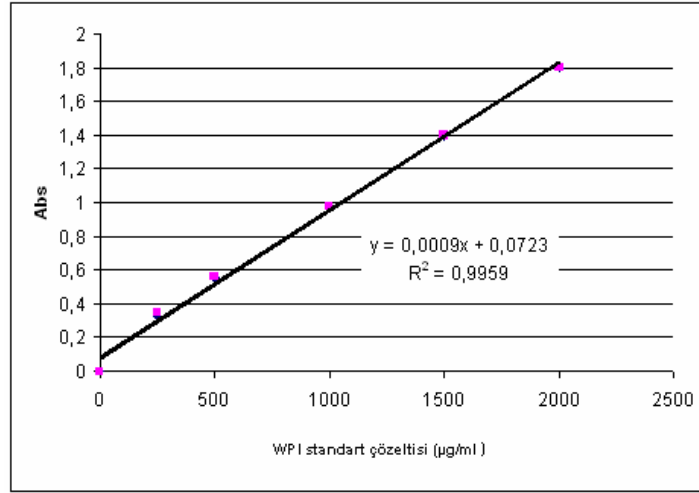
Çizelge 4.5. *Lentinula edodes* mantarının temel bileşenleri

Toplam protein miktarı (%)		Toplam kütledeki şeker içeriği			
BSA	WPI	%Glukoz	%Mannoz	%Üronik Asit	%Toplam
6,49	7,24	82,11	8,18	8,99	99,29

Kaba polisakkarit ekstraktlarının % toplam protein miktarı, Lowry protein metodu ile belirlenmiştir. Bunun için, farklı derişimlerde hazırlanan BSA ve WPI standartlarının 595 nm dalga boyunda spektrofotometrik UV ölçümleri alınmış ve derişime karşı absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). Bu kalibrasyon eğrileri kullanılarak sıcak su ekstraktı için hesaplanan protein miktarı yüzdesi BSA ile %6,49; WPI ile %7,24 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.9. BSA standartına ait kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.10. WPI standartına ait kalibrasyon eğrisi

Shiitake mantarının sıcak su ile ekstrakte edilen polisakkaritlerindeki şeker içeriğini tespit edebilmek için farklı derişimlerde glukoz, galaktoz, mannoz, ramnoz, arabinoz, ksiloz, fruktoz standartları kullanılmıştır. Bu standartlar ve örnek Varian HPLC sisteminde analiz edilerek hem polisakkaritin yapısında bulunan basit şekerler (monosakkaritler) hem de bu şekerlerin miktarları belirlenmiştir. Kantitatif HPLC analiz sonuçlarına göre, toplam kaba polisakkarit kütlesindeki % D-glukoz, mannoz içeriği sırasıyla %82,11 ve %8,18 dir. Polisakkarit ekstraktının nötral şeker bileşimi, temel olarak D-glukoz ve eser miktarda mannozdan oluşmaktadır. Monosakkarit analizlerinde galaktoz veya başka bir monosakkarite rastlanmamıştır. Ekstraktın üronik asit içeriği kolon elüsyonu ve titrimetrik nötralizasyon ile kuru bazda %8,9 olarak belirlenmiştir(Çizelge 4.5).

Ekstraktların çözünürlük testleri, atmosferik basınçtaki 100°C sıcak su ekstraktının nötral ve alkali çözeltilerde sırasıyla 26,60% ve 8,46% oranında çözünmeyen kalıntı bıraktığını, başka bir deyişle bu ekstraktın nötral ve alkali çözeltilerde sırasıyla %73,40 ve %91,54 oranında çözüldüğünü göstermiştir. Bunun yanında bütün subkritik ekstraktların nötral ve alkali ortamda tamamen çözüldüğü

belirlenmiştir. %0,5'lik sulu çözeltide bütün ekstraktların pH'sı nötral ve nötrale yakındır. Shiitake polisakkaritlerinin nem içerikleri, atmosferik koşullarda sıcak su ile ekstrakte edilen için %4,96 iken 50, 100 ve 150°C'de subkritik su ile ekstrakte edilenler için sırasıyla %4,2, % 4,11 ve %3,99 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.6). Buna göre, ekstraksiyon koşullarının değişmesi (sıcaklık ve basıncın artması) polisakkaritlerin nem içeriğini düşürmüştür.

Çizelge 4.6. *Lentinula edodes* mantarının farklı ekstraksiyon koşullarındaki fiziksel özellikleri(bakınız: Ek A, Hesaplamalar)

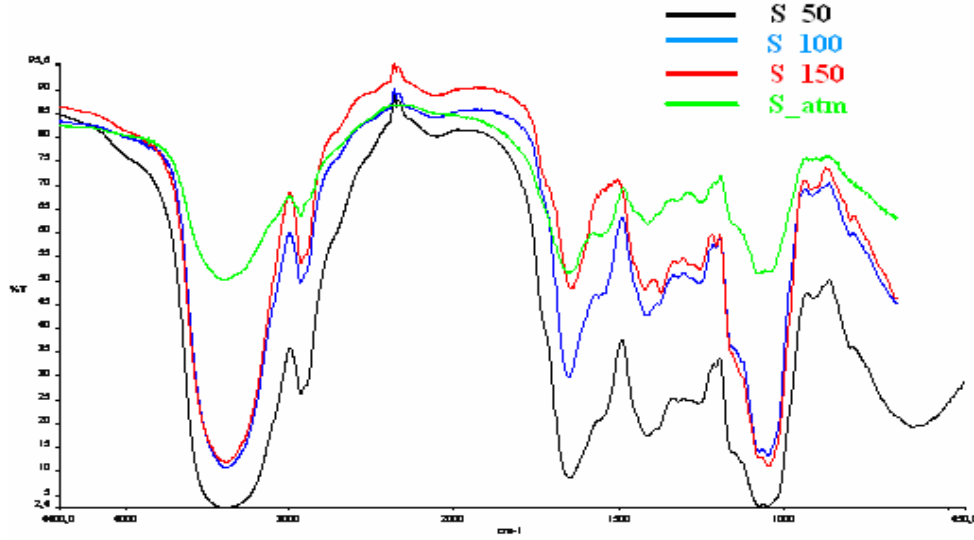
Örnek adı	% Nem	pH	Çözünürlük	
			JECFA1	JECFA2
100°C, atm	4,96	7,14	8,46	26,60
50°C, subkritik	4,2	7,01	0,09	0,49
100°C, subkritik	4,11	6,79	0,08	0,48
150°C, subkritik	3,99	6,67	0,08	0,46

JECFA: Joint FAO (Food and Agricultural Organisation)/WHO (World Health Organisation) Experts Committee on Foods Additives. **JECFA1:** Bazik çözeltideki % çözünmeyen örnek miktarının belirlenmesinde kullanılan metot.**JECFA2:** Nötral çözeltideki % çözünmeyen örnek miktarının belirlenmesinde kullanılan metot

4.4. Infrared (FT-IR) Sonuçları

Lentinula edodes mantarının yapısındaki bileşenleri belirlemek için sıcak su ve subkritik su ile ekstrakte edilen polisakkaritlerin üst üste çakıştırılmış infrared spektrumları Şekil 4.11'de gösterilmiştir (bakınız: Ek B, her bir türün infrared spektrumları). Infrared spektrumları incelendiğinde, ekstraksiyon sıcaklığının artmasıyla birlikte bazı pik şekillerinde farklılıkların ortaya çıktığı gözlenebilir. Yapıda hangi fonksiyonel grupların mevcut olduğunu gösteren 3600–1200 cm⁻¹'e kadar olan grup frekansları bölgesinde 3200 ile 3400 cm⁻¹ arasındaki geniş ve yayvan pik yapıdaki O-H'lara, 2800-3000 cm⁻¹ aralığında gözlenen absorpsiyon bandının C-H'a, 1600-1680 cm⁻¹ aralığında gözlenen şiddetli band da, yapıdaki C=O gerilimlerinden kaynaklandığı gözlenmektedir. Karbonil grubuna ait gerilme piki sıcaklığın artmasıyla daha da keskin hale gelmiştir. Shiitake polisakkarit ekstraktlarının infrared spektrumlarında parmak izi

bölgesi ($1200-600\text{ cm}^{-1}$) $1080-1000\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki bölgelerde C-O-C asimetrik ve C-O gerilimleri vardır. Daha önceki çalışmalarda, polisakkaritlerde mevcut olan bazı basit şekerlerin (monosakkaritler) infrared bölgedeki absorpsiyon bandları belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, 920 ve 800 cm^{-1} 'deki bandların mannozu (Peng ve ark., 2005), 920 ve 850 cm^{-1} 'de gözlenen absorpsiyon bandının α -D-glukanı (Bao ve ark., 2001) ve 910 cm^{-1} 'deki bandının ise β -D-glukanı karakterize ettiği belirtilmiştir (Kim ve ark., 2003). Buna göre $908-910\text{ cm}^{-1}$ aralığında gözlenen karakteristik absorpsiyon bandı β -D glikozidik bağlanmayı, 920 ve 850 cm^{-1} 'de gözlenen absorpsiyon bandı ise α -D-glukanı gösterir. FT-IR spektrumlarında özellikle de S_50 ve S_150 spektrumlarındaki 910 cm^{-1} ve S_100 spektrumundaki $908,49\text{ cm}^{-1}$ gözlenen karakteristik absorpsiyon bandının (C-O-C gerilmesi) β -D glikozidik bağlanmayı gösterdiği söylenebilir. Ayrıca S_50, S_100 ve S_150 spektrumlarında $796,08\text{ cm}^{-1}$ de gözlenen karakteristik pikinin de mannoz'a ait olduğu söylenebilir. Sıcak su ekstraktının infrared spektrumuna bakıldığında, polisakkaritlerin hidroliz olmadığı, subkritik polisakkarit ekstraktlarının infrared spektrumlarında kolayca gözlenebilen β -D glikozidik bağlanmalara ait band ve 800 cm^{-1} civarında gözlenen mannoz'a ait absorpsiyon bandları gözlenememektedir. Bu sonuçlara göre, *Lentinula edodes* mantarının polisakkaritlerini oluşturan temel monosakkaritlerin β -D glukoz ve mannoz olduğu infrared sonuçlarından da anlaşılmaktadır.



Şekil 4.11 Shiitake mantarından sıcak su ve 50, 100 ve 150°C’de subkritik su ile ekstrakte edilen polisakkaritlerin FT-IR spektrumları. S_atm/yeşil spektrum: Atmosferik sıcak su; S_50/siyah spektrum: Subkritik 50°C; S_100/mavi spektrum: Subkritik 100°C; S_150/kırmızı spektrum: Subkritik 150°C.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1) *Lentinula edodes* mantarı hem sıcak su hem de subkritik su ve CO₂ atmosferi altında ekstrakte edilmiştir. Moleküler kütle dağılımları, kimyasal bileşimleri ve polisakkarit ekstraktlarının bazı fiziksel özellikleri belirlenmiştir. *Lentinula edodes* mantarının subkritik su ekstraktlarının çözünürlüğü yüksek sıcaklık ve basınçta artarken, sıcak su ekstraktının çözünürlüğünün az olduğu gözlenmiştir. Sıcaklığın yükselmesi ve basıncın yanı sıra, ortama karbondioksit gazının ilavesi de polisakkaritlerin hidrolizini arttırdığı gözlenmiştir.

2) Polisakkarit ekstraktlarının moleküler kütle dağılımlarının belirlenmesinde standart GPC ve de MALLS, RID ve UV gibi üç dedektörün bir arada bulunduğu HPSEC-MALLS sistemleri kullanılmıştır. GPC metodunda farklı moleküler kütleye sahip Dekstran standartlarına göre bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur ve buna göre polisakkaritlerin ortalama moleküler kütleleri (Mp) hesaplatılmıştır fakat HPSEC-MALLS sisteminde polimer standartlarına gerek kalmadan polisakkaritlerin ortalama moleküler kütleleri (Mw) hesaplatılmıştır. Ayrıca HPSEC-MALLS sistemleri ile kompleks ya da proteinlerin molekül yapıları veya konformasyonları belirlenebilmektedir. GPC analiz sonuçları, Shiitake mantarı polisakkarit ekstraktlarının sıcaklığın artışıyla daha fazla hidrolize uğrayarak daha düşük molekül kütlelerinde polisakkaritlerin oluştuğunu göstermiştir. HPSEC-MALLS analizinin sonuçlarına göre çözünürlüğü farklı iki polisakkarit fraksiyonu gözlenmiştir. Çözünürlüğü farklı iki polisakkarit fraksiyonu, Fraksiyon I ve Fraksiyon II olarak adlandırılmıştır. Fraksiyon I olarak adlandırılan pik, polisakkarit çözeltisi içerisinde çözünmeyen türler (agregatlar), Fraksiyon II pikinin ise glukoprotein olduğu söylenebilir. Subkritik su ekstraktlarının HPSEC-MALLS kromatogramları incelendiğinde ekstraksiyon koşullarının artmasıyla birlikte, sıcak su ekstraktındaki çözünmeyen türlerin miktarlarının azaldığı gözlenmiştir.

3) *Lentinula edodes* mantar polisakkaritlerinin protein içerdiği hem 280 nm’de alınan UV sinyali hem de Lowry protein metodu ile kanıtlanmıştır. Ekstraksiyon sıcaklığının artmasıyla birlikte yapıdaki proteinlerinin miktarlarında düşüş gözlenmiştir Proteinlerin denaturasyonunda ve yapıdan uzaklaştırılmasında sıcaklık

temel faktör iken, basıncın da etkisi fazladır. Protein içeriği de 50°C (SWE)>100°C (SWE) >sıcak su ekstraktı>150°C (SWE) olacak şekilde azalmıştır.

4) Hem karbohidratların hem de protein kalıntısının gerçek moleküler ağırlıklarını belirlemek için, sıcak su ekstraktı ‘Protease’ enzimi ile 24 ve 48 saat boyunca muamele edilmiştir. LS, RID ve UV dedektörlerinin kullanımıyla yapılan analiz sonuçlarına göre Fraksiyon I’de bazı yapısal veya konformasyonel değişimler gözlenirken, Fraksiyon II’de hiçbir değişikliğin meydana gelmediği gözlenmiştir. Sonuç olarak sadece UV dedektör kullanılarak yapılan analizin kromatogramından anlaşıldığı gibi, enzimle parçalanma sonucunda örneğin toplam protein içeriği değişmemektedir. Enzimle parçalama deneylerinde protein-glukan bandını kırmak için ‘Protease’ enzimi dışında başka bir enzim kullanılabilir.

5) Polisakkarit ekstraktlarını kimyasal bileşimi açısından karakterize etmek için FT-IR spektroskopisi kullanılmıştır. Ekstraksiyon sıcaklığının artmasıyla birlikte bazı pik şekillerinde farklılıkların ortaya çıktığı görülmektedir. FT-IR spektrumlarında özellikle de S_50 ve S_150 spektrumlarındaki 910 cm^{-1} ve S_100 spektrumundaki $908,49\text{ cm}^{-1}$ gözlenen karakteristik absorpsiyon bandının(C-O-C) β -D glikozidik bağlanmayı gösterdiği söylenebilir. Ayrıca S_50, S_100 ve S_150 spektrumlarında $796,08\text{ cm}^{-1}$ de gözlenen karakteristik pikin de mannoz’a ait olduğu söylenebilir. Sıcak su ekstraktının infrared spektrumuna bakıldığında, polisakkaritlerin hidroliz olmadığı, subkritik polisakkarit ekstraktlarının infrared spektrumlarında kolayca gözlenebilen β -D glikozidik bağlanmalara ait band ve 800 cm^{-1} civarında gözlenen mannoz’a ait absorpsiyon bandları gözlenenememektedir. Bu sonuçlara göre, *Lentinula edodes* mantarının polisakkaritlerini oluşturan temel monosakkaritlerin β -D glukoz ve mannoz olduğu infrared sonuçlarından da anlaşılmaktadır.

6) Polisakkarit ekstraktının nötral şeker bileşimi, temel olarak D-glukoz (kaba polisakkarit kütlesinde %82,11’lik kısım) ve eser miktarda mannozdaki (kaba polisakkarit kütlesinde %8,18’lik kısım) oluşmaktadır. Bütün polisakkarit ekstraktları için yapılan fiziksel analiz sonuçlarından anlaşılabileceği gibi, tüm polisakkarit ekstraktlarının nötrale yakın bir pH’da olduğu, subkritik koşullarda ekstrakte edilen polisakkaritlerin sıcak su ile ekstrakte edilene göre daha düşük nem içeriğine sahip olduğu ve subkritik su ekstraktlarının hem alkali hem de nötral ortamda tamamen

çözündüklerini, sıcak su ekstraktının ise her iki ortamdaki çözünübilirliğinin subkritik koşullara göre daha az olduğu gözlenmiştir.

7) *Lentinula edodes* mantarı ekstraktlarının özellikle de polisakkarit kısımlarının anti tümör, antimikrobiyal özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Buna bağlı olarak da antitümör ve antimikrobiyal testler de yapılabilir.

Kaynaklar

- ADASKAVEG, J. E., GILBERTSON, R. L., 1986. Mycologia. 78, 694-705.
- 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.
- AĞAOĞLU, Y.S., ILBAY, M.E., 1991. Doğal ve Kültür Alınabilir Mantar Türleri: III. Shiitake Yetiştiriciliği. Ankara.
- AKAMUTSU, S., WATANABE, A., TAMESADA, M., NAKAMURA, R., KODAMA, D., KAWASE, M., YAGI, K., 2004. Hepatoprotective effect of extracts from *Lentinus edodes* mycelia on dimethylnitrosamine-induced liver injury. Biological & Pharmaceutical Bulletin 27 (12):1957-1960.
- ALMOND, A., 2005. Towards understanding the interaction between oligosaccharides and water molecule, Carbohydrate Research, 340, 907-920.
- AMAGASSE, H., 1987. Treatment of hepatitis B patients with *Lentinus edodes* mycelia. In: New Trends in Peptic Ulcer and Chronic Hepatitis. Part II Chronic Hepatitis, Princeton: Excerpta Medica, 316–21.
- AOYAMA, A., 1998. Shiitake Mushrooms: Cultivated by Wood Fibre-Chips.
- ARISAWA, M., FUJITA, A., HAYASHI, T., SHIMIZU, M., MORITA, N., 1988. Three new lanostanoids from *Ganoderma lucidum*. Journal Natural Products, 51, 54-59.
- BAO, X.F., FANG, J., LI, X., 2001. Structural characterization and immunomodulating activity of a complex glucan from spores of *Ganoderma lucidum*. Bioscience Biotechnology Biochemistry, 65 (11), 2384-2391.
- BAO, X. F., LIU, C., FANG, J., LI, X., 2001. Structural and immunological studies of a major polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum*. Carbohydrate Research, 332, 67-74.

- BARBERO, G. F., PALMA, M., BARROSO, C. G., 2006. Pressurized liquid extraction of capsaicinoids from peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3231-3236.
- BENKSY, D., GAMBLE, A., 1993 *Chinese Herbal Medicine: Materia Medica*. Seattle, WA: Eastland Press.
- BOBLETER, O., 1994. Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Progress in Polymer Science*, 19, 797-841.
- BOHN, J. A., BEMILLER, J. N., 1995. 1 → 3)-β-D Glucan as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymer*, 28, 3-14.
- BONN, G., CONCIN, R., BOBLETER, O. 1983. *Wood Science and Technology*, 17, 195-202.
- BREENE, W. M., 1989. *Nutritional and Medicinal Value of Exotic Mushrooms, Shiitake Mushrooms*.
- BREEN, C., CROWE, A., ROELFSEMA, H. J., 2003. High-dose riboflavin for prophylaxis of migraine. *Can Fam Physician*, 49, 1291-1293.
- CHANG, R., 1996. Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition Reviews*, 54, 591-593.
- CHEN R. Y., YU D. Q., 1990. *Yauxue Xueba*. 25, 611-619.
- CHEUNG H.Y., NG C.W., HOOD D. J., 2001. Identification and quantification of base and nucleoside markers in extracts of *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma japonicum* and ganoderma capsules by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography*, 911, 119-126.
- CHEUNG, L. M., CHEUNG, P. C. K., OOI, V. E.C., 2003. Antioxidant activity and total fenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*, 81, 249-255.
- CHIHARA, G., MAEDA, Y., HAMURO, J., SASAKI, T., FUKUOKA, F., 1969. Inhibition of mouse Sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes*, *Nature* 222, 687-688.

- CHIHARA, G., HAMURO, J., MAEDA, Y., ARAI, Y., FUKUOKA, F., 1970. Fractionation and Purification of the polysaccharides with marked antitumor activity especially Lentinan, from *Lentinus edodes*, an edible mushroom Cancer Research, 30, 2776–81.
- CHIHARA, G., MAEDA, Y. Y., SUGA, T., HAMURO, J., (1989). Lentinan as a Host Defense Potentiator. International Journal of Immunotherapy, 4, 145-154.
- CHIHATA, L., OKUMURA, K., TABAYAMA, S., KOTERA, K. 1969. Lentinacia: anew hypocholesterolemic substance in *Lentinus edodes*. Specialist Experientia, 25, 1237-1238.
- CHOI, Y., LEE, S. M., CHUN, J., LEE, H. B., LEE J., 2006. Influence of heat treatment on the antioxidant Activities and polyphenolic compounds of Shiitake mushroom. Food Chemistry, 99, 381-387.
- 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.
- CIUCANO, I., 1984. A simple and method for the permethylation of carbohydrates, Carbohydrate Research, 131, 209-217.
- DE LUCA, H. F., ZIEROLD, C., 1998. Mechanisms and Functions of Vitamin D, Nutrition Rev, 56, 4-10.
- 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.
- DIKEMAN C. L., BAUER L. L., FLICKINGER, E. A., FAHEY, G. C., 2005. Effects of stage of maturity and cooking on the chemical composition of select mushroom varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(4), 1130-1138.
- 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.
- ENMAN, J., ROVA, U., BERGLUND, K. A., 2007. Quantification of the bioactive compound eritadenine in selected strains of Shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1177-1180.
- FENICHEL, R.L., CHIRIGOS, M.A., 1984. Immune modulation agents, Marcel Dekker, New York, 409–439.
- FRANZ, G., 1989. Polysaccharides in pharmacy. Current Applications and future concepts. *Planta Medicine*, 55, 493-497.
- FREUNHAUF, J. P., BONNARD, G. D., HEBERMAN, R. B., 1982. The effect of lentinan on production on interleukin-1 by human monocytes. *Immunopharmacology*, 5, 65-74.
- GILBERTSON, R., RYVARDEN, L., 1986. North American Polypores Vol I &II. Fungi Flora, Oslo, Norway.
- GLASSER, L., 2004, Water, water, everywhere, *J. Chem. Educ.*, 81, 414-418.
- HAMURO, J., CHIHARA, G., 1984. Lentinan, a T-cell oriented immunopotentiator: its experimental and clinical application, and possible mechanism of modulation.
- HSEU, R. S., WANG, H. H., WANG, H. F., MONEALVO, J. M., 1996, *Applied and Environmental Microbiology*, 62(4), 1354-1363.
- IKEKAWA T, UEHARA N, MAEDA Y. NANKINISHI M, FUKUOKA F. 1969. Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms. *Cancer Research*, 29, 734–5.
- IKEKAWA, T., 2001. Beneficial effects of edible and medicinal mushrooms on Health Care. *International Journal Medicine Mushroom*, 291-298.
- JIANG, S. M., XIAO, Z. M., XU, Z. H., 1999. Inhibitory activity of polysaccharide extracts from three kinds of edible fungi on proliferation of human hepatoma SCMM-7721 cell and mouse implanted S180 tumor. *World Journal of Gastroenterology* 5(5), 404–407.

- JONES, K., 1991. Shiitake the Healing Mushroom. Healing Arts Press. USA.
- JONG, S. C., BIRMINGHAM, J. M., 1992. Medicinal benefits of Shiitake mushrooms. *Advanced Application Microbial*, 37, 101-134.
- KANEDA, T., TOKUDA, S., 1966. Effect of various mushroom preparations on cholesterol levels in rats. *Journal Nutrition*, 90, 371.
- KENDRICK, B. S., KERWIN, B. A., CHANG, B. S., JOHN S. P., 2001. *Analytical Biochemistry*, 299, 136–146.
- KIKUCHI, T., KANOMI, S., MURAI, Y., KATODA, S., TSUBONO, K., OGITA, Z. I., 1986. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 34, 4018.
- KIM, H. W., KIM, B. K., 1999. Biomedicinal triterpenoids of *Ganoderma lucidum*. *International Journal Medicine Mushrooms*, 1, 121-138.
- KIM, D. H., SHIM, S. B., KIM, N. J., JANG, I. S., 1999. Beta-glucuronidase-inhibitory activity and hepatoprotective effect of *Ganoderma lucidum*. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 22, 162-164.
- KIM, G. Y., PARK, H. S., NAM, B. H., LEE, S. J., LEE, J. D., 2003. Purification and characterization of acidic proteo- heteroglycan from the fruiting body of *Phellinus linteus*. *Bioresource Technology*, 89 (1), 81-87.
- KIM, H. S., KACEW, B. M. L., 1999. In vitro chemopreventive effects of plant polysaccharides (*Aloe barbadensis* Miller, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum* and *Coriolus versicolor*). *Carcinogenesis*, 8, 1637-1640.
- KIM, K. C., KIM, I. G., 1999. *Ganoderma lucidum* extract protects DNA from strand breakage caused by hydroxyl radical and UV irradiation, *International Journal of Molecular Medicine*, 4, 273-277.
- KIM, M. J., KIM Y. S., 1986. Studies on safety of *Ganoderma lucidum*. *Korean Journal of Mycology*, 14 (1), 49-60.
- KIRSCHER, K.N., WOODS, R.J., 2001. Solvent interactions determine carbohydrate conformation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the, USA*, 98, 10541-10545.

- KITZBERGER, C. S. G., SMANIA, A. JR., PEDROSE R. C., FERREIRA, S. R. S., 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of Shiitake extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. *Journal of Food Engineering*.
- 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.
- KOHDA, H., TOKUMOTO, W., SAKAMOTO, K., 1985. New triterpenoids from *Ganoderma lucidum*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 33, 1367-1374.
- KOMODA, Y., SHIMIZU, M., SONODA, Y., SATO, Y., 1989. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 37, 531.
- LADANYI, A., TIMAR, J., LAPIS, K., 1993. Effect of lentinan on macrophage cytotoxicity against metastatic tumor cells. *Cancer Immunological Immunotherapy*, 36, 123-126.
- LELIK, L., VITANYI, G., LEFLER, J., HEGOCZKY, J., NAGY, G. M., VERECZKEY G., 1997. Production of the mycelium of Shiitake mushroom and investigation of its bioactive compounds. *Acta Alimentaria*, 26(3), 271-277.
- LIEU, C. W., LEE, S. S., WANG, S. Y., 1992. The effect of *Ganoderma lucidum* on induction of differentiation in leukemic U937 cells. *Anticancer Research*, 12, 1211-1216.
- LIN, L. J., LEE, K.R., SHIAO, M. S., 1989. ¹³CNMR Correlation of Stereochemistry in Lanostanoid Triterpenes. *Journal of Natural Products*, 52, 595
- LIN, Z. B., 2002. *Ganoderma: Genetics, Chemistry, Pharmacology and Therapeutics*; Beijing Medical University Press, Beijing.
- LO, T. C. T., TSAO, H. H., WANG, A. Y., CHANG, C. A., 2007. Pressurized water extraction of polysaccharides as secondary metabolites from *Lentinula edodes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4196-4201.
- LIU, J. F., PENG, J. F., CHI, Y. G., JIANG, G. B., 2005. Determination of formaldehyde in Shiitake mushroom by ionic liquid-based liquid-phase microextraction coupled with liquid chromatography. *Talanta* 65 (3), 705-709.

- LOU, S. N., MONTAG, A., 1994. A method to determine nucleocompounds from mushrooms. *Deutsche Lebensmittel- Rundschau* 90 (7), 212-217.
- LOULI, V., FOLAS, G., VOUSAS, E., MAGOULAS, K., 2004. Extraction of parsley seed oil by supercritical CO₂. *The Journal of Supercritical Fluids*, 30, 163-174.
- MAEDA, Y.Y., CHIHARA, G., 1973. The effects of neonatal thymectomy on the antitumor activity of lentinan, carboxymethyl pachymaran and zymosan and their effects on various immune responses. *International Journal of Cancer* 11, 153-161.
- MANZI, P., GUZZI, A., PIZZOFERRATO, L., 2001. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chemistry*, 73, 321-325.
- MCCONVILLE, M. J., HOMANS, S. W., THOMAS-OATES, J. E., DELL A., BACIC A., 1990. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 7385-7394.
- MCCONVILLE, M. J., BACIC A., 1989. *Journal of Biological Chemistry*, 264 757-766.
- MIZUNO, T., 1995. Healthfoods and medicinal usages of mushrooms. *Food Revidence International*, 11,69-81.
- 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.
- MIYAZAKI, T., NISHIJIMA, M., 1981. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 29, 3611.
- MIYAZAWA, T., FUNAZUKURI, T., 2005. Polysaccharide hydrolysis accelerated by adding carbon dioxide under hydrothermal conditions. *Biotechnology Progress*, 21, 1782–1785.
- MIZUNO, T., 1991. Antitumor active substances of mushroom fungi, based science and latent technology on mushroom, 121-135.

- MIZUNO, T. 1996. Reishi Mushroom in Recent Development of Physiologically Functional Food, CMC Co. Ltd. Tokyo, 319-330.
- MOK, W. S. L., ANTAL, M. J., VARHEGYI, G., 1992. Productive and parasitic pathways in dilute acid hydrolysis of cellulose. Industrial & Engineering Chemistry Research., 31, 94-100.
- MONEALVO, 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
- MONEALVO, 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 (12), 1489-1499.
- MORI, S., BARTH, H. G., 1999, Size-Exclusion Chromatography, Springer-Verlag, New York, 234.
- MORIGIWA, A., KITABATAKE K., FUJIMOTO Y., IKEKAWA A., 1986. Angiotensin converting enzyme-inhibitory triterpenes from *G. lucidum*. Chemical. Pharmaceutical Bulletin, 34, 3025.
- MONTERO, G., MARLOWE, T., SMITH, B., BECK, K., 1996. Solubility of Disperse Dyestuff in Supercritical CO₂. North Caroline State University, U.S.A.
- NAKAHARA, M., YAMAGUCHI, T., OHTAKI, H., 1997. Structure of water and aqueous electrolyte solutions under extreme conditions Recent Research Development. Physical Chemistry, 1, 17.
- NISHITOBA, T., HIROJI S., KASAI T., KAWAGISHI H., SAKAMURA S., 1985. Isolation of lucidenic acid from *ganoderma*. Agricultural & Biological Chemistry, 49, 1793-1798.
- OHTAKI, H., 2003. Effects of temperature and pressure on hydrogen bonds in water and in formamide. Journal of Molecular Liquids, 103/104, 3-13.
- OOI, V. E. C., LIU, F. 2000. Immunomodulation and anticancer activity of polysaccharide-protein complexes. Curr. Medicinal Chemistry, 7, 715-729.

- PENG, Y., ZHANG, L. ZENG, F., KENNEDY, J. F., 2005. 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., 2005. Solution properties of water-insoluble polysaccharides from the mycelium of *Ganoderma tsugae*. Carbohydrate Polymers, 59, 351–356.
- PRATT, J. .M., 1972. Inorganic Chemistry of Vitamin B₁₂, Academic Press, New York.
- RAMSBOTTOM, J., 1959. Mushrooms and Toadstools, A Study of the Activities of Fungi Collins. London, 74.
- RESHETNIKOV, S.V., WASSER, S.P., TAN, K.K., 2001. Higher Basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides. International Journal of Medicinal Mushrooms, 3, 361-394.
- SAITO, H., OHKI, T., TAKASUKA, N. AND SASAKI, T., 1977. ¹³C-NMR- spectral study of a gel-forming, branched (1-3)-β-D-glucan, (lentinan) from *Lentinus edodes*, and its acid-degraded fraction. Structure, and dependence of conformation on the molecular weight. Carbohydrate Research 58, 293–305.
- SAITO, H., OHKI, T., SASAKI, T., 1979. ¹³C-nuclear magnetic response study polysaccharide gels. Molecular architecture in the gels consisting of fungal of,by branched (1–3)-β-D-glucans (lentinan and schizophyllan) as manifested conformational changes induced by sodium hydroxide. Carbohydrate Research, 74, 227–240.
- SASAKI, T., TAKASUKA, N., 1976. Further study of the structure of lentinan an antitumor polysaccharide from *Lentinus edodes*. Carbohydrate Research, 47, 99-104.
- 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., ADSHIRI, 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 Chemical Research*, 39, 2883-2890.
- SHIAO, M. S., 2003. Natural products of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: occurrence, biological activities, and pharmacological functions. *The Chemical Record*, 3, 172-180.
- SHIAO, M. S., LIN, L. J., YEH, S. F., CHOU, C. S., 1987. *Journal Natural Products*, 50, 891.
- SKOOG, D.A., HOLLER, F.J., NIEMAN T.A., 1998. Principles of Instrumental Analysis, Enstrumental Analiz İlkeleri, Bilim Yayıncılık, 366, 768-777.
- SMANIA, A. J., MONACHE, F. D., SMANIA, E.F., GIL, M.L., BENCHETRIT, L.C., CRUZ, F.S., 1995. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus*. Murr. *Journal of Ethnopharmacology*, Inglaterra, 45, 177-181.
- STAMETS, P., 1993. Growing Gourmet&Medicinal Mushrooms. Ten Speed Press, 554.
- SUGANO, N., HIBINO, Y., CHOJI, Y., MAEDA, H., 1982. Anticarcinogenic actions of water-soluble and alcohol-insoluble fractions from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Cancer Letters*, 17, 109.
- THOMSON, D., GRETHLEIN H. E., 1979. Design and evaluation of a plug flow reactor for acid. hydrolysis of cellulose. *Industrial & Engineering Chemical Producing, Research Development*, 18, 166-169.
- TOCHIKURA, T., NAKASHIMA, H, OHASHI, Y., YAMAMOTO N., 1988. Inhibition (in vitro) of replication and of the cytopathic effect of human immunodeficiency virus by an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Medicinal Microbiology Immunoludition*, 177, 235-44.

- 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.
- UNURSAIKHAN, S., XU, X. J., ZENG, F. B., ZHANG, L. N., 2006. Antitumor activities of O-sulfonated derivatives of (1→3)- α -D-Glucan from different *Lentinus edodes*, *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 70, 38-46.
- WAGNER, H., STUPPNER, H., SCHOFER, W., ZENK, M., 1988. *Phytochemistry*, 27, 119-126.
- WAGNER, W., PRUSS, A., 2002. The IAPWS formulation 1995 for the thermodynamic properties of ordinary water substance for general and scientific use. *Journal of Physical Chemical Reference*, 31, 387-535.
- WANG, S.Y., HSU, M. L., HSU, H. C., TSENG, C. H., LEE, S. S., SHIAO, M. S., HS, C. K., 1997. The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. *International Journal of Cancer*, 70, 699.
- WANG H. X., NG T.B., OOI V.E. C., 1999. Studies on of a lectin from fruiting bodies of the edible shiitake mushroom *Lentinus edodes*. *The International Journal of Biochemistry&Cell Biology*, 31, 595–599 .
- WANG YY, KHOO KH, CHEN ST, LIN CC, WONG CH, LIN CH. 2002.Studies on the immuno-modulating and antitumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides: functional and proteomic analysis of a fucose-containing glycoprotein fraction responsible for the activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10,1057-62.
- WASSER, S. P., WEIS, A. L., 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms current perspectives. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1, 31-62.
- WASSER, S. P., 2001. *Int. Journal Medicine Mushroom*, 3, 12-14.
- WEAST, R.C., 1976. *Handbook of Chemistry and Physics*, 56th edition, CRC Pres.

- WEN, J., ARAKAWA, T., JOHN, S. P., 1996. Analytical Biochemistry, 240, 155–166.
- WUILLOUD, R. G., KANNAMKUMARATH, S. S., CARUSO, J. A., 2004. Speciation of essential and toxic elements in edible mushrooms: size exclusion chromatography separation with on-line UV-inductively coupled plasma mass.
- YAU, W.W., KIRKLAND, J.J., BLY, D.D., 1979. Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography, Practice of Gel Permeation and Gel Filtration Chromatograph, Wiley, New York.
- YEN, M. T., TSENG, Y. H., LI, R. C., MAU, J. L., 2005. Antioxidant properties of fungal chitosan from Shiitake stipes. Swiss Society of Food Science and Technology.
- ZEITLMAYER, L., 1953. Wild Mushrooms, An Illustrated Handbook. Germany, 60.
- ZHAO, J. D., 1989. The *Ganodermataceae* in China. Bibliotheca Mycologica, 132.
- ZHANG, P. Y., ZHANG, L. N., CHENG, S. Y., 1999. Chemical Structure and Molecular weights of alpha-(1-> 3)-D-glucan from *Lentinus edodes*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 63(7), 1197-1202.
- ZHENG, R., JIE, S., HANCHUAN, D., MOUCHENG, W., 2005. Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from *Lentinus edodes*. International Immunopharmacology, 5, 811-820.
- ZHENG, P., 2005. Isolation and purification of polysaccharides. (Application note of Wyatt Technology Corporation)
- ZHU, H. S., YANG, X. L., WANG, L. B., ZHAO, D. X., CHEN, L., 2000. Effects of extracts from sporoderm-broken spores of *Ganoderma lucidum* on HeLa cells, Cell Biol., Toxicol. 16, 201-206.

Anonim, 2005a, admin@gmushrooms.com

Anonim, 2005b, www.mushworld.com

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Adana’da doğdum. İlkokulu Ömer Haluk Özuçak İlkokulu’nda, orta öğrenimimi Ramazanoğlu İlköğretim Okulu’nda, lise öğrenimimi ise Mehmet Kemal Tuncel Lisesi Yabancı Dil Ağırlıklı Bölümü’nde (Süper Lise) tamamladım. 2000-2001 öğretim yılında Çukurova Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünde lisans öğrenimine başladım. 2004 yılında lisans öğrenimini tamamladıktan sonra aynı yıl şubat ayında Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimine başladım.

EKLER

EK A

HESAPLAMALAR

Protein Miktarı:

BSA için;

$$M_1 = \frac{A + m}{1000 \times 0,0009}$$

WPI için;

$$M_1 = \frac{A + m}{1000 \times 0,001}$$

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

m: Eğim

M₁: Protein miktarı, mg

M₂: Örnek miktarı, g

A: Örneğin absorbans değeri

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:

Bazik 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 : Örnek miktarı, g

Nem Miktarı:

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

M_1 : Kroze + Örnek miktarı, g

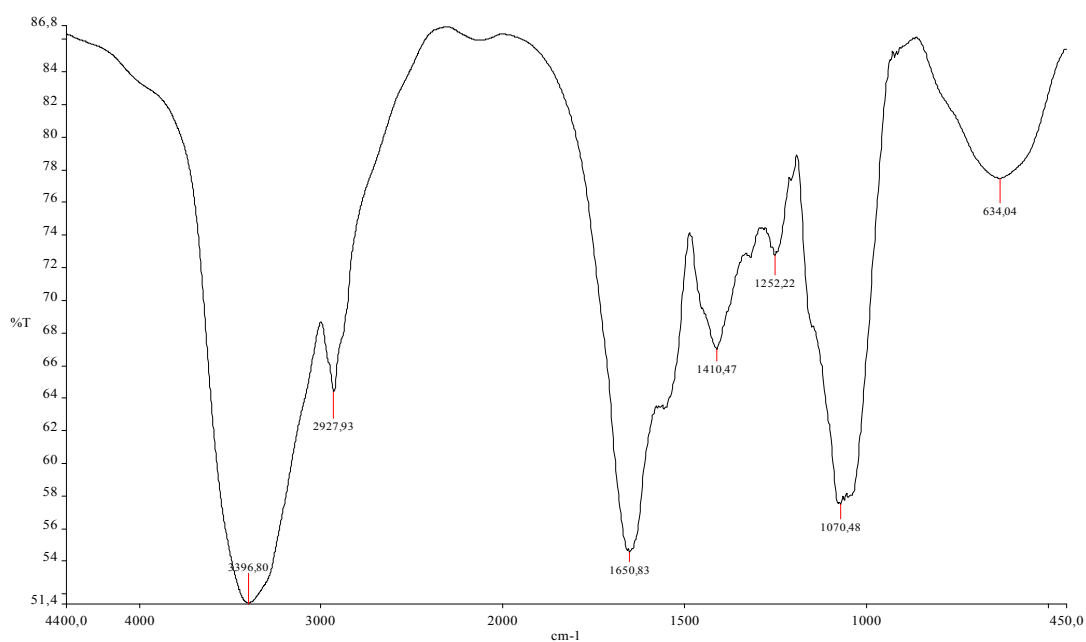
M_2 : Sabit tartıma getirilmiş kroze ağırlığı, g

S : Örnek miktarı, g

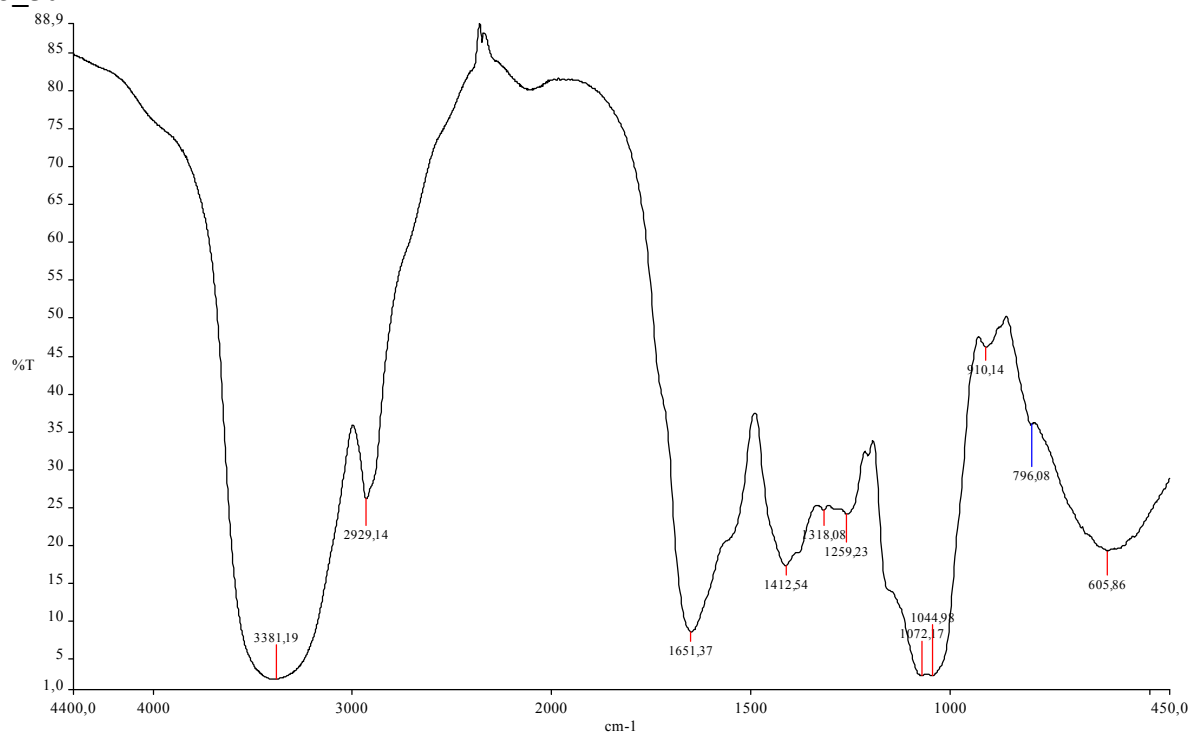
EK-B

FT-IR SPEKTRUMLARI

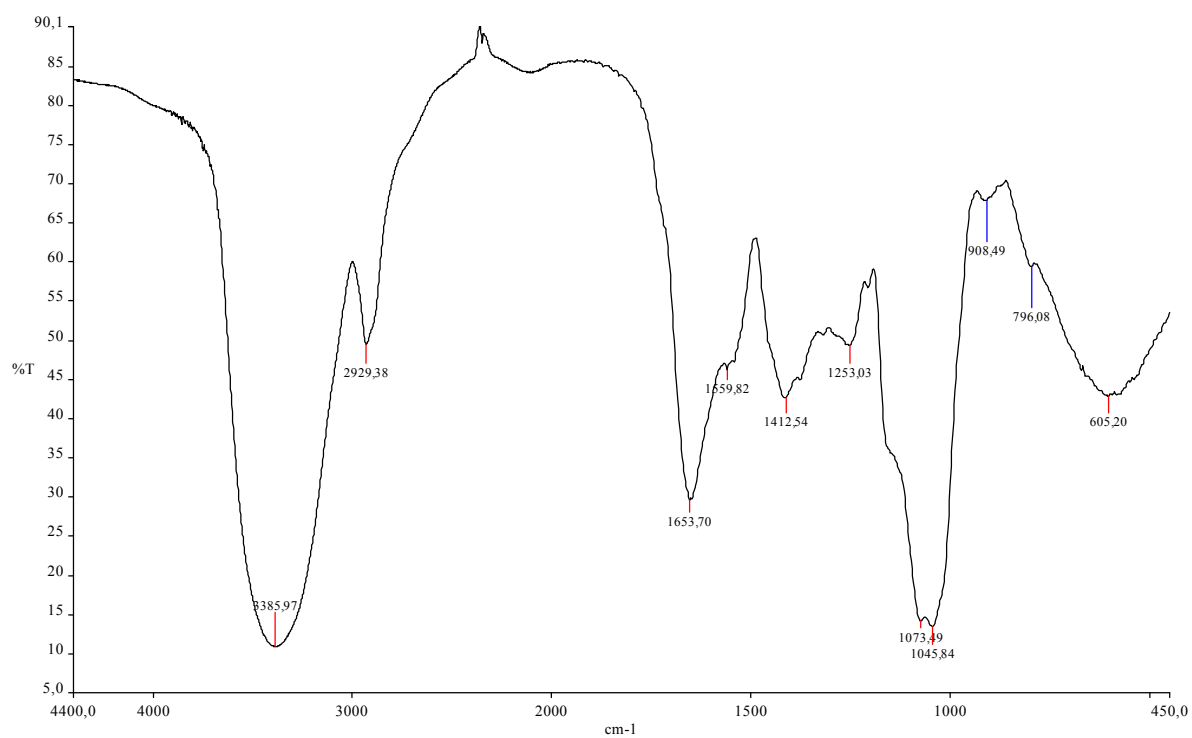
S_atm



S_50



S_100



S_150

