



T.C.  
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**INONOTUS OBLIQUUS MANTAR TÜRÜNÜN  
KÜLTÜRE EDİLMESİ VE KİMYASAL  
KARAKTERİZASYONU**

**NAZAN KOCA**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
ORMAN ENDÜSTRİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**KAHRAMANMARAŞ 2019**

**T.C.**  
**KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**INONOTUS OBLIQUUS MANTAR TÜRÜNÜN**  
**KÜLTÜRE EDİLMESİ VE KİMYASAL**  
**KARAKTERİZASYONU**

**NAZAN KOCA**

**Bu tez,**  
**Orman Endüstri Mühendisliği Anabilim Dalında**  
**YÜKSEK LİSANS**  
**derecesi için hazırlanmıştır.**

**KAHRAMANMARAŞ 2019**

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Nazan Koca tarafından hazırlanan “INONOTUS OBLIQUUS MANTAR TÜRÜNÜN KÜLTÜRE EDİLMESİ ve KİMYASAL KARAKTERİZASYONU ”adlı bu tez, jürimiz tarafından 09/08/2019 tarihinde oy birliği ile Orman Endüstri Mühendisliği Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Ertuğrul ALTUNTAŞ (1.DANIŞMAN)

Orman Endüstri Mühendisliği Anabilim Dalı .....  
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Dr. Öğretim Üyesi Eyyüp KARAOĞUL (2.DANIŞMAN)

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı .....  
Ş. Urfa Harran Üniversitesi

Prof. Dr. Mehmet Hakkı ALMA (ÜYE)

Orman Endüstri Mühendisliği Anabilim Dalı .....  
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Doç. Dr. Mehmet KAHRAMAN (ÜYE)

Kimya Anabilim Dalı .....  
Gaziantep Üniversitesi

Doç . Dr .Bekir Cihat BAL

Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Ana Bilim Dalı .....  
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. MUSTAFA YAZICI

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü .....

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, alıntı yapılan her türlü kaynağa eksizsiz atıf yapıldığını bildiririm.



**Nazan KOCA**

Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

KSÜ BAP Proje No: 2016/5-50

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.

# INONOTUS OBLIQUUS MANTAR TÜRÜNÜN KÜLTÜRE EDİLMESİ VE KİMYASAL KARAKTERİZASYONU

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

NAZAN KOCA

## ÖZET

Doğal kaynaklar, birçok hastalığın tedavisinde kullanılabilecek potansiyele sahiptirler, fakat bu kaynaklar insanlar tarafından bilinçsizce tüketilmektedir. Bununla birlikte enfeksiyon hastalıkları ile mücadelede bugüne kadar geliştirilen sentetik antibiyotikler mikropların direnç kazanmalarını sağladığından dolayı tıp dünyası yeni ve değişik antimikrobiyal maddeler keşfetmek için doğaya yöneltmiştir.

Yapılan çalışmada zengin antioksidant içeriğe sahip ve bağışıklık sisteminin tepkisini arttıran bir grup polisakarit zengini olan Chaga (*Inonotus obliquus*) mantarının kültüre edilmesi ve içeriğinin belirlenmesi araştırılmıştır. Chaga mantarı vücudun ihtiyaç duyduğu şeylere bağlı olarak bağışıklık sistemini düzenlemektedir. Chaga mantarı için yaşam koşulları laboratuvar şartlarında sağlanmaya çalışılmıştır. Laboratuvar şartlarında kısmen üretilen chaga mantarının toplam tanen ve toplam antioksidant özellikleri ve LC/MS/MS ile aminoasit analizleri yapılmıştır.

Elde edilen verilere göre laboratuvar şartlarında üretilen mantarın yüksek antioksidant özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Chaga mantarı ekstraktlarına yapılan fenolik analiz çalışmalarının sonuçlarında quercetin, vanilicacis, resveratrol, gallicacid, caffeic, salisilikasid, hydroxybenzoik gibi fenolik asitler yüksek oranda tespit edilmiştir. Bu mantarın aminoasit içeriği ise yüksek oranda treonin, losin, glutamin, glutamik asit ornitin ve düşük miktarlarda da alanin, arjinin, asparajin ve b-alanin aminoasitlerini içermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Inonotus obliquus*, Chaga mantarı, Sibiry mantarı, LC/MS/MS yöntemi, Kültürasyon

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Orman Endüstri Mühendisliği Anabilim Dalı, Ağustos/2019

Danışmanlar:

Doç. Dr. Ertuğrul ALTUNTAŞ

Dr.Öğretim Üyesi Eyyüp KARAOĞUL

Sayfa sayısı: 49

**CULTURE AND CHEMICAL CHARACTERIZATION OF INONOTUS  
OBLIQUUS MUSHROOM SPECIES**

**(M.Sc. THESIS)**

**NAZAN KOCA**

**ABSTRACT**

Natural resources have the potential to be used to treat many diseases, but these resources are consumed unconsciously by people. However, synthetic antibiotics developed to combat the infectious diseases have caused microbes to gain resistance. The medical world has directed nature to discover the new and different antimicrobial agents.

In this study, it was investigated to cultivate and determine the content of chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) which is rich in polysaccharide rich antioxidant content and increases the response of immune system. Chaga mushroom regulates the immune system depending on the substances needed by body. Living conditions for chaga mushroom were tried to be provided under laboratory conditions. Total tannin and total antioxidant properties and LC/MS/MS analysis of chaga mushroom which was partially produced in laboratory conditions were performed.

According to the results, it was found that the fungus produced under laboratory conditions had high antioxidant properties. In the results of phenolic analysis of Chaga mushroom extracts, phenolic acids such as quercetin, vanilic acid, resveratrol, gallic acid, caffeic, salicylic acid and hydroxybenzoic were found to be high. The amino acid content of chaga mushroom includes high levels of threonine, lysine, glutamine, glutamic acid, ornithine and small amounts of alanine, arginine, asparagine and  $\beta$ -alanine amino acids.

**Key words:** *Inonotus Obliquus*, Chaga mushroom, Siberian mushroom, LC/MS/MS method, Cultivation

University of Kahramanmaraş Sütçü İmam  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Forest Industry Engineering, August/2019

Supervisors:

Associate Professor Ertuğrul ALTUNTAŞ

Faculty Member Eyyüp KARAOĞUL

Page Numbers: 49

## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması süresince engin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım ve çalışmamın her aşamasında sağladıkları bilimsel katkılardan dolayı danışmanlarım Doç. Dr. Ertuğrul ALTUNTAŞ ve Dr. Öğr. Üyesi Eyyüp KARAOĞLU'na teşekkürümü sunarım. Tüm çalışmalarım süresince değerli görüş ve fikirlerini benimle paylaşan Prof. Dr. M.Hakkı ALMA hocama teşekkür ederim. Chaga mantarının yetiştirme sürecinde çalışmalarımı birlikte yürüttüğüm Doğu Akdeniz Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü ve enstitüde görev yapmış olan Ziraat Yüksek Mühendisi Ayhan ZÜLKADİR'e, yüksek lisans eğitimim boyunca beni yalnız bırakmayan en büyük destekçim Alev AKGÜL ve ailesine, fikirleri ile bana her zaman yol gösteren akıl hocam Neslihan YILMAZ ve ailesine, tüm bölüm hocalarıma teşekkür ederim.

Dünya'ya gözlerimi ilk açtığım andan itibaren bu günlere gelmemde her türlü maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, varlıklarına şükrettiğim sevgili babam Zamir KOCA'ya ve annem Neriman KOCA'ya, başta büyük ağabeyim olmak üzere ağabeylerim Nimetullah KOCA ve Emre KOCA'ya, yengem Aslıhan KOCA ve yeğenim Arda KOCA'ya sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Son olarak bu yüksek lisans tez çalışmasını destekleyen Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi'ne de teşekkürlerimi sunarım.

**Nazan KOCA**

**Kahramanmaraş, Temmuz, 2019**

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİL DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
DENKLEM DİZİNİ .....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Tıbbi Mantar <i>Inonotus Obliquus</i> (Chaga) .....	2
1.1.1. Tıbbi mantarların genel özellikleri.....	2
1.1.2. Huş ağacının genel özellikleri.....	5
1.1.3. <i>Inonotus obliquus</i> (Chaga) mantarının genel özellikleri.....	6
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	9
3. MATERYAL VE METOT.....	12
3.1. Materyal.....	12
3.1.1. Mantar miselinin elde edilmesi.....	12
3.1.2. Mantar misellerini yetiştirme.....	13
3.1.3. Mantar misellerinin rutubet ve azot içeriğinin belirlenmesi.....	14
3.1.4. Sterilizasyon ve ekim.....	16
3.1.5. İnkubasyon ve hasat.....	19
3.2. Metot.....	20
3.2.1. Mantar misellerinin deney için hazırlanması.....	20
3.2.2. pH ve Ec miktarının ölçülmesi .....	20
3.2.3. Toplam kondense tanen miktarı.....	21
3.2.4. Toplam antioksidant aktivitesinin belirlenmesi.....	25
3.2.5. LC/MS/MS analizinin yapılışı .....	26
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	29
4.1. Verim Tayini .....	29
4.2. DPPH Radikal Temizleyici Etkinlik.....	29
4.3. Toplam Yoğunlaştırılmış Tanen.....	30
4.4. LC/MS/MS Yönteminin Analitik Parametreleri.....	30
4.4.1. LC/MS/MS yöntemi ile elde edilen fenolik bileşikler.....	30
4.4.2. LC/MS/MS yöntemi ile elde edilen aminoasitler .....	36



5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	43
KAYNAKLAR.....	44
ÖZGEÇMİŞ.....	48



## ŞEKİL DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1.1:Chaga mantarının huş ağacı gövesindeki seksüel formu (a ,b ,c), chaga çürüklüğü (d, e).....	6
Şekil 1.2: Hasat edilmiş chaga mantarı ve güneşte kuruması (a,b).....	8
Şekil 3.1:Olgunlaşmış mantar kültürü (a), misel oluşumu gözlenmiş mantar kültürü (b), kültürasyon için hazırlanmış besi ortamlı petri kapları (c), aşılama öncesi misel kesimi (d), misel aşılama (e).....	13
Şekil 3.2:Huş ağacı talaşı nemlendirme işlemi (a), nemlendirilmiş huş talaşı (b), nemlendirme işlemi öncesi ve sonrası (c), açık havada nemlendirilmiş huş talaşları (d). ....	14
Şekil. 3.3:Chaga mantarı ekim işlemi (a), misel oluşmuş kavanozlar (b,c),aşılama öncesi inkübasyon odası (d), kavanozlara misel ekim işlemi (e).....	15
Şekil 3.4:Aşılınmış steril odadaki kavanozlar .....	15
Şekil 3.5:Olgunlaşmış chaga mantarı (a), olgunlaşmış chaga mantarında kabuk oluşumu (b).....	16
Şekil 3.6:Otoklav (a), malzeme sterilizasyonu (b) .....	17
Şekil 3.7:20 x 30 ve 30 x 45 cm ebatlarındaki propilen poşetlerdeki talaşlar (a) ve hassas terazide ölçüm (b) .....	17
Şekil 3.8:Aşılama kabinine alınan propilen poşetlere kültürasyon işlemi (a,b) .....	18
Şekil 3.9:Chaga mantarı ve kültürasyon için hassas terazide gramaj ayarlama (a,b).....	18
Şekil 3.10:Propilen poşetlere misel ekimi (a), ekim sonrası homojenlik kontrolü (b).....	18
Şekil 3.11:Olgunlaşmış chaga mantarı(a),olgunlaşmış chaga mantarında kabuk oluşumu(b). 19	
Şekil 3.12:Misel oluşumu için inkübasyon odasına yerleştirilmiş numuneler (a,b).....	19
Şekil 3.13:İnkübasyon odasındaki misel oluşmuş numune .....	19
Şekil 3.14:Etüv (a), pH ve Ec ölçüm hazırlıkları (b,c).....	21
Şekil 3.15:pH ve Ec ölçümü .....	21
Şekil 3.16Tanenin molekül yapısı .....	22
Şekil 3.17:Shimadzu Uv-Vis spektrofotometre.....	23
Şekil 3.18:Mimoza tanen kalibrasyon eğrisi .....	24

Şekil 3.19:LC/MS/MS enstrümantasyon.....	26
Şekil 3.20:Fenolik bileşiklerin kromatografisi .....	28
Şekil 4.1:Kültüre edilmiş chaga mantarı örneklerinde bulunan fenolik bileşikler ve miktarları.....	34
Şekil 4.2:Öğütülmemiş chaga mantarı örneklerinde bulunan fenolik bileşikler ve miktarları.	34
Şekil 4.3:Öğütülmüş chaga mantarı örneklerinde bulunan fenolik bileşikler ve miktarları.....	35
Şekil 4.4: Kültüre Edilmiş chaga mantarı amino asit içerikleri ve miktarı .....	41
Şekil 4.5: Ticari chaga mantarı amino asit içerikleri ve miktarı .....	41



## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa No

Çizelge 1.1: Tıbbi özelliklere sahip mantarlar ve biyoaktiviteleri .....	4
Çizelge 3.1: Örneklerin etüv öncesi ve sonrası ağırlıkları.....	21
Çizelge 3.2: pH ve Ec değerleri (20 g örnek+100 mL saf su).....	21
Çizelge 3.3: Toplam yoğunlaştırılmış tanen konsantrasyonu.....	23
Çizelge 3.4: Mimoza tanenin kalibrasyon standartı .....	23
Çizelge 3.5: Kültüre edilmiş (KI) ve ticari chags mantarlarının (TI) aminoasit değerleri .....	27
Çizelge 4.1: Chaga verim tayini değerleri .....	29
Çizelge 4.2: Chaga ekstraktlarının DPPH süpürücü aktiviteleri .....	29
Çizelge 4.3: Chaga mantarındaki yoğunlaştırılmış tanen miktarları .....	30
Çizelge 4.4: Ticari ve kültürel chaga mantarının analitik parametreleri .....	32
Çizelge 4.5: Kültüre edilmiş (KI) ve ticari (TI) chaga mantarlarının amino asit içerikleri ve miktarları.....	38

## DENKLEM DİZİNİ

### Sayfa No

Denklem 1: Rutubet içeriği .....	14
Denklem 2: DPPH radikal süpürücü aktivitesinin inhibitörü.....	24
Denklem 3:Bileşik µg/g'nin kantifikasyonu .....	25



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	2,2-azino-bis
a.a	Amino Asit
BHT	Butile Hidroksitolüen
BHA	Bütilhidroksianisol
cm:	Santimetre
DPPH	1, 1-difenil-pikril hidrazil (1, 1-difenil-2-pikrihidrazil)
DMSO	Dimetil Sülfoksit
Ec	Electrical Conductivity ( Elektrik İletkenliği)
EtOH	Etanol
Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Demir (III) Sülfat
g	Gram
HCl	Hidroklorik Asit
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
IM	Ionization Mode ( İyonizasyon Modu)
K.N.	Kaynama Noktası
Kg:	Kilogram
K	Öğütülmemiş Ticari Chaga Mantarı
LC	Sıvı Kromatografisi
L	Litre
LOQ	Algılama Limiti (Limit Of Quantification)
LOD	Miktar Sınırı (Limit Of Detection)
MeOH	Metanol
MS	Kütle Spektrometresi
MIC	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
mL	Mililitre
mg	Miligram
mm	Milimetre
min.	Minimum
max.	Maximum

$\mu$ l	Mikrolitre
$\mu$ g	Mikrogram
nm	Nanometre
ND	Belirlenemeyen
N	Kültüre Edilmiş Chaga Mantarı
OH	Hidroksil
ppm	Milyon Başına Parça (Parts Per Million)
pH	Hidrojen Potansiyeli (Potential Hydrogen)
$\pm$ SD	Standart Sapma
T	Öğütülmüş Ticari Chaga Mantarı
UV - GB	Ultraviyole ve Görünür Bölge
UV - VIS	Ultraviyole ve Görünür Işık

## 1. GİRİŞ

Mantarlar, birçok et ve sütte daha az protein içerirken, sebzelere göre daha çok protein içermekte olup kolayca sindirilebilir bir özelliğe sahiptir. Protein miktarları (kuru ağırlık) %10-40 arasında değişmektedir. Mantarlarda esansiyel tüm aminoasitlere rastlanmaktadır. Başta fosfor, demir, kalsiyum ve potasyum mineralleri bakımından zengin olmakla birlikte birçok minerali gelişimlerinin tüm basamaklarında bulundurmaktadırlar (Breene W., 1990).

Tedavi amaçlı kullanıldığı zaman; normal boyutlarından daha küçük ve hatta toz haline getirilmiş konsantreler olarak ya da sıcak su ekstraktları yapılarak tüketilmektedir. Chang ve Buswell tarafından sıvı konsantrasyon halinde veya kuru toz haline getirilen tıbbi mantar ekstrakt kapsülleri özellikle günümüz sağlık sorunlarından biri olan obezitenin tedavisinde bir diyet maddesi olarak rahatlıkla kullanılabilir besin kaynağı olduğunu savunmaktadırlar (Chang S. Ve ark., 1996). Japonya, Çin, Kore ve diğer Asya ülkelerinde yapılan çalışmalarda, bu mantar türlerini kurutularak muhafaza etmiş ve günümüzde de tedavilerde alternatif çözüm yolu olarak kullanılmaya devam etmişlerdir (Manzi ve ark., 1999).

Tıbbi mantarların ortaya çıkış tarihini inceleyecek olursak kökenlerinin geleneksel Uzak Doğu tedavilerine dayandığını ve bu mantar bileşiklerinin sayesinde hücre ya da organizmalar içerisindeki dengenin düzenlenmesi ve buna bağlı hastalıklara karşı dirençlerin artırılması gibi konularda etkili çalışmalar yürütüldüğü belirtilmiştir. (Dülger ve ark., 1999).

İyi bir vitamin kaynağı olan bu mantarlar, tiyamin, riboflavin, niyasin, biyotin ve askorbik asit gibi vitaminleri bünyesinde bulundurmaktadır. Folik asit bakımından da zengin olan mantarlar, tıpta kansızlık tedavisinde kullanılmaktadır. Mantarlardaki ham yağ içerikleri incelendiğinde, yağ asitleri mono-,di- ve trigliserid'leri, sterolleri, sterol esterleri ve fosfolipidleri dahil tüm ana lipid bileşenlerini içerdiği tespit edilmiştir. Yağ asitleri genelde düşük miktarlarda bulunmakla birlikte kuru mantarın yaklaşık %2-8'ini oluşturmaktadır. (Smith ve ark., 2002).

Uzun zamandan beri lezzet ve yapı açısından değer verilen bu tıbbi mantar türleri, şimdilerde yenilebilir özellikleri dışında biyolojik aktif madde özellikleri ile de tanınmaktadırlar (Smith ve ark., 2002).



Yaklaşık 300 milyon yıl öncesine ait fosilleşmiş odunlarda bu mantar türlerine rastlanmıştır. Antik Romalılar mantarların gök fırtınaları sırasında Jüpiter tarafından yeryüzüne yıldırımla geldiklerine inanmış ve “Tanrıların gıdası” olarak adlandırmışlardır. Mısırlılar ise mantarları “Tanrı Osiris’den bir hediye” olarak kabul etmişlerdir. Çin’de ise mantarlar “hayat iksiri” olarak adlandırılmıştır (Pegler, 2002). Mantarların tanınması ve sistem içine alınma çalışmaları 16 ’ncı yüzyılın sonunda başlamıştır (Sümer, 2006).

Ökaryotik hücre yapısına sahip makrofunguslar, eşeyli ve eşeysiz üremekte ve sporlar ile çoğalmaktadır. Şekil ve büyüklükleri bakımından ise farklıdırlar. Bitkiler gibi fotosentez yapamazlar ve besinlerini başka canlıların ürettiklerini dönüştürerek elde ederler. Heterotrof canlılar olan bu mantarlar, besinlerini hücreye absorpsiyon yolu ile almaktadırlar. Hiflerden oluşan ağsı bir yapıya sahiptirler ve bu hifler büyüyüp dallanarak anastomoz adı verilen yapılar oluşturur. Oluşan bu hif yığınları daha sonra gelişerek miselleri oluşturur. Uygun ortam şartlarında ise miseller, toprak ustı yapı olan karpofor adındaki şapka kısmını oluştururlar. (Demir, 2007).

## **1.1. Tıbbi Mantar Inonotus Obliquus (Chaga)**

### **1.1.1. Tıbbi mantarların genel özellikleri**

Tıbbi mantarlar , ormanlık alanlarda ölü ya da yaşayan ağaçlar üzerinden toplanmakta ve yüzyıllar boyunca yiyecek olarak tüketildiğini gibi son yıllardaki bilimsel çalışmalarda bu mantarlar tarafından üretilen bileşenlerin birçok hastalığı tedavi edici özelliklere sahip olduğu belirtmişlerdir. Böylece ilaç sanayisinde kullanılan kaynaklar arasında yer almıştır. (Chang, 1996; Lindequist ve ark., 2005; Chang, 2006; Wasser, 2008; Cheung, 2008; Öztürk ve Çopur, 2009).

Mantarların sap ve şapka kısımları, sporları, miselleri ya da farklı kısımlarından yararlanılarak elde edilen bileşenler insanlar tarafından sıcak su ekstraktları, tentür (bitkilerin kök, gövde, çiçek, yaprak veya dallarının bitkisel alkol-şeker kamışından elde edilir, sirke veya su ile karıştırılmasından elde edilen karışımdır) ve toz formları halinde tüketilmiştir. Mantarların %85 oranında sap ve şapka kısımlarından elde edilse de, bazen de %15’i misel ve spor kısımlarının tıbbi amaçlarla kullanıldığı araştırmacılar tarafından belirtilmektedir (Chang, 1996; Lindequist ve ark., 2005; Chang, 2006; Cheung, 2008; Wasser, 2008; Öztürk ve Çopur,2009).

Dünya nüfusunun giderek artması ile beraber beslenme ve sağlıkla ilgili sorunların da yaşanmaya başlanmıştır. Günümüzde bilim ve teknoloji açısından büyük ilerlemeler

görülmesine rağmen, doğal kaynakların insanlar tarafından bilinçsizce tüketimi ve bu bilinçsiz tüketimin sonucunda karşılaşılan ekonomik güçlükler, doğal kaynakların çok amaçlı kullanılmasını artık zorunlu kılmaktadır. Diğer taraftan enfeksiyon hastalıklarıyla mücadelede bugüne kadar geliştirilen doğal ve sentetik antibiyotiklerin, mikropların direnç kazanmaları ve çeşitli yan etkilerinin bulunmasından dolayı, tıp dünyası yeni ve değişik antimikrobiyal maddeler keşfetmek için doğaya yönelmiştir. Bu yönelmeler sonucunda ülkemizin doğal kaynaklar bakımından oldukça zengin olduğu ve uzun yıllardır halkımız tarafından bilinen ve tüketilen mantarların önemini arttırmaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Duman ve ark., 2003).

Tıbbi mantarların faydaları araştırıldığında karşılaşılan sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda, yeni bulunacak biyomedikal moleküller için zengin bir kaynak olduğu görülmüş ve pek çok ilaç firmasının ilgisini çekmiştir. Bu araştırmaların en güzel örneklerinden biri ise, mantarlar tarafından üretilen pek çok polisakkaritlere bağlı proteinlerin ABD Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından antitümör kimyasal madde olarak belirlenmiş ve aşağıdaki çizelge 1.1’de sunulmaktadır. (Zhang, 2006 ).

Yapılan bilimsel araştırmalar sonucu bazı makrofungus türlerinin antibakteriyal, antifungal, antiviral ve antiprotozoal gibi çeşitli kimyasal bileşiklere sahip oldukları ve organizmanın yaşadığı ortamda varlığını sürdürerek, çevresindeki rekabetçi türlere nazaran üstünlük sağlayabilmesi için bu kimyasallara ihtiyaç duyduğu belirtilmektedir (Solak ve ark., 2006). Bu gelişmelerin yanı sıra bulaşıcı hastalıkların tedavisinde kullanılan birbirlerinin benzeri ticari antimikrobiyal ilaçlarla kıyaslanan tıbbi mantarlar insan vücudunda hastalıklara karşı direnç göstermektedir (Anderson ve ark., 2007).

Mantarlar, kalp, beyin, mide, karaciğer ve akciğer koruyucu olmakla birlikte, böbrek ve üriner sistem hastalıklarına karşı bağışıklık sistemini güçlendirici; akne, alzheimer, anoraksiya, astım, bronşit, depresyon, eklem romatizması, epilepsi, hemoroit, hipertansiyon, kanser, kireçlenme, kronik hepatit, katarakt, obezite, gut, nezle, rinit, retinal pigment dejenerasyonu, saç dökülmesi, nefrit, nevrasteni, ülser ve uykusuzluk tüberküloz, epilepsi ve yılan ya da akrep sokması gibi durumlara karşı panzehir olarak kullanılmıştır. Chaga mantarı olarak bilinen *Inonotus obliquus* mantar türü Rusya genelinde yapılan çalışmalarda Ural, Sibirya, Polonya ve Baltık ülkeleride dâhil olmak üzere diğer tıbbi mantar türlerinde olduğu gibi hastalıkların tedavisi için kullanılmaktadır (Denisova, 1998; Ooi, 2000; Chen ve ark., 2004; Liu ve Zhang, 2005; Casey, 2008).

Çizelge 1.1: Tıbbi özelliklere sahip mantarlar ve biyoaktiviteleri

MANTARLAR	POLİSAKKARİT KAYNAĞI	BİYOAKTİVİTESİ
<i>Agaricus blazei</i>	Miselyum, fruktifikasyon	Antitümör
<i>Armillariella tabescens</i>	Miselyum	Antitümör
<i>Auricularia auricula-judae</i>	Fruktifikasyon	Hiperglisemi, antitümör, antiinflamatuvar, antiradyoaktif, immunmodülatör
<i>Clitopilus caespitosus</i>	Fruktifikasyon	Antitümör
<i>Cordyceps sp.</i>	Fruktifikasyon, miselyum	Immunmodülatör, antitümör, hiperglisemi
<i>Dictyophora indusiata</i>	Fruktifikasyon	Antitümör, hiperlipidemi
<i>Flammulina velutipes</i>	Miselyum, fruktifikasyon	Antitümör, antiinflamatuvar, antiviral, immunmodülatör
<i>Ganoderma applanatum</i>	Fruktifikasyon	Antitümör
<i>Ganoderma lucidum</i>	Fruktifikasyon, misel	Hiperglisemi, antitümör, antioksidatif, bağışıklık sistemi koruyucu, yaşlanma geciktirici
<i>Grifola frondosa</i>	Fruktifikasyon	Antiinflamatuvar , antitümör , immunmodülatör , antiviral , karaciğer koruyucu
<i>Hericium erinaceus</i>	Miselyum, fruktifikasyon	Hiperglisemi, antitümör, immunmodülatör
<i>Inonotus obliquus</i>	Miselyum, fruktifikasyon	Antitümör, immunmodülatör
<i>Lentinus edodes</i>	Misel , fruktifikasyon	Antitümör, antiviral, immunmodülatör
<i>Morchella esculenta</i>	Fruktifikasyon	Antitümör, hiperglisemi
<i>Omphalia lapidescens</i>	Fruktifikasyon	Antiinflamatuvar, İmmunmodülatör
<i>Peziza vesiculosa</i>	Fruktifikasyon	İmmunmodülatör, antitümör
<i>Phellinus linteus</i>	Fruktifikasyon	Antitümör
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	Fruktifikasyon	Antitümör
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Fruktifikasyon	Antitümör, hiperglisemi, antioksidan
<i>Pleurotus tuber-regium</i>	Sclerotium, miselyum	Karaciğer koruyucu , anti meme kanseri
<i>Polyporus umbellatus</i>	Miselyum	Antitümör, immunmodülatör
<i>Polystictus versicolor</i>	Miselyum, fruktifikasyon	Antitümör, antiinflamatuvar, antiradyoaktif , immunmodülatör, hiperglisemi
<i>Schizophyllum commune</i>	Miselyum	Antitümör
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Sclerotium	Antitümör
<i>Trametes robiniophila</i>	Miselyum	İmmunmodülatör, antikanser, karaciğer koruyucu
<i>Tremella aurantialba</i>	Miselyum, fruktifikasyon	İmmunmodülatör, hiperglisemi
<i>Tremella fuciformis</i>	Fruktifikasyon, miselyum	Hiperglisemi, antitümör, antiyaşlanma, hiperlipidemi, immunmodülatör, antitrombus
<i>Tricholoma mongolicum</i>	Fruktifikasyon	Antitümör

### 1.1.2. Huş ağacının genel özellikleri

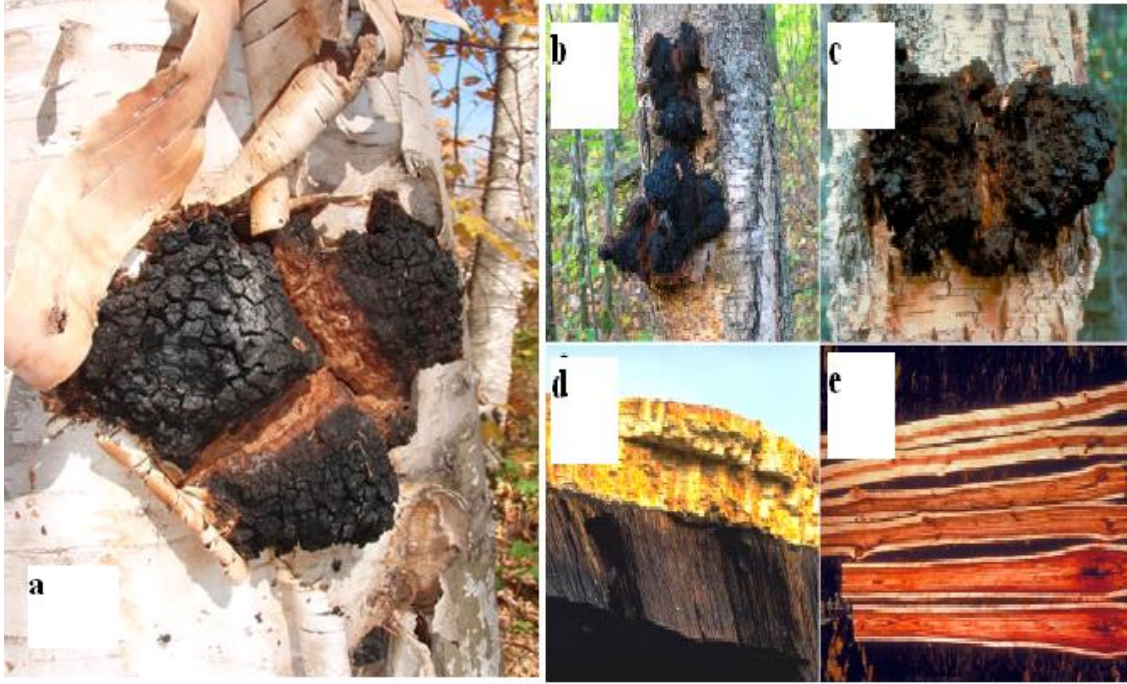
Ülkemizde yer alan ve Latince cins adı *Betula* olan huş ağacının 5 (beş) türü bulunmaktadır. Bu türlerden 1 (bir) tanesi ise endemiktir. Dünyada genelinde ise 50 türe yakın yayılış göstermektedir. Huş ağacının ana vatanı; Türkiye, Avrupa, Sibiry, Kafkaslar ve İran'ın kuzeyidir. Dünya üzerinde; Avrupa, Kafkasya, Doğu Anadolu, Kuzey Irak, Kuzeybatı İran ve Batı Sibiry'da yetiştiği görülmektedir. Ülkemizde ise; İç Anadolu Bölgesi ve Doğu Anadolu Bölgesi ile Doğu Karadeniz Bölgesinin yüksek kesimlerinde (Nazım Tanrıkulu, 2008).

Huş (*Betula ssp.*) türleri doğal olarak yetişmekte ve uzun ömürlü olan bu bitki yaklaşık 100 ile 200 yıl kadar yaşamaktadır. Ilıman ve soğuk iklimde yetişen bir türdür. Bu yüzden soğuk iklim koşullarına dayanıklıdır. Doğu ve Kuzeydoğu Anadolu'da, Nemrut dağı krateri içinde, Tunceli-Ovacık ve Munzur vadisi, Artvin-Ardanuç, Erzincan, Erzurum, Muş, Gümüşhane ve Kars dolaylarında 1800-3000 m rakım arasında bu bitki türüne rastlanmaktadır. Ülkemizde bulunduğu bölgelere bakacak olursak, bu bitki türü yeterince bilinmemekle beraber değerlendirilmemektedir. Değerlendirme açısından ise Avrupa ülkeleri bu konuda ülkemizden daha önde ilerlemektedir. Özellikle Rusya huş ağacı konusunda dünya ya önderlik etmektedir (Nazım Tanrıkulu, 2008).

Huş ağacı; odunun esnek ve sağlam olmasından dolayı uçak pervanesi, mobilyacılıkta, ayakkabıcılıkta; ısı değeri yüksek yakıt ve tıbbi kömür (*Carbo medicinalis* eldesinde kullanılmaktadır. Kozmetik sektörüne bakıldığında saçlar için ilaç olarak kullanılmaktadır. Kabukları ateş düşürücü ve hazmettirici özellikte olmakla birlikte deri hastalıkları (sedef vb.) nın tedavisinde kullanılırken, tomurcukları eterik yağlar, c vitamini, saponinler, reçine, boyar madde (sarı) içerdiğinden lenf bezlerini çalıştırıcı etkiye sahiptir. Özsuyu idrar yolları enfeksiyonu rahatsızlıklarının tedavisinde. Yaprakları ise c vitamini, saponinler (glikozit grupları), betulinik asit, guaicol (balgam söktürücü); kabukları betulin, tanenler, flovanlar, hiperozit, gallik asit, metil salisilat ve uçucu yağ vb. maddeleri içerdiğinden idrar arttırıcı, uyarıcı, terletici, kan temizleyici olarak kullanılır. 12. yüzyılda Sainte Hildegard iyileşmeyen iç ve dış yaralar için huş ağacının çiçeklerinden faydalanılırken; 14. yüzyılda Matthiole ise böbrek ve idrar kesesi taşlarına karşı kullanılmasını tavsiye etmiştir. Bileşimindeki betulinik asitin kanser hücrelerinin büyümesini engellediği araştırmalar sayesinde görülmüştür (Nazım Tanrıkulu, 2008).

### 1.1.3. *Inonotus obliquus* (Chaga) mantarının genel özellikleri

Latin adı *Inonotus obliquus* olan ve huş ağacı gövdelerinde doğal olarak yetişen bir mantarı olan chaga mantarının, iç yüzeyi açık kahverengi-sarımtırak renkte olup; dış yüzeyi girintili çıkıntılı, yaralı gibi gözüken ve yanmış kömürü anımsatan bir yapıya sahiptir. Mikroskopik incelemelerde iç kısmında yer alan kahverengi hifler tek parça bir yapıdadır ve bu parça 2-5 ila 6-7 µm çapında bulunmaktadır. Bu mantar türü huş ağacına parazit bir mantar türüdür (Hu ve ark., 2009).



Şekil 1.1: Chaga mantarının huş ağacı gövesindeki seksüel formu (a ,b ,c), chaga çürüklüğü (d, e) (URL, 2019)

Çok yavaş büyüme gösteren ve soğuk iklim koşullarına sahip ormanlık alanlarda yetişen Chaga, Rusya başta olmak üzere İskandinavya, Kore, Japonya, Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada'nın kuzey enlemlerinde yer almaktadır. Çoğunlukla bu türe Taiga ormanlarında rastlanmaktadır (Kahlos ve ark., 1986; Hu ve ark., 2009).

Konakçı olduğu huş ağacında, ilk parazitlik başladıktan yaklaşık 20 yıl sonra ağacın yaşamsal faaliyetleri son bulmaktadır. Chaga mantarının sağlıklı ve dayanıklı ağaçlarda oluşturduğu yaralı yapı, basidiyosporlar tarafından ağacın kontaminasyonundan kaynaklanmaktadır. Diğer türlere göre nadiren karşılaşılan bu yapı, ağaç kabuğu ile öz odunu arasında ve aynı zamanda selüloz, hemiselüloz ve lignini bozunması sonucunda lifli yapısında meydana gelen beyaz çürüklüğün gelişmesi ile mantarın büyümesinde devam

etmektedir Ağacın dışında kolaylıkla hasat edilip tamamıyla yok edilmiş gibi görünse de, bu parazit mantarların gelişimi ağacın içinde devam eder ve bu nedenle aynı noktada yeniden oluşabilmektedir. Hasat edildikten yaklaşık 3 ile 10 yıl sonrasında yine eski boyutlarına ulaştığı bilinmektedir (Breitenbach J. ve ark., 1996; Bernicchia A., 2005; Lee MW. ark., 2008; 36:199–20).

Chaga, diğer mantar türleri kadar gündeme gelmemiş olsada yüzyıllar boyunca sağlık açısından faydaları bilinen ve insanlar tarafından değer verilen eski bir halk mücadelecisidir. Günümüzde Shitake (*Lentinula edode*), Reishi (*Ganoderma lucidum*), Maitake (*Grifola frondosa*) ve Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mantarları gibi ismi duyulan tıbbi mantarlar ile karşılaştırma yapılabilecek özelliklere sahiptir. Aynı zamanda Chaga, yaşayan ağaçlarda yetişen eşsiz bir polipore (katran köpüğü) mantar türü olarak da bilinmektedir (Ron Spinoso, 2006).

"Şifalı Mantarların Kralı" olarak adlandırılan Chaga; birçok kültür tarafından dünyadaki en güçlü şifa bitkilerinden biri olarak sayılabilir. Geleneksel Çin Tıbbının vazgeçilmezlerinden olup, günümüze kadar kullanılmaya devam edilmiştir. Dış hücre duvarları, sertleştirici bir madde olan kitin tarafından korunduğu için işlenmemiş durumda insanlar tarafından sindirilemez. Bu yüzden Chaga'nın tüketimi normal mantarların tüketiminden farklılık göstermektedir (Blair ve Heather, 2012).

Balta vb. kesici aletlerle ağaç gövdesinden kopartılarak hasat edilen Chaga öncelikle doğal kurutma yöntemlerinden biri olan açık havaya maruz bırakılarak kurutulur, parçalara bölündükten sonra rende vb. aletler yardımı ile ince bir toz haline getirilmesi veya özütlenmesi ile tüketilmektedir Hem sıcak su hem de alkol yöntemleri, Chaga içindeki değerli besin içeriği korunurken aynı zamanda da dış yüzeyinde bulunan kitini çözmeye yardımcı olur. Toz haline getirilerek kullanıldığında günlük yemeklerin besin değerini korumak ve güçlendirmek için çorbalara, güveçlere vb. yemeklere eklenebilir ve mantar polisakaritlerinin yüksek konsantrasyonları bu sayede muhafaza edilebilir. Chaga'nın mucizevi etkilerinden yararlanmak için bir takım ekstraksiyon yöntemlerinin kullanılmasında ayrıca önerilmiştir (Blair ve Heather, 2012).

Yapılan araştırmalar doğrultusunda bilim adamları Chaga'nın bağışıklık sistemini arttıran bir grup polisakarit olan beta-glukanlar açısından zengin bir besin kaynağı olarak vücudun ihtiyaç doğrultusunda bağışıklık sistemini düzenlemek için kullanılabileceği yönünde araştırmalara yönlendirmiştir. Bununla birlikte Chaga ekstraktlarının da diğer türlerde olduğu gibi ülseratif kolitten kaynaklanan iltihabı azaltabileceği keşfedilmiştir.

Yine bakterilerin büyümesini ve AIDS hastalığına neden olan HIV, Hepatit C virüsü ve herpes simpleks virüsü (HSV) de dahil olmak üzere çeşitli virüslere karşı anti-viral özelliklere sahip olduğu görülmüştür. Araştırmalar bununla sınırlı kalmamış ve insan sağlığını ciddi ölçüde etkileyen hastalıkların başında gelen kolon, karaciğer ve rahim ağzı kanseri vb. kanser türleri için Chaga'nın doğrudan anti-tümör özelliklerine sahip olduğunu ve kanser hücrelerinin gelişmesi ve ilerlemesini engelleyebileceği vurgulanmıştır. Ayrıca kan şekeri seviyesi ve kolesterol düşürücü, karaciğer koruyucu, antidiyabetik ve antimikrobiyal gibi aktiviteler gösteren polisakkaritleri içeriğinden dolayı besin takviyesi olarak da dünya üzerinde önemli bir yere sahiptir (Zjawiony, 2004).

Tıbbi mantar kullanımı Uzak Doğu ülkelerinin yanı sıra Batı'da yaygın olmamasına rağmen Kuzey Amerika'nın yerli halkları tarafından kullanıldığı görülmüştür. Chaga mantarı da bu türler arasında yer almıştır (Cui ve ark., 2004).



Şekil 1.2: Hasat edilmiş chaga mantarı ve güneşte kuruması (a,b) (URL, 2019)

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Kahlos ve ark. (1986) Chaga mantar türünün, soğuk kuzey iklimlerinde huş ağaçlarında yetiştiği ve 16. yy.'dan beri bu mantar sayesinde kanser hücrelerinin çeşitli türlerine karşı anti-tümör özelliklerinin bulunduğunu ve halk tarafından ilaç olarak kullanıldığını belirtmiştir.

Kahlos ve ark. (1989) Chaga mantarından elde edilen polifenolik bileşen içeren ekstraktların güçlü anti-oksidan aktivite gösterdiğini ve antioksidant etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Mizuno ve ark. (1992) Chaga mantarındaki proteininin varlığının biyolojik aktiviteler bakımından özellikle önemli olduğu vurgulanmıştır.

Wang ve ark. (1996) fenolik bileşiklerin, tek elektronlu bir aktarma mekanizması yoluyla süperoksit radikali ile reaksiyona girerek belirli bir inhibe edici aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir.

Liu ve ark. (1997) Chaga mantarında dahil olmak üzere, çeşitli bitki ve mantar türlerinin polifenolik ekstraktlarının güçlü antioksidan aktiviteye sahip oldu konusunda araştırmalar yapmıştır. Bununla birlikte, bu fenolik bileşenlerin prooksidant ve sitotoksik etkileri de literatürlerindeki ele almıştır. Çalışmalarında, *Inonotus obliquus*'un polifenolik ekstresi ile tedavi öncesi önemli bir koruyucu etki gözlenmiştir. Bu farklılık ekstre konsantrasyonu, deney tasarımı ve polifenolik bileşikler ile hidrojen peroksit arasındaki ilişki gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanabileceğinden değirmiştir.

Mizuno ve ark. (1999) polifenoller, triterpenoidler ve steroidler gibi birçok biyolojik olarak aktif metabolitlerini (ara ürün) bu mantar türünde tespit etmiş ve bu anti-viral, anti-mantar, karaciğer, anti tümör ve hipoglisemik (kan şekeri düşüşü) etkilerde dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktiviteler gösterdiğini bildirmiştir.

Babitskaia ve ark.(2000) Chaga mantarından elde edilen dört ekstre türü arasında en güçlü antioksidan aktiviteyi polifenolik ekstraktların gösterdiğini ve oksidatif strese karşı hücreleri koruyabilirliğinin üzerinde yoğunlaşmış ve güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğunu bildirilmiştir.

Ooi ve Liu (2000) mantar polisakaritlerinin doğrudan sadece kanser hücrelerine etki ettiği ve farklı bağışıklık tepkilerinin aktivasyonu yoluyla anti-tümör etkilere neden olduğu bildirmiştir.



Park ve ark. (2004) son zamanlarda Chaga mantarında polisakaritler yanında, triterpenoidler, steroidler ve ergosterol peroksitler gibi birçok polifenolik bileşiklerin antioksidan, antibakteriyel, karaciğer, trombosit agregasyonu dengeleyici ve anti-tümör etkiler de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu tespit etmiştir.

Wang ve ark. (2002) doğrudan tümörü engelleme aktivitesi, pek çok mantar polisakaritlerinde rastladığı gibi bu türde de rastladığını belgelemiştir.

Valentao ve ark. (2002) Chaga mantar ekstralarının süperoksit radikal süpürücü aktivitesinin genellikle yüksek olduğunu belirtmiş ve polifenolik bileşiklerin süperoksit radikallerini etkili bir şekilde temizleyebildiğini bildirmiştir.

Anderson ve ark. (2004) Chaga mantarının antioksidan aktivite gösterdiği ve hücreleri oksidatif strese karşı koruduğunu kanıtlamıştır. Bu bulgular, alternatif tıpta bazı kullanımlar için farmakolojik bir açıklama sağlamıştır. *Inonotus obliquus*'un kanser, kardiyovasküler hastalık ve diyabet gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde uzun süredir kullanılmakta olduğunu ve literatürlerde, bitkilerin antioksidan aktivitelerinin bu hastalıklara karşı tedavi edici etkilerinden sorumlu olduğunu daha vurgulamıştır. Böylece, Chaga mantarının etkisinin kısmen antioksidan etkisi ile ilişkili olduğunu düşünmektedir.

Cui ve ark. (2005) Chaga mantarının ekstresinde bulunan bileşiklerin her birinin nispeten kuvvetli bir antioksidan etki gösterdiğini gözlemlemiştir. Chaga mantarının ekstralarının süperoksit radikali süpürme aktivitesinde oldukça yüksek olduğunu; bununla birlikte triterpenoidler ve steroidler ekstresi, bazı serbest radikal süpürme kabiliyetleri göstermelerine rağmen, hidrojen peroksit kaynaklı oksidatif strese karşı herhangi bir koruyucu etki göstermediğini söylemiştir.

Kim ve ark. (2005) Chaga mantarı misellerinin endo-polisakaritlerin bağışıklık uyarıcı aktivite gösterdiğini ve b-lenfositler ve bağışıklık hücrelerinin vücuttaki yabancı maddelerin yutulmasında uyarılması ile ilişkili olduğunu rapor etmiştir.

Park ve ark. (2005) Chaga'nın tedavi edici etkisinin olduğunu klinik çalışmalarıyla ortaya koymuştur. Örneğin, mantar sklerotisini (sertleşmiş yapı) kaynatma yöntemleri ile toksik bir etki göstermediği, bu nedenle de kanser ve sindirim sistemi hastalıklarının tedavisinde kullanılmasının önemli olduğunu vurgulamıştır.

Kim ve ark. (2006) mantar polisakaritleri öncelikle konakçı organizmada bağışıklık sistemini güçlendirerek bir anti-tümör etki oluşturduğunu belirtmiştir.

Cha ve ark. (2006) diyabete karşı Chaga mantarının koruyucu etkilerini araştırmış ve çalışma sonucunda mantar özü başlangıçta kısa vadede hücre ya da sistem içinden gelen; dokularda biyosentez ve yıkım olaylarına karşı DNA hasarını engellemekte olduğunu ve toplam radikal tutucu antioksidan potansiyelini yüksek seviyede tetiklediğini kanıtlamıştır.

Lee ve ark. (2007) polifenollerin antioksidan aktiviteleri, DPPH radikal temizleme aktivitesi analizi, ABTS radikal temizleme aktivitesi analizi ve süperoksit radikali anyon süpürücü aktivite analizlerini üç farklı deneyle değerlendirmiştir. Polifenoller, ABTS radikal katyonu ve DPPH radikale karşı önemli bir temizleme aktivitesi sergilemiş ve süperoksit radikal anyonuna karşı orta derecede aktivite gösterdiğin ispatlamıştır. Aynı zamanda Chaga mantarının bileşiklerini bütillenmiş hidroksianisol (BHA), trolox (E vitamininin suda çözüner bir türevi) ve kafeik asit gibi sentetik antioksidanlar ile karşılaştırmıştır. Bunların her biri iyi bilinen antioksidantlar olmakla birlikte deneysel kontroller ile gözlemlenmiştir. Chaga mantarının bileşiklerinin çoğu DPPH radikal süpürücü etki testinde kafeik asit, trolux ve BHA'dan daha az aktif olduğunu belirtmiştir.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Mantar miselinin elde edilmesi

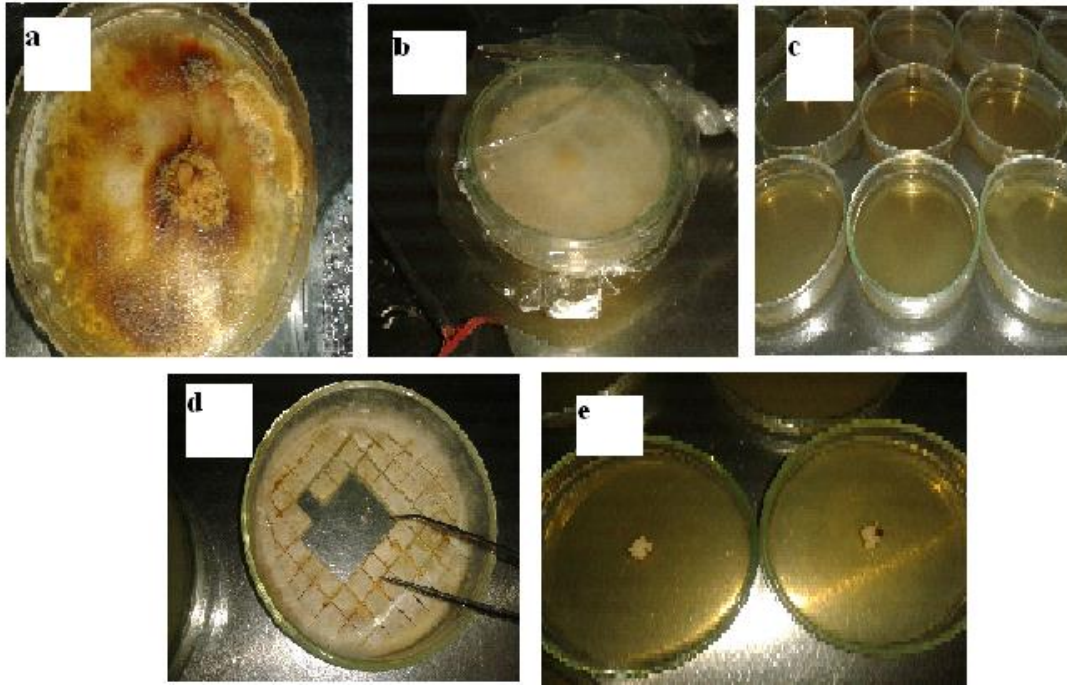
Bu çalışmada kullanılmak üzere *Inonotus obliquus* (Ach. Ex. Pers.) Plât HHB–6245–Sp/RLG–6189–T misel örneğimiz hazır olarak Amerika Birleşik Devletleri Ziraat Dairesi, Orman Ürünleri Laboratuvarı, Madison Arazi Ofisi (United States Department of Agriculture, Forest Products Laboratory, Madison Field Office)’den temin edilmiştir. Kültür ortamları için kullanılan huş talaşları ise Erzurum Orman İşletme Müdürlüğü’den temin edilmiştir.

Mantar misellerinin yetiştirilmesinde kullanılan malzemeler;

- ✓ 10 L tekkim marka teksol (etanol),
- ✓ 2 adet Merck marka malt ekstrakt agar,
- ✓ 2 adet agar-agar,
- ✓ 2 adet bek,
- ✓ 3 paket steril ameliyat eldiveni,
- ✓ 3 paket 20 numaralı bistüri ucu (neşter),
- ✓ 2 adet bistüri,
- ✓ 2 adet cımbız,
- ✓ 500’er adet 20 x 30 cm ebatlarında polipropilen poşet,
- ✓ 500’ er adet 30 x 45 cm ebatlarında polipropilen poşet,
- ✓ 250 adet 250 ml’lik kavanoz,
- ✓ 2 paket klips,
- ✓ 2 koli firatmed marka plastik petri kabı,
- ✓ 2 adet düz spatül,
- ✓ 1 paket 100-1000 µL’lik mikropipet ve uç kullanıldı.

### 3.1.2 Mantar misellerini yetiştirme

*Inonotus obliquus* (Ach. Ex. Pers. ) Plâ t mantar miselini çoğaltma için öncelikle aşılama işlemlerinin yapılacağı ortamın steril olması sağlanmıştır. Aşılama işlemi için 20 g malt-agar ve 15 g agar-agar 1 litre saf suda çözülerek besi ortamı hazırlanmıştır. Hazırlanan besin ortamı ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözeltinin homojen hale gelmesi sağlanmış ve aşılama öncesi 121°C'de 20 dakika sterilizasyona tabi tutulmuştur. Steril edilen malt-agar besi yerleri, petri kaplarına dökülerek soğumaya bırakılmıştır. Daha sonra mantar miselinden yaklaşık 1 cm<sup>2</sup> kesilerek, hazır hale gelen besi yerinin merkezine inoküle edilmiş ve 25°C'de %65 bağıl neme sahip inkubasyon odasına yerleştirilmiştir. Misel gelişmeleri gözlemlenerek kontamine olan petri ler ortandan çıkarılmış, sağlıklı petri ler tohumluk misel üretiminde kullanılmıştır ( Şekil 3.1)



Şekil 3. 1 :Olgunlaşmış mantar kültürü (a Olgunlaşmış mantar kültürü (a), misel oluşumu gözlenmiş mantar kültürü (b), kültürasyon için hazırlanmış besi ortamı petri kapları (c), aşılama öncesi misel kesimi (d), misel aşılama (e)

Misel yetiştirme ortamlarının rutubet içeriklerini ayarlamak amacıyla huş talaşları çeşme suyu ile belirli sürelerde ıslatılmıştır. Ortamlar istenilen neme ulaşmaya kadar 2 (iki) gün süre ile nemlendirilmiş, her gün talaşlar karıştırılarak homojen nem içeriğinin oluşması sağlanmıştır. Talaşlar fermante olana kadar bekletilmiştir. Fermante sonrasında alınan örnekler ile 3(üç)'er tekekrür oluşturulmuştur. Her bir poşetten 10 g örnek tartılıp 100 mL saf su eklenerek karıştırılmış,1,5 saat bekletildikten sonra yapılmıştır.pH ve Ec

değerlerinin belirlenmesi için huş talaşları otoklav öncesi ve otoklav sonrası ölçümleri(Şekil 3.2) yapılmıştır

Tohumluk misel üretimi için hazırlanan talaşlar, 250 mL'lik kavanozların içerisine nemlendirilmiş ve sterilizasyonu sağlanmış huş talaşları 121°C'de 90 dakika sterilize edilmiş ve soğutulmak üzere aşılama kabineye bırakılmıştır. Kavanozlar soğutulduktan sonra petri kaplarında steril bir bisturiye takılan neşter yardımı ile olgunlaşan misellerden yaklaşık 1 cm<sup>2</sup>'lik parçalara bölünmüş ve bu parçalar önceden hazırlanmış talaş dolu kavanozların içine inoküle edilmiştir. Aşılama kavanozlar 25±1°C'ye ayarlı inkubasyon odasına yerleştirilmiştir. Kültürler düzenli olarak kontrol edilerek kontamine olanlar ortamdaki uzaklaştırılmış ve böylelikle analizlerimizde kullanmak için hastaliksız tohumluk miseller elde edilmiştir. (Şekil 3.3)

### 3.1.3 Mantar misellerininin rutubet ve azot içeriğinin belirlenmesi

Misel yetiştirme için dikkat edilecek hususlardan biri nem içeriğidir. Hazırlanan huş talaşlarının nem içerikleri için (3 tekerrür olarak) yaş ağırlıkları belirlenmiş ve daha sonra 105°C'ye ayarlanmış etüvde sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulmuştur. Aşağıdaki verilen denklem (1.1) yardımı ile ortamların % rutubet içerikleri hesaplanmıştır.

$$\% R = ( R_2 - R_1 / R_2 ) \times 100 \dots \dots \dots (1.1)$$

Burada belirtilen;

- R<sub>1</sub>=Kuru ağırlık (g)
- R<sub>2</sub>=Yaş ağırlık (g)



Şekil 3.2 : Huş ağacı talaşı Huş ağacı talaşı nemlendirme işlemi (a), nemlendirilmiş huş talaşı (b), nemlendirme işlemi öncesi ve sonrası (c), açık havada nemlendirilmiş huş talaşları (d)

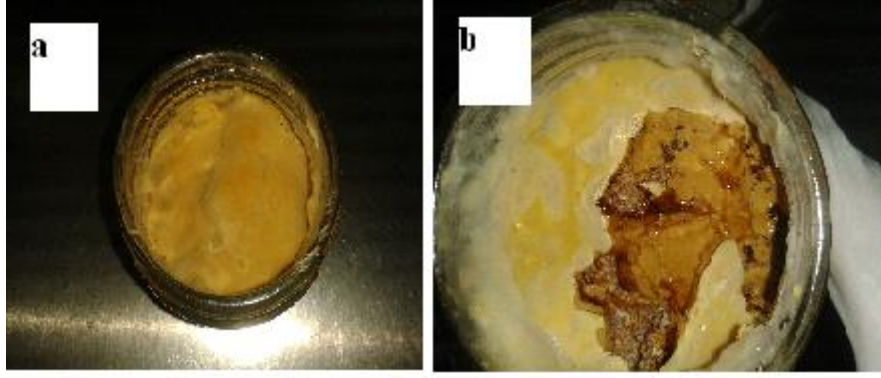
Misel oluşumu sağlanan bu kavanozlardan alınan miseller tekrar çoğaltılma işlemlerine tabi tutulmuştur. Tüm bu işlemlerin sonunda yine kavanozlar olgunlaşması için beklenmiş ve olgunlaşma evreleri gözlenmiştir.



şekil 3. 3 : Chaga mantarı ekim işlemi (a), misel oluşmuş kavanozlar (b,c),aşılama öncesi inkübasyon odası (d), kavanozlara misel ekim işlemi (e)



şekil 3. 4 : Steril odadaki aşılanmış kavanozlar



Şekil 3. 5 : Olgunlaşmış chaga mantarı (a), olgunlaşmış chaga mantarında kabuk oluşumu(b)

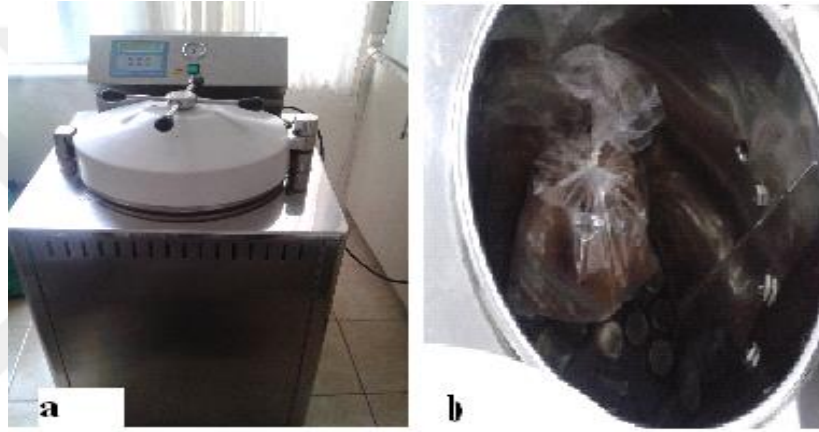
Kurutulup öğütülen mantar örneklerinde % azot tayini Kjeldahl destilasyon yöntemiyle yapılmıştır. Bu yöntemin esası  $H_2SO_4$  ile yaş yakılan örneklerin organik N'u,  $NH_4-N$  'u şekline dönüştürmek ve alkali ortamda yapılan destilasyon sonucu açığa çıkan ve borik asit içinde yakalanan  $NH_3$  miktarından numunenin toplam N içeriğini belirlemektir (Bremner, 1965). Daha sonra 100'den kül miktarı çıkarılarak elde edilen organik maddenin, %50'si karbon olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan karbon miktarının, azot miktarına oranlanması ile C:N bulunmuştur.

### 3.1.4 Sterilizasyon ve ekim

Ekim işlemlerine başlamadan önce mantar misellerimizin kontaminasyona maruz kalmaması ve ayrıca hijyenik bir ortamda çalışabilmek için, misel yetiştirilecek ortamın ve kullanılacak malzemelerin sterilizasyonu çok önemlidir. Bu bağlamda aşılama kabininin bulunduğu odanın temizliğini aşılama kabininin sterilizasyon işleminden Tekkim marka teksol (etanol) ile odanın en uç köşelerine kadar silinerek sağlanmıştır. Bistüri ucu (neşter), bistüri ve cımbız, otoklav sonrası teksol doldurulmuş bir kap içerisinde bekletilmek üzere aşılama kabine alınmıştır. Steril petri kapları ise paketi açılmadan aşılama kabine koyulmuştur. Tüm bu işlemlerin akabinde aşılama kabinin UV ışığı çalıştırılarak yarım saat oda kapalı bırakılmıştır.

Petri kaplarında misel yetiştirme için hazırlanmış besi ortamlarında steril olmasına dikkat edilmiş ve bunun için hazırlanan 250 mL'lik kavanozların  $\frac{1}{2}$ 'sini geçmeyecek şekilde besi ortamı ile doldurup ( $\frac{1}{2}$  olmasının sebebi sıcaklıktan dolayı gerçekleşecek kaynama ile besi ortamlarının kavanoz içerisinden taşmasını engellemek ) otoklavda strelize edilmiştir.

Yukarıda açıklanan şekilde hazırlanan yetiştirme ortamları daha sonra yüksek sıcaklıklara dayanıklı orta ve küçük boy olmak üzere polipropilen poşetlere, her bir poşet için  $1000\pm 20$  g ve  $700\pm 20$  g olacak şekilde  $30\pm 5$  adet doldurularak ağzları klips yardımı ile kapatıldı. Zararlı organizmaları yok etmek amacı ile  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 1.2 atü'de 90 dk otoklavda sterilize edilip ve sterilize işlemi sonrası soğumaya bırakıldı ( Şekil 3.6, Şekil 3.7 ve Şekil 3.8). Otoklavdan çıkarılan ortamlar steril kabin içerisinde, daha önce kavanozlarda gelişme sağlamış tohumluk miseller ile 1000 g polipropilen poşetler için  $20\pm 0,5$  g misel ve 700 g polipropilen poşetler için ise  $15\pm 0,5$  g misel inoküle edilerek  $25^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanmış mantar gelişim odasına alındı (Şekil 3.9, Şekil 3.10 ve Şekil 3.11).

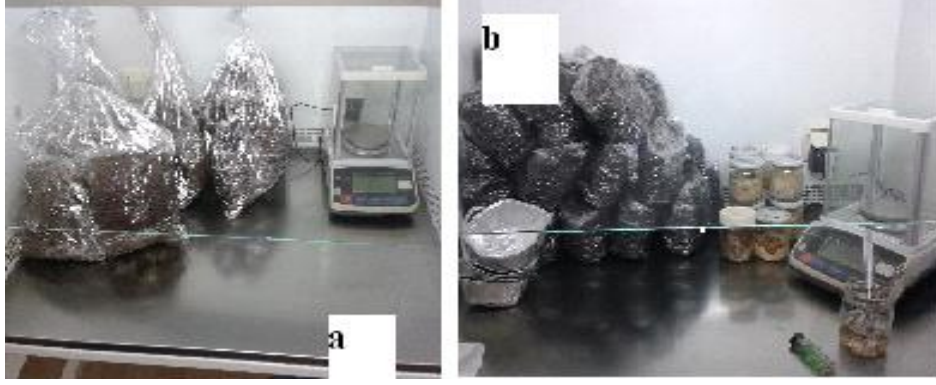


Şekil 3. 6 : Otoklav (a), malzeme sterilizasyonu (b)



Şekil 3. 7 : 20 x 30 ve 30 x 45 cm ebatlarındaki propilen poşetlerdeki talaşlar (a) ve hassas terazide ölçüm (b)





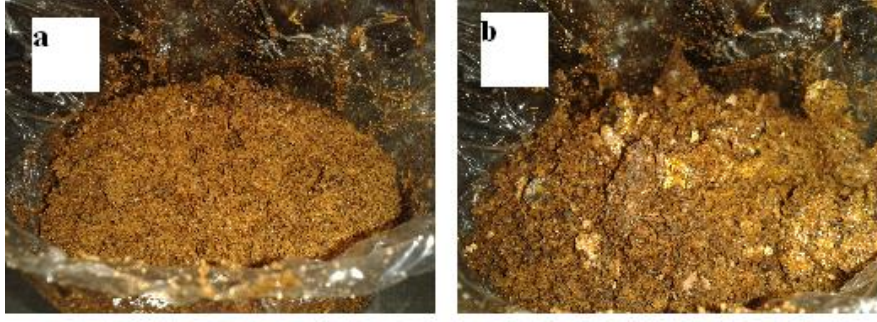
Şekil 3. 8 : Aşılama kabineine alınan propilen poşetlere kültürasyon işlemi (a,b)



Şekil 3. 9 : Chaga mantarı ve kültürasyon için hassas terazide gramaj ayarlama (a,b)



Şekil 3. 10 : Propilen poşetlere misel ekimi (a), ekim sonrası homojenlik kontrolü (b)



Şekil 3. 11 : Olgunlaşmış chaga mantarı (a), olgunlaşmış chaga mantarında kabuk oluşumu(b)

### 3.1.5 İnkubasyon ve hasat

Chaga mantarı soğuk iklimlerde çok yavaş gelişen bir tür olmasından dolayı oluşumunda soğuk şokunun olduğu düşünülmektedir. Misel sarmasını tamamlayan ortamlar +4 °C'de 10 gün soğuk şokuna tabii tutulmuştur. Şoklaması tamamlanan ortamlar üretim odasına yerleştirildi ve  $15\pm 1$  °C'de tutularak mantar oluşumu gözlemlendi (Şekil 3.12 ve Şekil 3.13).

Enfeksiyon oluşumlarına karşı inkübasyon odasının nem ve sıcaklık değerleri hergün ölçülmüştür. Üç ay sonra ortamlarda misel ve kabuk oluşumları gözlenmiş ve analiz işlemleri bunlar üzerinde yapılmıştır.



Şekil 3. 12 : Misel oluşumu için inkübasyon odasına yerleştirilmiş numuneler (a,b)



Şekil 3. 13 : İnkübasyon odasındaki misel oluşmuş numune

## 3.2 Metot

### 3.2.1.Mantar misellerinin deney için hazırlanması

Chaga örnekleri 35°C'de 5 (beş) gün boyunca deslikatör yardımı ile kurutulmuştur. Kurutulan chaga örnekleri blender ile öğütülerek toz haline getirilmiştir. Toz halindeki örnekten 25 g alınarak 250 mL çözücü ile karıştırılmıştır ve karıştırma işlemine devam edilmiştir (Örnek kütlelerinin (g) solvent kütlelerine hacmine oranı ise 1:10'dur). Ekstraksiyon işlemi 60°C kaynama noktası sıcaklığında gerçekleştirilmiştir (Ethanol gibi her çözücünün KN. standarttır. Ethanol min. 68°C, asetronitril 92°C, DW. 100°C'dir). Hazırlanan karışımlar oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Sonrasında karışım filtrelerden geçirilerek süzölmüş ve buharlaştırılmıştır. Buharlaştırma işlemi ile saflaştırılmış özüt elde edilmiştir (Badr Qader Ismael, 2018).

### 3.2.2.pH ve Ec miktarının ölçülmesi

Chaga manatarının kültürasyonu aşamasında dikkat edilecek diğer hususlardan biri de pH ve Ec değerleridir. Ec, İngilizce Electrical Conductivity (elektriksel iletkenlik) kelimelerinin baş harflerinden oluşur ve birimi mS/cm dir. Tuzların özelliklerinden biri suyun içerisinde iyonlarına ayrılarak, pozitif veya negatif yük kazanıp elektriği iletirler. Suyun içerisindeki tuz oranı arttıkça elektrik iletkenliği de nispeten artış göstermektedir. pH ise, İngilizce potential Hydrogen (Hidrojen potansiyeli) kelimelerinin baş harflerinden oluşur. Suyunun pH değeri 7 ise nötr, 7 den küçük ise asit, 7 den büyük ise alkali olduğu belirtir. Bu değerler bitki türüne, kök ortamına (toprak, torf, kayayünü vb.) ve iklim değerlerine göre farklılıklar gösterdiği de göz önünde bulundurulmalıdır (Şahgün, 2013).

Her uygulama için; huş talaşlarından etüv öncesi ve etüv sonrası olmak üzere 3 tekerrür olarak her bir poşetten 20 g örnek tartılıp 100 mL saf su eklenerek karıştırılarak 2 gün boyunca bekletildikten sonra karışımların Ec ve pH metre ile ölçümleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.14 ve Şekil 3.15).

Başlangıçta 1.Tekerrür 100,196 g; 2.Tekerrür 100,268 g; 3.Tekerrür ise 100,176 g olarak hazırlanmış ve etüve atılmıştır. pH değeri için tekerrürler etüvde 2 gün bekletilmiştir. pH değeri için etüve atılan bu tekerrürlerden 20 g numune 100 mL su ile karıştırılarak otoklavlanmıştır. 2 gün bekledikten sonra elde edilen değerler aşağıdaki Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2'de yer verildi.

Çizelge 3. 1:Örneklerin etüv öncesi ve sonrası ağırlıkları

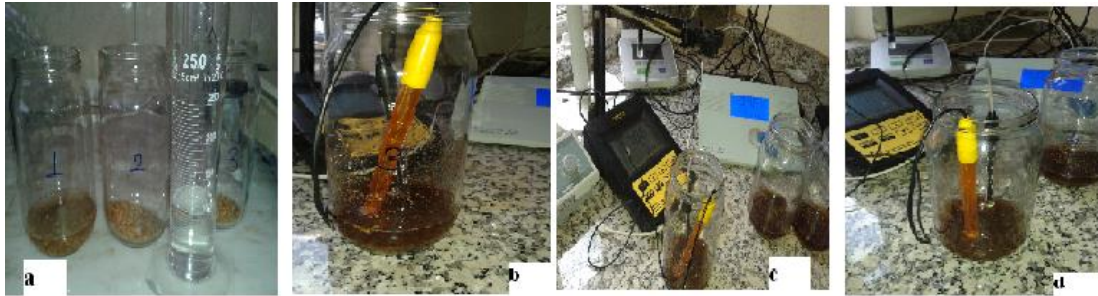
	Etüv öncesi (gr)	Etüv sonrası (gr)
1. Tekerrür	100,176	26,011
2. Tekerrür	100,268	26,254
3. Tekerrür	100,196	26,209

Çizelge 3.2: pH ve Ec değerleri (20 g örnek + 100 mL saf su)

	Otoklav Öncesi		Otoklav Sonrası	
	pH	Ec	pH	Ec
1. Tekerrür	6,89	0,7	6,06	0,7
2. Tekerrür	7,02	0,7	6,08	0,7
3. Tekerrür	6,82	0,7	6,17	0,7



Şekil 3. 14 : Etüv (a), pH ve Ec ölçüm hazırlıkları (b,c)

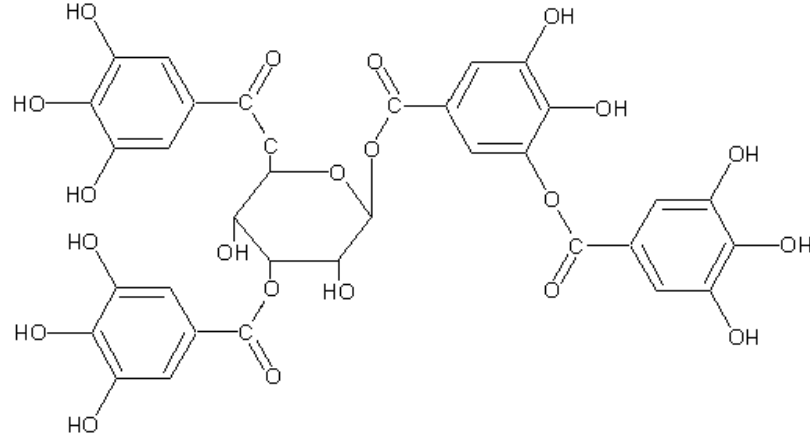


Şekil 3. 15 : pH ve Ec ölçümü

### 3.2.3. Toplam kondense tanen miktarı

Tanenlerin yapıları birbirinden farklılık göstermekle birlikte, bileşimleri gallik asit, polioksi asitler, floroglosin gibi fenol ve glikozdan oluşmaktadır. Sulu asitler ile kaynatıldıkları takdirde hidroliz olurlar. Hidroliz ürünlerinden biri m-digallik asittir. Bu

bileşik iki molekül gallik asitten meydana gelerek bir ester yapıyı oluşturarak glikozla birleşerek tannik asiti oluşturur.



Şekil 3. 16 : Tanenin molekül yapısı

Bitkisel kaynaklı olup bazı bitkilerin meyvelerinden, kapsüllerinden, kabuklarından ve köklerinden elde edilirler. Çok büyük miktarlarda moleküler ağırlığa sahiptirler. Başta deri endüstrisi olmak üzere mürekkep imalatı, kil çamuru, plastik, reçine ve yapıştırıcı yapımında, çeşitli kumaşların aprelenmesinde, mineral flatasyon, antifungal ve antivirüs madde imalatında, bira ve şarap sanayinde çökeltme maddesi olarak kullanılırlar. Bitkisel tanenler kendi aralarında hidrolize ve kondanse tanenler olmak üzere iki sınıfa ayrılır.

Hidrolize tanenler; mikrobalan, kestane, sumak, palamut, mazı ve meşe kabuklarından oluşmaktadır. Kondense tanenler ise; mimoza, .kebreko, mangrove kabukları, hemlok kabukları ve çam kabuklarıdır.

Hazırlamış olduğumuz bu tez çalışmasında, spektrofotometrede toplam kondense tanen miktarları Makkar ve ark. (1995)'a göre yapılmıştır. Dalga boyu en yüksek absorbans değerinin gözlemlendiği 580 nm olarak belirlenmiştir. Absorbans miktarlarına göre meşe örneklerinin kantitatif analizi gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon grafiği için kullandığımız standart ise mimoza taneni olarak tercih edilmiştir. Numunelerin hazırlanması için; 0,01 g referans için mimoza ve numune için huş türleri tartılarak 95 mL n-bütanol, 5 mL HCl (% 35'lik) 0,05 g Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> karışımından (reagent) oluşan tanen çözeltisinden 10 mL bir santrifüj tüpüne konularak su banyosunda 1 saat süre ile kaynayan suda bekletilmiştir. İşlem sonunda buz banyosunda hızlı soğuma işlemine maruz bırakılıp santrifüjleme işlemi gerçekleştirilerek çöktürülmüştür. Quartz küvetler içine konularak spektrofotometrede 580 nm dalga boyunda miktar analizi için absorbans değerleri

okutulmuştur. 1000 ppm (mg/kg) olarak hazırlanmış olduğumuz mimoza taneninin konsantrasyonunu 100 ppm ve altına düşürerek kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Bulunan sonuçlar tanen çözeltisi içindeki toplam kondanse tanen ağırlığı olarak hesaplanmıştır (Altuntaş ve ark., 2017).



Şekil 3. 17 : Shimadzu Uv-Vis spektrofotometre

Chaga mantarının toplam yoğunlaştırılmış tanen konsantrasyonu Çizelge 3.3'de verilmiştir. Tanenler, 500-3000 g/mol molekül ağırlığı ile suda çözünür antioksidanlardır. Tanen konsantrasyonu, Çizelge 3.4 ve Şekil 3.18'de detaylandırılan 6,25 mg/L ila 50 mg/L arasındaki konsantrasyonla standart kalibrasyon eğrisi ( $R^2=0.999$ ) kullanılarak hesaplanmıştır.

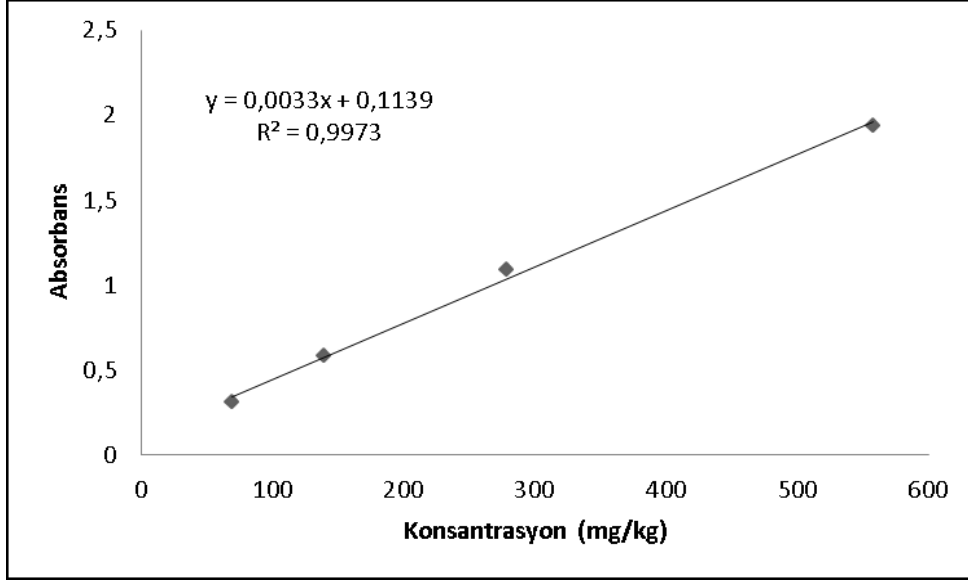
Çizelge 3.3: Toplam yoğunlaştırılmış tanen konsantrasyonu

Chaga	Yoğunlaştırılmış Tanen (mg / kg)			Ortalama	Standart Sapma	Varyasyon katsayısı (V)
	53,68	50,67	50,67			
				34,06	0,80	2.34

Üçlü ölçümden ortalama toplam yoğunlaştırılmış tanen konsantrasyonu 34,06 mg/L olmuştur. Toplam çözünen madde miktarı ise %88,5 olarak hesaplandı.

Çizelge 3. 4: Mimoza tanenein kalibrasyon standartı

Mimosa Tanen Kalibrasyonu	
Konsantrasyon (Mg / L)	Absorbans
50	0,75
25	0,365
12,5	0,179
6,75	0,094



Şekil 3. 18 : Mimoza tanen kalibrasyon eğrisi

### 3.2.4. Toplam antioksidant aktivitesinin belirlenmesi

DPPH (2-2 difenil-1-pikrilhidrazil) radikali, birkaç kararlı organik azot radikallerinden birtanesi olup, rengi koyu menekşedir ve UV-GB absorpsiyon max. 515 nm'dir. Bu method ile her bir örnek için DPPH radikalinin antioksidantlar tarafından redoks reaksiyonuna bağlı süpürme temeline dayanarak antioksidant aktivite yüzdesi (%AA) belirlenmiştir (Blois, 1958; Prior RL. ve ark., 2005).

Mantar ekstraktlarının çeşitli kısımlarından örneklerle birlikte seyreltilmiş çalışma solüsyonları (pozitif kontrol, BHT (bütillenmiş hidroksitoluen); negatif kontrol, tek başına solvent) hazırlanmıştır. Sonra çözücü ekstraksiyonlar için 0,1 mM DPPH hazırlanmıştır. Bir tüpte 3 mL'ye kadar olan çözücüler ayrı ayrı olacak şekilde sırasıyla 0,1; 0,2 ve 0,3 L karıştırılarak 1 mL DPPH eklenmiştir. Karışımlar 30 dk karanlık bir odada muhafaza edilmiş ve 30 dk sonunda absorbans UV/Görünür spektrofotometre ile 517 nm'de ölçüm gerçekleştirilmiştir (Baba ve Malik, 2015). Radikal süpürücü aktivite, DPPH radikalinin süpürme yüzdesi olarak aşağıda belirtildiği gibi hesaplanmıştır (Lu ve ark., 2014).

$$\text{DPPH radikal süpürücü aktivitesinin inhibitörü ( \% )} = \frac{A-B}{A} \times 100 \dots \dots \dots (1.2)$$

Burada;

**A** : DPPH absorbansı

**B** : Örnek ve BHT ' nin algılanışındaki absorbans

DPPH yönteminin avantajı; basit ve hızlı oluşu, doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar vermesi, yalnızca UV-GB spektrofotometresine ihtiyaç duyulup çok sayıda örnek analizi yapılmasını sağlamıştır (Fukumoto ve ark., 2016).

DPPH yalnızca organik ortamda, özellikle alkol ortamında çözülebilir ve sulu ortamda çözünme gerçekleşmez. DPPH., fenolik bileşiklerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin ölçüldükten sonra karşılaştırma yapması için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.

### 3.2.5. LC/MS/MS analizinin yapılışı

LC/MS/MS analizleri için Nexera modeli (Shimadzu, Kyoto, Japonya) kullanılmıştır. Sıvı kromatografi makinesinde LC-30AD ikili pompaları, DGU-20A3R degasser, CTO-10ASvp kolon fırını ve SIL-30AC otomatik örnekleyici vardır. Kromatografik olarak ayırma işleminde ters fazlı bir C18 tipi Inertsil ODS-4 (150 mm x 4,6mm, 3µm) analitik kolon kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 40°C'de sabitlenmiştir. Hareketli faz A'nın gradyan çözücülerinin emilsüyonu (su , 5 mM amonyum format ve %0,1 formik asit) ve hareketli faz (metanol , 5 mM amonyum format ve %0,1 formik asit) idi. Bir sonraki solvent çözücüsüne sahip olan gradyan programı t (min.), B %(0.40), (20,90), (23.99, 90), (24 ,40), (29 ,40). Çözücü akış oranı 0.5 mL/dak'da muhafaza edilmiş ve enjeksiyon hacmi 4 µL olarak ayarlanmıştır (Şekil 3.19).

Bu çalışmada, mantar materyallerinde yaygın olan 25 (yirmi beş) bileşik sayısallaştırılmıştır. Rectilinear regresyon denklemleri ve çalışılan standart bileşiklerin lineerlik değerleri verilmiştir. Mantar örneklerinin ekstraksiyonu, üç farklı çözücü ve yöntem kullanılarak yapılmıştır. Kuru filtrelenmiş malzemeler 1000 mg/L'ye seyreltilmiş ve önceden 0.2 µm mikrofiber filtre ile filtrelenmiş ve ardından LC/MS/MS analizi kullanılmıştır( Şekil 3.19).analizler sonucunda Çizelge 3.5'de kültüre edilmiş (KI) ve ticari (TI) chaga mantarına ait aminoasit değerleri verilmiştir.

Sonuçlar ise aşağıdaki formül ile hesaplanmış, elde edilen veriler ile fenolik bileşiklerin kromatografisi oluşturulmuştur (Şekil 3.20).

$$\text{Bileşik } \mu\text{g} / \text{g'nin kantifikasyonu} = \frac{X * U^f}{100} \dots\dots\dots(1.3)$$

Burada ,

- X : sonuç
- U<sup>f</sup> :% 95'teki nispi belirsizliktir





Şekil 3. 19 : : LC/MS/MS enstrümantasyon

Analizlerimizi yaparken kültüre ettiğimiz Chaga mantarının yanı sıra yurt dışından getirtmiş olduğumuz ticari chaga mantarını hem öğütülmüş olarak hem de öğütme işlemi yapılmadan alınan numuneler ile oluşturduk. Kültürasyon sonucu elde edilen chaga mantarı N harfi ile; ticari chaga mantarı ise K ve T harfleri ile gösterdiğimiz numunelerdir. K örnekler öğütülmeden ekstraksiyonu yapılanlar numuneler olup, T örnekleri ise öğütülerek ekstraksiyonu yapılanlardır numunelerdir.

K (öğütülmeyen) örnekleri;

K1-Mantar-MeOH (%10 seyreltilmiştir)

K2-Mantar-EtOH (%10 seyreltilmiştir)

K3-Mantar-Su (%10 seyreltilmiştir)

K4-Mantar-DMSO (%0,1 seyreltilmiştir)

T (öğütülen) örnekleri;

T1-Mantar-MeOH (%10 seyreltilmiştir)

T2-Mantar-EtOH (%10 seyreltilmiştir)

T3-Mantar-Su (%10 seyreltilmiştir)

T4-Mantar-DMSO (%0,1 seyreltilmiştir)

N (kültüre edilen) örnekleri;

N1-Mantar-DMSO (%0,1 Seyreltilmiştir)

N2-Mantar- EtOH (%10 Seyreltilmiştir)

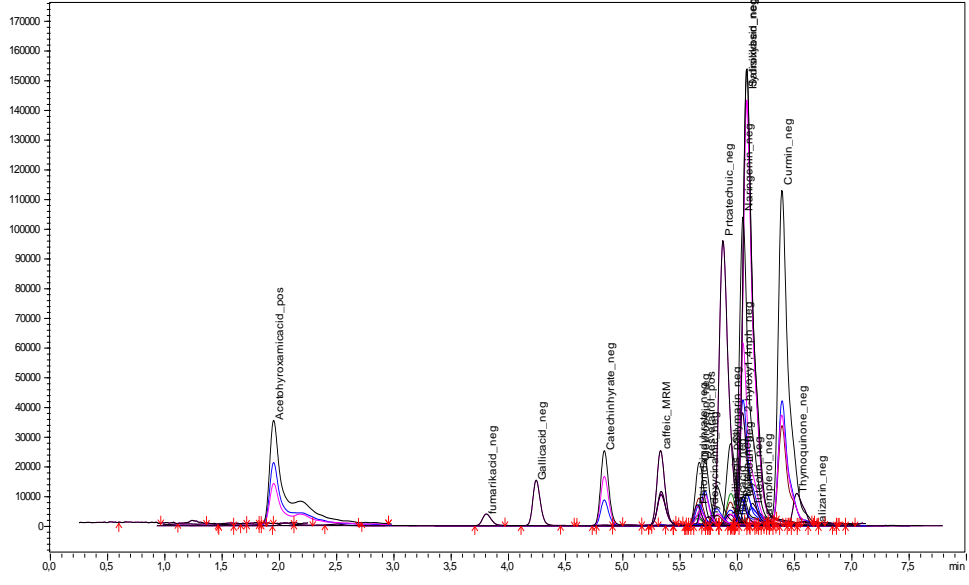
N3-Mantar- MeOH (%10 Seyreltilmiştir)

N4-Mantar-Su (%10 Seyreltilmiştir)

Çizelge 3.5.: Kültüre edilmiş (KI) ve ticari chags mantarlarının (TI) aminoasit değerleri

STANDARTLAR	İYONLAŞMA MODU	MRM	ALIKONMA SÜRESİ	DETERMİNASYON KATSAYISI (R <sup>2</sup> )	DENKLEM
Kuersetin	neg	301,1>151	6,091	0,9990363	Y=(13,7831)X+(-146,951)
Asetohidroksamik asit	pos	76,10>43,10	1,986	0,999363	Y = (150,982)X + (23,1833)
Kateşin hidrat	Neg	291,10>139,00	4,958	0,9991201	Y = (79,2933)X + (-2406,22)
Vanillik asit	pos	168,80>93,00	6,026	0,9976425	Y = (48,0522)X + (-876,904)
Resveratrol	pos	229,10>135,00	5,713	0,9978816	Y = (46,4361)X + (-1314,61)
Fumarik asit	neg	115,20>71,00	3,674	0,9989117	Y = (20,2986)X + (-762,592)
Gallik asit	neg	169,20>125,00	4,134	0,998971	Y = (65,3835)X + (-2699,84)
Kafeik	neg	179,20>135,00	5,283	0,9956162	Y = (124,785)X + (-487,132)
Phloridzin dihidrat	neg	435,00>273,10	5,646	0,9986845	Y = (33,4069)X + (-1396,90)
Oleuropein	neg	539,10>377,20	5,643	0,9989262	Y = (25,9240)X + (-558,916)
4-Hidroksisinnamik	neg	163,20>119,00	5,738	0,9949564	Y = (13,1516)X + (717,421)
Ellagik asit	neg	300,90>145,10	5,895	0,9995757	Y = (5,25903)X + (-1167,31)
Mirisetin	neg	317,10>150,90	5,858	0,9992188	Y = (37,0934)X + (2684,23)
Protokateşuik	neg	181,20>108,00	5,875	0,9943057	Y = (526,954)X + (23026,1)
Silimarin	neg	481,00>301,00	5,978	0,9947323	Y = (31,9969)X + (-1823,79)
2-Hidroksi 1 , 4naftakinon	neg	173,20>144,90	6,058	0,9971801	Y = (203,469)X + (29033,1)
Bütein	neg	271,10>135,00	6,084	0,9992028	Y = (49,3543)X + (367,917)
Narenferin	neg	271,10>150,90	6,104	0,9955044	Y = (317,241)X + (33733,3)
luteolinin	neg	285,20>132,90	6,19	0,9976786	Y = (34,6668)X + (3721,79)
Kemferol	neg	285,10>116,90	6,288	0,9993608	Y = (2,63905)X + (-206,494)
Kurkumin	neg	367,00>149,00	6,516	0,9966966	Y = (227,706)X + (-10111,1)
Timokinon	neg	164,20>149,00	6,632	0,9991933	Y = (60,4553)X + (2285,92)
alizarin	neg	239,20>210,90	6,8	0,998357	Y = (3,97487)X + (1614,23)
Hidroksibenzoik asit	neg	137,20>93,00	6,13	0,9987579	Y = (735,804)X + (-498,102)
Salisilik asit	neg	137,20>93,00	6,104	0,9989762	Y = (746,369)X + (6072,41)

Burada; RT<sup>a</sup> : Alıkonma süresi, R<sup>2</sup> : Determinasyon Katsayısı, Ionization Mode (IM) : İyonlaşma Modu



Şekil 3. 20 : Fenolik bileşiklerin kromatografisi

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Verim Tayini

Mikrodalga ekstraksiyon yöntemiyle etanol, metanol, DMSO ve su kullanılarak hazırlanan Chaga ekstraktlarının verim yüzdesi çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1: Chaga verim tayini değerleri

Ekstraksiyon	1.Örnek	2.Örnek	3.Örnek	Verim (%)	
				Ortalama	Standart Sapma
Ethanol	4	4,1	4	4	±0,48
Methanol	6	5,8	6,2	6	±0,52
DMSO	1,3	1,4	1,5	1,4	±0,42
Su	5	5,1	4,9	5	±0,38

### 4.2. DPPH Radikal Temizleyici Etkinlik

Serbest radikal 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), 517 nm’de (mor renkli) karakteristik bir soğurmaya sahiptir ve hidrojen atomu veya elektron bağışı sağlayarak radikal süpürücülere maruz kaldığında önemli ölçüde azalmıştır. 517 nm’de daha düşük bir absorban, ekstraktın daha yüksek bir radikal süpürme aktivitesini göstermiştir. Serbest radikal süpürücü, antioksidanların lipit oksidasyonunu inhibe ettiği bilinen mekanizmalardan biridir. Bu test antioksidan aktivite çalışmalarında standart bir testtir ve spesifik bileşiklerin veya ekstraktların radikal süpürme yeteneğini taramak için hızlı bir teknik sunmaktadır (Amarowicz ve ark., 2004). Bitkilerin radikal süpürücü aktiviteleri, çeşitli ekstraksiyon yöntemleri ve BHT sonuçları olan ekstraktlar Çizelge 2.2’de sunulmuştur.

Çizelge 4.2: Chaga ekstraktlarında DPPH süpürücü aktiviteleri

	DPPH Radikal Süpürücü Aktivitesi (%)					
	Ekstrak Hacmi			BHT Hacmi		
Çözücüler	0.1 mL	0.2 mL	0.3 mL	0.1 mL	0.2 mL	0.3 mL
Ethanol	91,25	90,833	87,778	54,167	51,667	53,667
DMSO	84,624	76,272	70,729	88,686	85,497	87,054

### 4.3. Toplam Yoğunlaştırılmış Tanen

Çalışmamızda hidrolize olmayan, ısıya karşı kuvvetli asitlerle ya da bazı yükseltgeyici maddelerle flobafen adı verilen çamurumsu koyu kırmızı renkli çözünmez bileşikler oluşturma özelliğine sahip kondense tanenlerden biri olan mimoza tanen kullanılmıştır.

Mimoza tanen; Güney Afrika ve Avustralya'da yetişen siyah akasya ağacının kabuklarından elde edilen tanendir. Çözeltisi %62-63 tanen içermektedir. Penetrasyonu çok hızlıdır ve doğal pH'ı 4,8'dir.

Ölçümlerimiz sonucu elde ettiğimiz Chaga Mantarındaki Yoğunlaştırılmış Tanen Miktarları verileri Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3: Chaga mantarındaki yoğunlaştırılmış tanen miktarları

	Türlerin Konsantrasyon Miktarı (ppm)					Ortalama ppm (mg/kg)	Standart Sapma/SD	Varyasyon
<i>Inonotus obliquus</i>	34,64	33,19	33,2	34,64	34,6	34,06	0,80	2,34

Toplam yoğunlaştırılmış tanen içeriğinin yüzdesi  $34,06 \pm 2,34$  mg/L olmuştur. Bu üç değer in ortalaması standart sapma ( $\pm SD$ ) olarak sunuldu. Tanenler, 500-3000 g/mol molekül ağırlığı ile suda çözünür antioksidanlardır. Tanenler sebzeler, meyveler ve tohumlar gibi bitkilerde her yerde dağılmış doğal polifenollerdir.

### 4.4. LC/MS/MS Yönteminin Analitik Parametreleri

#### 4.4.1 LC/MS/MS yöntemi ile elde edilen fenolik bileşikler

Fenolik maddeler gıda sanayiinde mikrobiyal güvenlik açısından önemli olduğu gibi, ilaç sanayiinde de antimikrobial özelliklerinden yararlanılmaktadır. Marchaim ve ark. 1995 yılında gıda ve ilaç sanayi dışında fenolik bileşiklerin, çözünür kahve üretimindeki atıkların bitki geliştirme ortamlarında ticari açıdan kullanılabilirliğini bildirdi. Yapmış olduğumuz çalışma ile bu fikri destekleyen Rouus ve ark. (1995); kahve atıklarının aynı zamanda kafein, tanenler ve polifenolik içermelerinden dolayı hayvan yemi olarak kullanılmakta olduğunu kaydetti. Değerlenen bu bulguların yanı sıra Hollman ve ark. (1996), esansiyel olmayan fenolik maddelerin aynı zamanda besin değeri düşük ve insan sağlığı üzerinde olumlu etkilerinin olduğunu destekledi.

Bilim adamlarının araştırmalarından yola çıkararak kltrasyonunu yapmış olduğumuz ve ticari olarak satın aldığımız Chaga mantarlarının fenolik içeriklerini araştırarak elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı. Kıyaslama yapabilmek için hazırlanan 20 g numuneler ile 75 ml/g H<sub>2</sub>O karıştırılıp oda sıcaklığında, çalkalanarak su banyosunda bir gece boyunca beklettikten sonra, ertesini gün numunelerimizi LC/MS/MS cihazında analiz edildi ve analiz sonuçları izelge 4.4.'de belirtildi.



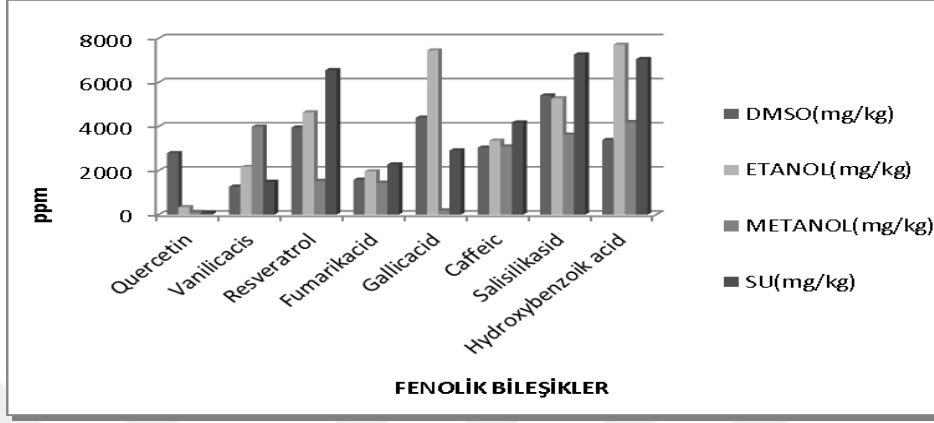
Çizelge 4.4: Ticari ve kültürel chaga mantarının analitik parametreleri:

STANDARTLAR	Kültüre Edilmiş Chaga				Öğütülmemiş Ticari Chaga				Öğütülmüş Ticari Chaga			
	N1 (µg/kg)	N2 (µg/kg)	N3 (µg/kg)	N4 (µg/kg)	K1 (µg/kg)	K2 (µg/kg)	K3 (µg/kg)	K4 (µg/kg)	T1 (µg/kg)	T2 (µg/kg)	T3 (µg/kg)	T4 (µg/kg)
Kuersetin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Asetohidroksamik Asit	0,279	0,337	0,122	0,096	ND	ND	ND	ND	0,032	ND	ND	ND
Kateşin Hidrat	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Vanillik Asit	12683,799	216,492	399,352	149,075	178,792	99,555	57,856	13874,869	109,181	142,443	110,677	19073,492
Resveratrol	3951,651	46,408	15,324	65,576	3,833	5,775	33,692	1126,479	1,608	2,303	2,249	382,758
Fumarik Asit	1,584	19,687	14,506	228,258	ND	ND	6,612	1720,518	ND	ND	5,497	1164,925
Gallik Asit	4399,375	7,448	0,193	291,641	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Kafeik	3043,019	33,565	30,960	41,806	98,528	12,049	41,444	1246,115	21,952	29,715	52,678	552,560
Phloridzin Dihidrat	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Oleuropein	ND	ND	ND	ND	ND	6,000	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4-Hidroksisinnamik	246744,400	ND	ND	10,973	6,845	5,111	5,283	972,239	ND	5,638	2,148	497,664
Ellagik Asit	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

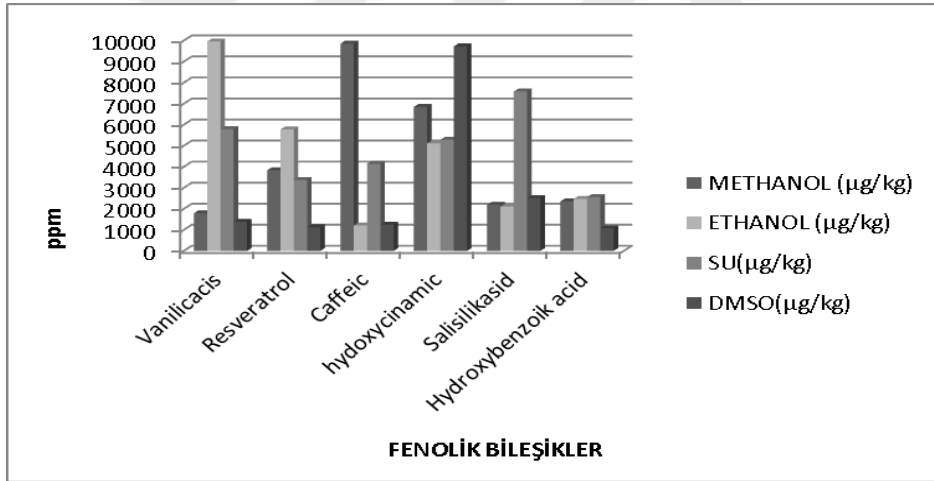
Mirisetin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Protokateşuik	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Silimarin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2-Hidroksi 1,4 naftakinon	ND	ND	ND	35,504	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Bütein	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Narenferin	5403,067	52,810	36,323	72,686	21,926	21,097	75,798	2511,633	16,574	20,716	33,651	2492,974
Luteolinin	3390,087	77,148	42,024	70,647	23,592	24,733	25,586	1069,361	32,643	7,618	10,796	10985,056
Kemferol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,785	ND
Kurkumin	ND	8,036	ND	ND	ND	ND	ND	432,862	ND	ND	ND	ND
Timokinon	28,398	3,599	ND	3,159	ND	5,210	ND	140,329	2,519	4,139	2,648	185,372
Alizarin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Hidroksibenzoik Asit	ND	36,326	24,570	ND	ND	24,301	ND	ND	ND	25,766	ND	ND
Salisilik Asit	ND	ND	31,556	ND	ND	31,394	ND	ND	ND	ND	ND	ND



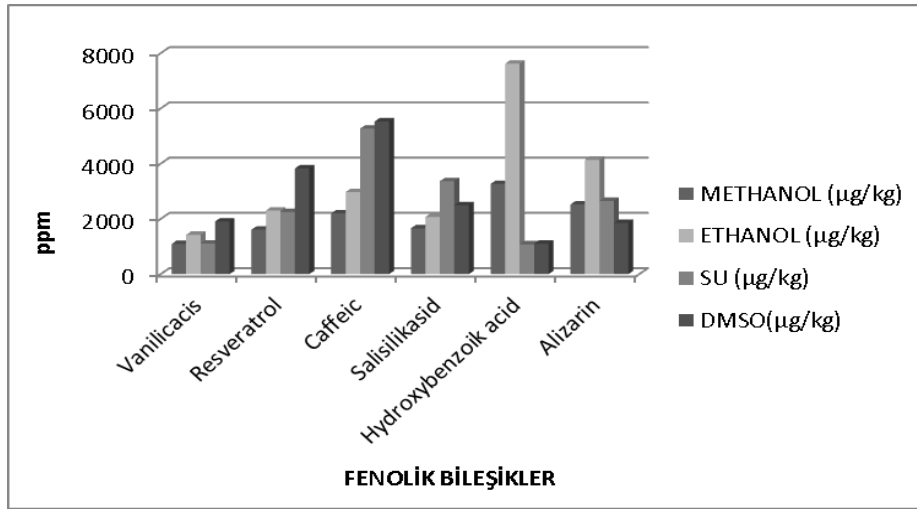
Ticari ve kültürel chaga mantarının analitik parametreleri (çizelge 4.4)'ten yararlanarak elde ettiğimiz fenolik bileşik ve oranları Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3. 'te yer almaktadır. Numuneler saf su, DMSO , etanol ve metanol den oluşan dört farklı ekstrakt çözeltileri ile hazırlanmıştır Ölçümler  $\mu\text{g}/\text{kg}$  birimi kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 4.1: Kültüre edilmiş chaga mantarı örneklerinde bulunan fenolik bileşikler ve miktarları



Şekil 4.2: Öğütülmemiş chaga mantarı örneklerinde bulunan fenolik bileşikler ve miktarları



Şekil 4.3: Öğütülmüş chaga mantarı örneklerinde bulunan fenolik bileşikler ve miktarları

Montedoro (1972) ve Roncero (1978) yapmış oldukları çalışmalarda zeytinyağında en fazla yer alan fenolik bileşiklerden kafeik, vanilik ve p-hidroksibenzoik asit tespit etmiştir.

Shahidi ve ark. (1995) siyah çayın lezzeti üzerine monomerik fenolikler; flavanoller, flavonoller, theogallein, kloregenik asit, p-kumarik asit ve kafeik asidin önemli katkısının olduğu sonucuna varmıştır.

Chen ve Ho (1997) ayçiçeğinde ve tohumlarında en fazla bulunan hidrokisinnamik asit olup bitki proteininin çözünürlüğünü oldukça fazla etkilediğini belirtmiştir.

Karakaya ve ark. (2001) fenolik bileşikler içeren bazı gıdaların antioksidan aktivitesinde kuru üzümde toplam fenolik madde miktarının 3,99 mg/g, kırmızı üzümde ise 2,21 mg/g olduğunu bildirmiştir

A. Garcia vd. (2001) ele aldığı iki farklı zeytin çeşitinden üretilen zeytinyağlarının fenolik madde miktarları; natürel zeytinyağının vanilik asit, vanilin, 4-(asetoksietil)-1,2-dihidroksibenzen ile bağlı elenolik asitin dialdehidik formu olduğunu bildirmiştir.

Sarıkaya (2005) biyolojik ve kimyasal özellikleri nedeni ile kuvvetli olan gallik asitin doğal bir antioksidan olduğundan bitkisel gıdalardan yeşil çayda yüksek oranda bulunduğunu ve çok çeşitli alanlarda kullanıldığını tespit etmiştir.

Güneş ve ark. (2005) topraktan ve tohuma yapılan uygulamalarının mısır fidelerinin kuraklık, tuz ve bor vb. streslere karşı verdikleri tepkiyi incelemişler, 0.1 ve 0.5 mm düzeyindeki topraktan yapılan ve 1 mm düzeyindeki tohuma yapılan SA uygulamalarının bahsedilen stres koşulları altında yaşayan bitkilerde besin elementi

alınımını arttırdığını buna karşılık toksik iyon alınımını azalttığını ve böylece strese karşı toleransı artırdığını bildirmişlerdir.

Aras (2006) üzüm ve üzüm ürünlerinin toplam fenolik içeriği; kırmızı üzümlerde 2,88-3,42 mg/g , beyaz çeşitlerde ise 1,87-2,22 mg/g arasında değiştiği tespit etmiştir.

Turhan ve ark. (2007) meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşiklerden yola çıkarak, andız pekmezinin diğer pekmezlere göre daha buruk bir tatda ve kuersetin, kafeik asit ve gallik asit gibi fenolik maddeler bakımından çok zengin bir kaynak olduğu belirtmiştir.

Gürbüz ve ark. (2007) Trakya, Ege, İç Anadolu ve Doğu Anadolu bölgelerinde yetiştirilen üzümlerinden yapılan şarapların Türkiye' nin önemli şarap üreticilerinden temin etmiş ve resveratrol miktarları araştırmıştır. Bu araştırmada elde edilen sonuçlar, Doğu Anadolu Bölgesinde yetiştirilmiş üzümlerden yapılan kırmızı şarapların diğer bölgelere göre daha yüksek resveratrol konsantrasyonlarına sahip olduğunu göstermiştir (2.26 mg/L).

Sakanashi ve ark. (2008) kuersetin; soğan, elma, lahana ve çayda yüksek miktarda rastlandığı bildirmiştir.

Park ve ark. (2011) kivi meyvesi içerdiği fenolik bileşik miktarı ve çeşidine göre sıralandığında 14,10-60,10 µg/g arasında değişen protokateşik asit olurken, 7,18-21,70 µg/g ile kafeik asit, 5,11-7,15 µg/g ile vanilik asit ve 2,88-4,05 µg/g ile p-kumarik asit izlediğini, bidan çeşidince ise fenolik asit içeriği diğer daha yüksek olduğunu gözlemiştir.

Önceki çalışmalardan yararlanılarak elde edilen sonuçları karşılaştırılacak olursak , hem ticari Chaga mantarı hem de kültüre ettiğimiz Chaga mantarı numunelerinin fenolik bileşik içeriklerinin diğer meyve ve sebzelere göre yüksek oranda hidroksibenzoik asite ve kafeik asit içerdiğini görmekteyiz. Onu takip eden fenolik bileşikler ise; quercetin, vanilik asit, resveratrol, fumarik asit, salisilik asit, asit, gallik asittir.

#### **4.4.2 LC/MS/MS yöntemi ile elde edilen aminoasitler**

Aminoasitler proteinlerin temel yapısal birimleridir. Biyolojik önemi açısından aminoasitler temel ve temel olmak üzere olarak ikiye ayrılır. Temel aminoasitler vücutta sentezlenemezler, zorunlu olarak besinlerle dışarıdan alınması gerekmektedir. Bu aminoasitler; lizin, lösin, izolösin, metiyonin, treonin, triptofan, fenilalanin, valin olmak üzere sekiz adettir. (Imura ve ark., 2015; Okada, 1998; Aksoy, 2000; Saldamlı, 2007). İnsan vücudunda sentezlenen aminoasitler ise alanin, arjinin, aspartik asit, sistein, sistin,

glutamik asit, glisin, histidin, prolin, hidroksiprolin, serin, trozindir (Young, 1994; Gözükara, 2001; Saldamlı, 2007; Bilişli, 2009). Amino asitlerin bu önemli görevlerinden yararlanılarak numunelerimiz içerisinde hangi amino asitlerin olduğunu tespit ederek aşağıdaki izelge 4.5’de belirtilmiştir.

Analizler doğrultusunda kültürasyonu yapılan chaga ile ticari chaga mantarlarının amino asit içeriklerini incelenmek üzere, hazırlanan numuneler teste tabi tutulmuş ve buna bağlı olarak bazı amino asitler yüksek oranlarda bulunurken, diğer amino asitler yok denecek kadar da olsa bir miktar bulunduğu kanısına varılmıştır.



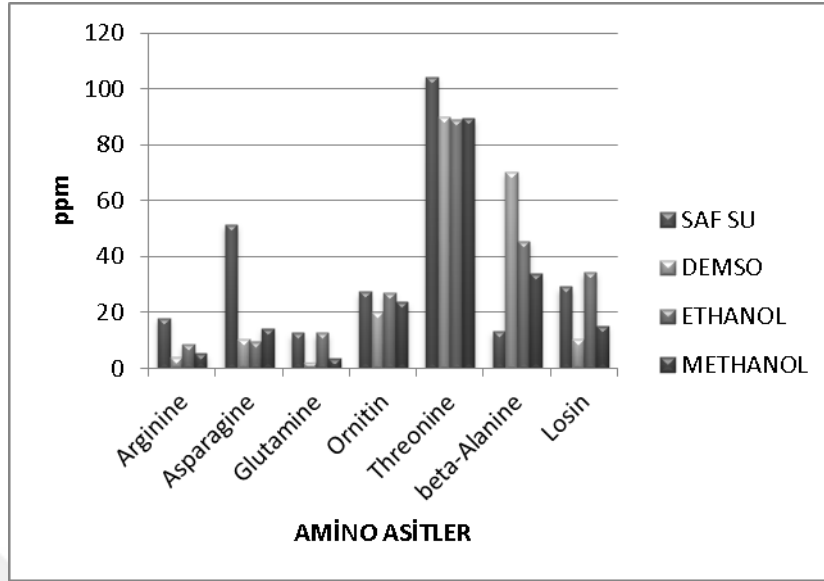
Çizelge 4. 5: Kültüre edilmiş (KI) ve ticari (TI) chaga mantarlarının amino asit içerikleri ve miktarları

NO	AMİNO ASİTLER	Kültüre Edilmiş Chaga Mantarı ( KC )				Ticari Chaga Mantarı ( TC )			
		SAF SU (mg/100mg)	DMSO (mg/100mg)	ETHANOL (mg/100mg)	METHANOL (mg/100mg)	SAF SU (mg/100mg)	DMSO (mg/100mg)	ETHANOL (mg/100mg)	METHANOL (mg/100mg)
1	1-Mhıs	0,019	ND	ND	0,002	ND	0,045	0,029	ND
2	2- Aminoadipik Asit	0,169	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	3-Mhıs	0,861	ND	1,407	0,702	ND	ND	ND	ND
5	3- Aminobütirik Asit	2,477	0,089	1,15	ND	ND	ND	ND	ND
6	4-Oh-Proline	ND	0,041	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	5- Oh-Lizin	0,939	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	Alanin	21,817	ND	ND	20,48	2,276	3,66	2,967	19,147
9	Alanin İzolösın	ND	ND	ND	ND	1	1	1	1
10	Arjinin	17,99	3,978	8,489	5,416	2,19	1,848	1,776	2,15
11	Arginin İzolösın	ND	ND	ND	ND	1	1	1	1
12	Asparagin	51,387	10,285	9,68	14,304	ND	ND	ND	ND
13	Asparagin İzolösın	ND	ND	ND	ND	1	1	1	1
14	Aspartik Asit	ND	ND	ND	ND	17,413	6,369	5,713	12,246
15	Aspertik İzolösın	ND	ND	ND	ND	1	1	1	1
16	Sitrülin	3,841	0,178	1,424	0,557	0,73	1,283	0,42	0,314
17	Sitrülin İzolösın	ND	ND	ND	ND	1	1	1	1
18	Sistin	0,579	0,439	0,238	0,603	ND	ND	ND	ND
19	Sistin İzolösın	ND	ND	ND	ND	1	1	1	1
20	Sistasyon	0,138	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
21	Glutamin	12,755	2,021	12,746	3,589	2,472	2,786	1,796	3,038
22	Glutamin İzolösın	ND	ND	ND	ND	1	1	1	1
23	Glutamik Asit	51,152	0,296	12,525	5,632	0,747	1,389	ND	ND

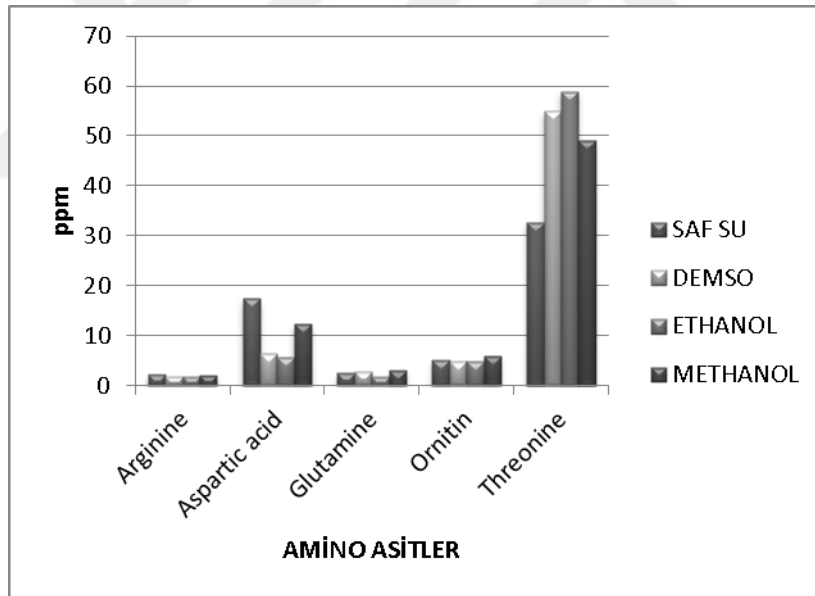
24	<b>Glutamik İzolösin</b>	ND	ND	ND	ND	1	1	1	1
25	<b>Glisin</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	102,54
26	<b>Glisin İzolösin</b>	ND	ND	ND	ND	1	1	1	1
27	<b>Homosistein</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
28	<b>Homosistein İzolösin</b>	ND	ND	ND	ND	1	1	1	1
29	<b>Histidin</b>	0,596	0,4	0,261	1,578	0,634	0,337	1,055	0,56
30	<b>3-Metil Histidin</b>	ND	ND	ND	ND	1	1	1	1
31	<b>Lizin</b>	17,207	1,347	4,303	3,87	1,08	0,967	0,473	1,013
32	<b>Lisin İzolösin</b>	ND	ND	ND	ND	1	1	1	1
33	<b>Metionin</b>	ND	ND	ND	ND	0,045	0,192	0,154	0,124
34	<b>Metiyonin İzolösin</b>	ND	ND	ND	ND	1	1	1	1
35	<b>Ornitin</b>	27,339	20,085	26,994	23,784	5,02	4,796	4,776	5,9
36	<b>Ornitin İzolösin</b>	ND	ND	ND	ND	1	1	1	1
37	<b>Fenilalanin</b>	7,523	ND	8,531	2,273	0,367	ND	0,277	ND
38	<b>Fenilalanin İzolösin</b>	ND	ND	ND	ND	1	1	1	1
39	<b>Prolin</b>	36,542	ND	123,587	10,285	0,55	1,213	0,45	1,511
40	<b>Prolin İzolösin</b>	ND	ND	ND	ND	1	1	1	1
41	<b>Serin</b>	ND	2,23	2,26	3,261	10,049	ND	2,748	ND
42	<b>Serin İzolösin</b>	ND	ND	ND	ND	1	ND	1	1
43	<b>Taurin</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
44	<b>Treonin</b>	104,301	89,809	89,034	89,705	32,726	54,93	58,868	49,123
45	<b>Treonin İzolösin</b>	ND	ND	ND	ND	1	1	1	1
46	<b>Triptofan</b>	0,192	0,158	0,57	ND	0,215	ND	ND	ND
47	<b>Triptofan İzolösin</b>	ND	ND	ND	ND	1	1	1	1
48	<b>Triozin</b>	15,229	8,674	ND	10,881	ND	ND	ND	ND
49	<b>Triozin İzolösin</b>	ND	ND	ND	ND	1	1	1	1
50	<b>Valin</b>	16,307	ND	12,667	7,272	ND	ND	ND	ND
51	<b>Valin İzolösin</b>	ND	ND	ND	ND	1	1	1	1

52	Anserin	ND	0,059	ND	ND	ND	ND	ND	ND
53	Beta-Alanin	13,38	70,435	45,582	33,834	ND	ND	10,77	62,174
54	Karnozin	ND	ND	ND	ND	0,07	ND	ND	ND
55	Etanolamin	11,906	0,574	4,463	1,045	ND	ND	ND	ND
56	Gaba	4,173	0,05	1,992	0,66	ND	ND	ND	ND
57	Homositruilin	ND	ND	ND	2,247	ND	ND	ND	ND
58	Trans-4-Oh-Proline	1,242	ND	0,598	0	ND	ND	ND	ND
59	Norvalin	0,33	0,228	0,403	0,401	ND	ND	ND	ND
60	Sarkosin	5,805	ND	11,813	3,378	ND	ND	ND	ND
61	Glutamik Asit	53,162	ND	18,048	7,42	ND	ND	ND	ND
62	Ortopospo_Sein	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
63	Orto Fosforil Etanol Amin	ND	20,088	16,908	18,08	ND	ND	ND	ND
64	Argininosüksinik Asit	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
65	Lösin_IS	ND	ND	ND	ND	1	1	1	1
66	Alanin_IS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
67	Lösin	29,107	10,439	34,481	15,246	8,218	22,177	2,067	4,204
68	İzolösin	3,68	2,026	4,126	2,361	ND	1,522	ND	ND
69	Alloizolösin	1,043	0,046	1,499	0,67	ND	ND	ND	ND

Deney için; saf su (mg/100 mg), DMSO (mg/100 mg), etanol (mg/100 mg) ve metanol (mg/100 mg)'den oluşan dört farklı ekstrakt çözeltileri ile hazırlanmıştır.



Şekil 4. 4: Kültüre Edilmiş chaga mantarı amino asit içerikleri ve miktarı



Şekil 4. 5: Ticari chaga mantarı amino asit içerikleri ve miktarı

Rendig ve Broadbent (1979) azot elementini kullanarak mısır üzerinde yaptıkları çalışmaları; triptofan, lizin, glisin, arjinin ve treonin amino asitlerin miktarında azalma gözlemlemiş; buna karşın, alanin, fenilalanin, tirozin, glutamik asit ve lösün amino asitlerde önemli miktarda artış görülmüştür.



Kyuzhalov (1996) farklı balık türlerinde alınan örnekler sonucu alanin, lizin ve glutamik asit gibi amino asitlere rastlamıştır. Bu araştırmalara örnek olarak bir yaşın altındaki sazan balıkları (*Cyprinus carpio*) ile ilgili çalışma yapmış ve çalışma sonucunda sazanlarda 13 adet amino asitin en belirgin olanlarının sistin, asparajin, glutamik asit, treonin ve alanin olduğu kaydetmiştir

Kammerer ve ark. (2004) mor havuçta fenolik asitlerden p-kumarik, kafeik asit ve ferulik asit bulundurduğunu belirtmiş. Ayrıca üç çeşit hidroksibenzoik asit türeviden görülmüştür. Kök kısmında 657 mg/kg ve konsantresinde 5815 mg/kg kafeik asit ve kinetik asidin esteri olan klorojenik asitin (5-O-kafeoilquinik asit) en baskın fenolik bileşik olduğunu tespit etmiştir

Fazlul karim ve ark. (2006) nohut üzerindeki amino asit içeriğini incelemek için belirli oranlarda potasyum naftenat ve naftalen asetik asit kullanmış ve potasyum naftenat uygulamasında izolösin, lösin, lizin, fenilalanin, ve valin, alanin, aspartik asit, glutamik asit, serin, ve tirozin amino asitlerinde miktarda önemli artış olduğunu belirtmiştir.

Losak vd. (2010) azot gübresini üre şeklinde farklı dozlarda kullanarak mısır üzerinde yaptıkları tane amino asit içeriğini araştırmalarında valin, izolösin, lösin, fenilalanin, histidin, sistein ve alanin üzerinde önemli ölçüde etkili olmuştur ve en yüksek azot kullanımında adı geçen amino asitlerin miktarında artış görülmüştür.

Elde edilen sonuçlarda hem ticari Chaga mantarı hem de kültüre edilen Chaga mantarı numunelerinde yüksek oranda treonin, lizin, glutamin, ornitin'e rastlanmıştır. Bunun yanı sıra kültüre edilen Chaga mantarında alanin, arjinin, asparajin ve b-alanin amino asitlerinin varlığından söz edilebilir.( Şekil 4.4 ve Şekil 4.5)

## 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Geçmiş yıllardan günümüze mantarlar; zengin besin değerleri ile beslenmenin önemli bir parçası olup, içerdikleri çeşitli biyoaktif bileşikler nedeniyle birçok hastalığın önlenmesi ve tedavisinde destekleyici olarak kullanılabilir. Ülkemizde kültüre alınmış mantar ve doğa mantarlarının üretimine yönelik çalışmaların bir hayli artmasına karşın, mantarların teröpatik etkileri üzerine çok az çalışma bulunmaktadır. Yurdumuzda bu konuyla ilgili bilimsel araştırmalara ihtiyaç vardır. Bu bilimsel çıktılar ışığında tıbbi mantarların üretim ve tüketimin artırılması, halkın bu konuda bilinçlendirilmesi gerekmektedir. Fenolik maddeler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluşturduklarından dolayı bir maddenin antioksidan etki yönünden kuvvetliliği içerdiği fenolik madde miktarına da bağlı ve fenolik bileşiklerin serbest radikalleri süpürücü etkisi nedeniyle antioksidan özelliğinde önemli bir role sahip olduğu bir çok araştırmada vurgulanmıştır Bizde yapmış olduğumuz bu çalışma ile; kültüre edilmiş Chaga mantarının fenolik içeriği üzerine araştırma yaparak tıbbi mantar olarak kullanımını yaygınlaştırmayı amaçlanmıştır. Chaga mantarı yüzyıllar boyunca sağlığa olan faydalarından dolayı birçok kültür tarafından dünyadaki en güçlü şifalı mantarlarından biri olarak kabul edilmiştir.

Yapılan çalışma sonunda ortaya çıkan veriler doğrultusunda, kültüre etmiş olduğumuz mantarın LC/MS/MS cihazında analizi ile birçok fenolik bileşiklere rastlanmış ve bunlar; kateşhin hidrat, kuersetin, asethohidrosinamik asit, vanilik asit, resveratrol, fumarik asit, gallik acid, kafeik, phloridzin dihidrat, oleuropen, hidroksisinamik asit, ellagik asit, mirisetin, silimarin, kurmin, narinjinin, kemferol, salisilik asit, hidroksi benzoik asit, bütein, luteolin, alizarin, thymoquinone, protokateşuik asit, etil ester, hidroksi 1,4naftokinon olmak üzere 25 adet bileşik değeri elde edildi. Fenolik bileşiklerin yanı sıra elde edilen amino asit ve proteinler ise; 2-aminodipik asit, 3-amino-izobütirik asit, 4-oh-proline, 5-oh-lizin, alanin, arjinin, asparagin, sitrin, sistine, sistasyon, glutamin, glisin, homosistin, histidin, lizin, metionin, ornitin, fenilalanin, prolin, serin, taurin, threonin, triptofan, triozin, valin, anserine, beta-alanin, karnosin, ethanolamin, gaba, homositrulin, trans-4-oh-proline, norvalin, sarkozin, glutamikasit, ortofosfoserin, arjinin süksinik asit, lözin, izolösin, alloizolösin, ortofosforitetanolamin ve bunların izomerleridir.

Chaga mantarı ile ilgili yeni çalışmaların yapılarak antibakteriyel, antifungal, antienflamatuar özellikleri araştırılabilir.

## KAYNAKLAR

- Akalın, A. C., 2011. Nar Şaraplarında Antioksidan Fenolik Bileşiklerin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 57s.
- Altınışık, M., 2006. Protein Ve Amino Asit Metabolizması, 89-1-19. <https://www.mustafaaltinisik.org.uk>
- Babitskaya, V.G., V.V. Shcherba, and N.V. Lkonnikova, 2000. Melanin complex of the fungus *Inonotus obliquus*. *Applied Biochemistry and Microbiology* 36: 377–381.
- Baytop, A., Bitkilerin Bilimsel Adlarındaki Niteleyiciler ve Anlamları, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, No: 3889, İstanbul 294s. (1995).
- Breene W. M. 1990. Nutritional and Medicinal Value of Specialty Mushrooms, *Journal of Food Protection*: Vol. 53, No. 10, 883-894s.
- Blair & Heather, 2012 Organic Wild Harvested Chaga Mushrooms since URL (erişim tarihi: 11.06.2018) [www.annandachaga.com](http://www.annandachaga.com)
- Cui Y., Kim D.S., Park K.C., 2005. Antioxidant effect of *Inonotus obliquus*. *Journal of Ethnopharmacology, Korea.* 4;96(1-2):79-85.
- Chen, H., X. Lu, Z. Qu, Z. Wang, and L. Zhang, 2010. Glycosidase inhibitory activity and antioxidant properties of a polysaccharide from the mushroom *Inonotus obliquus*. *Journal of Food Biochemistry*. 34: 178–191.
- Choi, S.Y., Hur, S.J, An, C.S., Jeon, Y.H., Jeoung, Y.J., Bak, J.P., Lim., B.O., 2010. Anti- Inflammatory effects of *Inonotus obliquus* in colitis induced by dextran sodium sulfate. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* Article ID 943516: 1–5.
- Chung, M.J., C.K. Chung, Y. Jeong, and S.S. Ham, 2010. Anticancer activity of subfractions containing pure compounds of Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) extract in human cancer cells and in Balbc/c mice bearing Sarcoma-180 cells. *Nutrition Research and Practice* 4: 177–182.
- Chang S.T., Buswell J.A., 1996. Mushroom nutraceuticals. *World Journal of Microbial Biotechnology* 12, 473-476.
- Chanda,S., Rakholiya ,K., Dholakia K., Baravalia, Y., 2013. January. Antimicrobial, antioxidant, and synergistic properties of two nutraceutical plants: *Terminalia catappa* L. and *Colocasia esculenta* L.. <http://journals.tubitak.gov.tr/biology>
- Demir, M.S., 2007. Çeşitli Makrofunguslara Ait Fruktifikasyon, Vejetatif Misel Ve Eksopolisakkaritlerin Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Çalışmalar ,Yüksek

- Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir. 77s.
- Dr. Sibel Karakaya, Yrd. Doc. Dr. Sedef Nehir E L.; 1997. Flavonoidler Ve Sağlık Beslenme Ve Diyet Dergisi / J Nutr and Diet , İzmir, Cilt:26(2): 54-60s.
- Duman H., Doğan H.H., Ateş A., 2007. *Morchella conica* (Pers.) Boudier ve *Suillus luteus* (L.) S. F. Gray Makrofunguslarının Antimikrobiyal Aktiviteleri SÜ Fen Ed. Fak. Fen Derg, 22: 19- 24. <https://www.academia.edu/20307448/>
- Dülger, B., Şen, F. ve Gücin, F., 1999b. *Russula delica* Fr. Makrofungusunun Antimikrobiyal Aktivitesi. Tr. Journal of Biology, 23, 127–133.
- Elliott ,T. F., Stephenson S. L.,2018. Mushrooms of the Southeast,ISBN 13:978-1-60469-730-8, China, 389 s.
- Escop, 2015. The Scientific Foundation For Herbal Medicinal Products Europeam Medicines Agency Monograph: European Union Herbal Monograph On *Betula Pendula* Roth And/Or *Betula Pubescens* Ehrh. As Well As Hybrids Of Both Species, <https://www.ema.europa>
- Fidanbaş, Z.U.C., Bilgin, Ş., Ertan, Ö.O., 2016.Ağustos. Bazı Deniz Balıklarının Aminoasit - Yağ Asiti İçerikleri Ve Beslenme Açısından Önemi, <http://edergi.sdu.edu.tr/index.php/esufd/>
- Güven, M., Güler, S., Daşdemir, İ.,1995. Erzurum Ve Erzincan Yöreleri İçin Huş (*Betula Pendula* L.) Orijin Denemesinin Altı Yıllık Sonuçları.. Doğu Akdeniz Ormancılık Araştırma Enstitüsü,Doa Dergisi Sayı:8.
- Hu H, Zhang Z, Lei Z, Yang Y,Sugiura N. Comparative study of antioxidant activity and antiproliferative effect of hot water and ethanol extracts from the mushroom *Inonotus obliquus*, Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Japan.305-8572(2009)
- Ismael, B. Q. I., 2018. Characterization Of Various Iraqi Medicinal Plant Root Extracts And Their Antifungal Activities On Human Pathogenic Fungi, Doktora Tezi Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi,Fen Bilimleri Enstitüsü,Kahramanmaraş. 369s.
- Illana-Esteban, C., 2011.Interés Medicinal Del “Chaga” (*Inonotus obliquus*) Bol. Soc. Micol. Madrid 35: 175-185.
- Kim, H.-G., D.-H. Yoon, C.-H. Kim, B. Shrestha, W.-C. Chang, S.-Y. Lim, W.-H. Lee, S.-G. Han, J.-O Lee, M.-H. Lim, G.-Y. Kim, S. Choi, W.O Song, J.-M. Sung, K.-C.

- Hwang, T.-W. Kim, 2007. Ethanol extract of *Inonotus obliquus* inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells. *Journal of Medicinal Food* 10: 80–89.
- Kim, J. Y., Byeon, S. E., Lee, Y. G., Lee, J. Y., Park, J., Hong, E. K., & Cho, J. Y. 2008. Immunostimulatory activities of polysaccharides from liquid culture of pine-mushroom *Tricholoma matsutake*. *J Microbiol Biotechnol*, 18(1), 95-103.
- Kim, Y.J., J. Park, B.S. Min, and S.H. Shim, 2011. Chemical Constituents from the sclerotia of *Inonotus obliquus*. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 54: 287–294
- Kahlos K, Kangas L, Hiltunen R., Antitumor activity of triterpenes in *Inonotus obliquus*., Division of Pharmacognosy, University of Helsinki, Finland. *Planta Med.* Dec;(6):554.(1986)
- Kahlos, K., Lesnau, A., Lange, W., Lindequist, U. 1996. Preliminary Tests Of Antiviral Activity Of Two *Inonotus Obliquus* Strains, Milano. Volume:67, Issue:4, Page:344-347.
- Kim, Y.O., Park, HW, Kim, J.H., Lee, J.Y., Moon S.H., Shin C.S., 2006. Anti-Cancer Effect And Structural Characterization Of Endo-Polysaccharide From Cultivated Mycelia Of *Inonotus Obliquus*. *Korea*. 30;79(1):72-80.
- Lee M.W., Hur H, Chang K.C., Lee TS, Ka K.H., Jankovsky L., 2008. Introduction to Distribution and Ecology of Sterile Conks of *Inonotus obliquus*, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea., *Korea*. Dec;36(4):199-202.
- Lee, I.K., Kim, Y.S., Jang, Y.W., Jung, J.Y, Yun B.S., 2007. New Antioxidant Polyphenols From The Medicinal Mushroom *Inonotus Obliquus*, *Research Support, Non-U.S.* 17(24):6678-6681
- Lee, S.H., H.S. Hwang, and J.W. Yun, 2009. Antitumor activity of water extract of a mushroom, *Inonotus obliquus*, against HT-29 human colon cancer cells. *Phytotherapy Research*, online publication by Wiley Interscience, DOI: 10.1002/ptr.
- Lu, X., H. Chen, P. Dong, and X. Zhang, 2010. Phytochemical characteristics and hypoglycaemic activity of fraction from mushroom *Inonotus obliquus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90: 276–80.
- Marley, G., 2009. *Mushrooms for Health: Medicinal Secrets of Northeastern Fungi*. Down East, Camden, ME.

- Mu, H., A. Zhang, W. Zhang, G. Cui, S. Wang, and J. Duan, 2012. Antioxidative Properties of Crude Polysaccharides from *Inonotus obliquus*. *International Journal of Molecular Sciences* 13: 9194–9206.
- Manzi, P., Gambelli, L., Marconi, S., Vivanti, V., Pizzoferrato, L. 1999. Nutrients In Edible Mushrooms: An Inter-Species Comparative Study, *Food Chemistry* 65 477-482 (1999).
- Najafzadeh M, Reynolds PD, Baumgartner A, Jerwood D, Anderson D. .2007 *Biofactors; Division of Biomedical Sciences ,Volume:31 Issue: 3-4, UK., 191-200s.*
- Pilz, D., 2004. Chaga and Other Fungal Resources, Assessment of Sustainable Commercial Harvesting in Khabarovsk and Primorsky Krai, Russia, *Forestry Applications of Mycology* 541.753.6209, 53s.
- Shibnev, V.A., D.V. Mishin, T.M. Garaev, N.P. Finogenova, A.G. Botikov, and P.G. Deryabin, 2011. Antiviral activity of *Inonotus obliquus* fungus extract towards infection caused by hepatitis C virus in cell cultures. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 151: 612-614.
- Seo, H.K., Lee S.C., 2010 January . Antioxidant Activity of Subcritical Water Extracts from Chaga Mushroom (*Inonotus obliquus*), *Separation Science and Technology Separation Science and Technology, Volume 45, 2010 -Issue 2,* <https://doi.org/10.1080/01496390903423899>
- Seung, Y. L., Hasnat, M. A., Debnath, T., Pervin M., Park, S.R., Kim, D.H., Kweon, H. J., Kim, J.M., Lim, B.O., Chaga Mushroom (*Inonotus obliquus*) Grown on Germinated Brown Rice Suppresses Inflammation Associated with Colitis in Mice .*Food Sci. Biotechnol. Korea.* 21(5): 1235-1241.
- Solak M.H., Kalmıç E., Sağlam H., Kalyoncu F., 2006. Antimicrobial activity of two wild mushrooms *Clitocybe alexandri* (Gill.) Konr. and *Rhizopogon roseolus* (Corda) T.M. Fries collected from Turkey. *Phytother. Res., Muğla,* 20: 1085–1087.
- Tanrıku, N.,2008. ;Anadolunun Şifalı Ağaçları, Huş Ağacı Ve Chaga Mantarı. *Anadolunun Şifalı Ağaçları Yazı Dizisi.* <http://www.nazimtanrikulu.com>
- Yorulmaz, A., Tekin, A., 2008. Zeytin Ve Zeytinyağı Fenolikleri, I.Ulusal Zeytin Öğrenci Kongresi yayını,Balıkesir.s.24-31
- Youn, M.-J., J.-K. Kim, S.-Y. Park, Y. Kim, S.-J. Kim, J.S. Lee, K.Y. Chai, H.-J. Kim, M.-X. Cui, H.S. So, K.-Y. Kim, R. Park, 2008. Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*)

induces G0/G1 arrest and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *World Journal of Gastroenterology* 14: 511–517.

Zheng, W. F., Liu, T., Xiang, X. Y., Gu, Q., 2007. Sterol composition in field-grown and cultured mycelia of *Inonotus obliquus*, *Chineses Pharmaceutical Association*, ISSN:0513-4870, England, 750-756s.

Zheng, W.F., Zhao, Y.X., Zhang, M.M., Yin Z.J., Chen, C.F., Wei Z.W., 2008. Phenolic Compounds From *Inonotus Obliquus* And Their Immune-Stimulating Effects, *Key Laboratory For Biotechnology On Medicinal Plants Of Jiangsu Province, China*. 27(4): 574-581



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı, soyadı : NAZAN KOCA  
Uyruğu : T.C.  
Doğum tarihi ve yeri : 27 / 12 / 1989 - ERZURUM  
Medeni hali : BEKAR  
Telefon : 0543 952 28 89  
Faks :  
e-posta : [nznkc46601@gmail.com](mailto:nznkc46601@gmail.com)  
[nznkc\\_174@hotmail.com](mailto:nznkc_174@hotmail.com)

### Eğitim

<u>Derece</u>	<u>Eğitim Birimi</u>	<u>Mezuniyet Tarihi</u>
Lise	Karabük Cumhuriyet Lisesi	2006
Lisans	Bartın Üniversitesi Orman End. Müh.	2014

### İş deneyimi

<u>Yıl</u>	<u>Yer</u>	<u>Görev</u>
2011	.....Starwood Orman Ürünleri Aş	Stajyer Müh.
2013	.....Kastamonu Sfc Orman Ür. A.Ş.	Stajyer Müh.
2016	Şahanlar Ahşap Kuy. İnş. San. Ve Tic. Ltd. Şti.	Proje Müh.
2017	Şahanlar Ahşap Kuy. İnş. San. Ve Tic. Ltd. Şti.	Satın Alma Müd.
2018	Şahanlar Ahşap Kuy. İnş. San. Ve Tic. Ltd. Şti.	..Personel Müd.

### Yabancı dil

İngilizce (Pre-Intermediate Level)

### Yayınlar

### Hobiler

Kitap okumak ,bilim kurgu ve tarihi filmler izlemek, gezmek.