

**CERRENA UNICOLOR (Bull.) Murrill TARAFINDAN  
EKSOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU**

**Burcu ALTINAY**

**YÜKSEK LİSANS**

**Biyoloji Anabilim Dalı  
Eylül 2008**

**OPTIMIZATION OF EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCTION  
BY CERRENA UNICOLOR (Bull.) Murrill**

**Burcu ALTINAY**

**Master of Science Thesis  
Department of Biology**

**Eylül 2008**

**CERRENA UNICOLOR (Bull.) Murrill TARAFINDAN  
EKSOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU**

**Burcu ALTINAY**

**Eskişehir Osmangazi Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Lisansüstü yönetmeliği Uyarınca  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Genel Biyoloji Bilim Dalında  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır.**

**Danışman: Yrd. Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ**

**EYLÜL 2008**

## ONAY

Genel Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Burcu ALTINAY'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “*Cerrena unicolor* Tarafından EPS Üretiminin Optimizasyonu” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

**Danışman** : Yrd. Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ

**İkinci Danışman** : -

**Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:**

**Üye** : Yrd. Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ

**Üye** : Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU

**Üye** : Yrd. Doç. Dr. Ahmet ÇABUK

**Üye** : Yrd. Doç. Dr. Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ

**Üye** : Arş. Gör. Dr. Sevil PİLATİN

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

## CERRENA UNICOLOR (Bull.) Murrill TARAFINDAN EKSOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU

Burcu ALTINAY

### ÖZET

Bu çalışmada *Cerrena unicolor* D 30 izolatının eksopolisakkarit (EPS) üretimi için optimum koşullar belirlenmiştir.

Bu kapsamda izolat tarafından EPS üretimine besiyerinde bulunan farklı karbon, azot, mineral kaynakları gibi besinsel etkenlerin yanı sıra, pH ve sıcaklık gibi çevresel koşulların etkisi de araştırılmıştır. Ayrıca karbon ve azot kaynaklarının miktarı da araştırılmıştır. Kullanılan inokülantın yaş ve miktarının EPS üretimine etkisi, çalışmanın diğer bir alt başlığıdır.

Besiyerinde 8 tip farklı karbon kaynağı (fruktoz, glikoz, ksiloz, sukroz, galaktoz, maltoz, mannoz, arabinoz), 13 tip farklı azot kaynağı (üre, mikolojik pepton, pepton casein, amonyum sülfat, amonyum sitrat, amonyum nitrat, amonyum klorid, NaNO<sub>3</sub>, beef extract powder, pepton, amonyum hidrojen fosfat, KNO<sub>3</sub>), karbon ve azot kaynaklarının 5' er farklı konsantrasyonu (% 1-5), 6 tip farklı mineral kaynağı (Ca, Fe, Zn, Mn, Na, K) kullanılmıştır.

Çalışma sonunda, *Cerrena unicolor* D 30 izolatının optimum olarak 30 ° C' de geliştiği ve pH 5.5' te en yüksek EPS üretim değerini verdiği görülmüştür. Çalışma sonucunda karbon kaynağı olarak % 5 oranında sukroz, azot kaynağı olarak % 5 oranında mikolojik pepton, mineral tuzlardan Ca ve Fe içeren besin ortamlarının bu izolat tarafından EPS üretimini en fazla desteklediği değerlendirilmektedir. Üretim ortamına aktarılacak inokülantın optimum yaş ve miktarı ise, 4 gün ve % 5 olarak belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Eksopolisakkarit, *Cerrena unicolor*

**OPTIMIZATION OF EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCTION  
BY *CERRENA UNICOLOR* (Bull.) Murrill**

**Burcu ALTINAY**

**SUMMARY**

In this study, optimum conditions for *Cerrena unicolor* D 30 isolate for Exopolysaccharide (EPS) production, are defined.

In this context, along with the nutritional agents such as; different carbon, nitrogen and mineral sources, which are based media by isolate for EPS production and also like pH and temperature the environmental conditions' effects are also researched. Besides, the quantity of carbon and nitrogen sources are also researched. Another subtitle of this research is; the effect of the used inoculants age and quantity to EPS production.

In media 8 different type carbon sources (fructose, glucose, xylose, galactose, maltose, mannose, arabinose ), 13 type nitrogen sources (urea, mycological peptone, pepton from casein, ammonium sulphate, ammonium citrate, ammonium nitrate, ammonium chloride, NaNO<sub>3</sub>, beef extract powder, peptone, ammonium hydrogen phosphate, KNO<sub>3</sub>) 5 different combinations each of carbon and nitrogen, sources %1-5, 6 different type of mineral sources (Ca, Fe, Zn, Mn, Na, K) are used.

At the end of the study, it is observed that; *Cerrena unicolor* D 30 isolate develops optimum at 30 °C and gives highest EPS production value at pH 5.5.

At the end of the research; it is observed that nutrition environments which includes %5 sucrose as a carbon source, %5 mycological peptone, Ca, and Fe as a mineral salt by this isolate, supports EPS production most. Optimum age and quantity of the inoculate; which will transfer to the production environment designed as 4 days and % 5.

**Key words:** Exopolysaccharide, *Cerrena unicolor*

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince hiçbir zaman desteğini benden esirgemeyen ve değerli bilgileriyle çalışmama yön veren danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ'a sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim.

Çalışmalarım boyunca maddi ve manevi desteğini bana hissettiren hocalarım Dr. Hakan ŞENTÜRK, Yrd. Doç. Dr. Ahmet ÇABUK, Dr. Gökhan BAYRAMOĞLU, Dr. Sevil PİLATİN, Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU ve Dr. İsmühan POTOĞLU ERKARA' ya yardımlarından ötürü teşekkür ederim.

Çalışmamın deneysel sürecinde sonsuz iyilik anlayışıyla beni yalnız bırakmayan ve her yönden göstermiş oldukları ilgi için Ayşe Betül KARADUMAN, Nagehan TEKNECİ, Anıl HAN' a deneylerime ellerinden geldiğince katılan diğer bütün çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ayrıca desteğini her zaman yanında hissettiğim Aytuğ AKKOR' a teşekkür ederim.

Son olarak hayatımın başlangıcından bugüne gelmemi sağlayan, benden hiçbir şekilde desteğini esirgemeyen ve her ne olursa olsun sosuz hoşgörü ve özverileriyle hep yanımda olan, bütün başarılarımın mimarı sevgili annem, babam ve kardeşime teşekkürü borç bilirim.

Burcu ALTINAY

## İÇİNDEKİLER

Sayfa No

<b>ÖZET</b> .....	<b>v</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>vi</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>vii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>1.GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Polisakkaritler.....	4
1.1.1. Bakteriyal Polisakkaritler ve Genel Özellikleri.....	5
1.1.2. Fungal polisakkaritler.....	6
1.1.2.1. Schizophyllan ve Scleroglukan.....	7
1.1.2.2. Lentinan.....	8
1.1.2.3. Grifon-D (GD).....	9
1.1.2.4. Krestin (PSK), Polisakkaropeptid (PSP) ve Coriolan.....	10
1.2. Makrofungusların Ürettiği Eksopolisakkaritler ve Kullanım Alanları.....	10
1.3. <i>Cerrena unicolor</i> ile Daha Önce Yapılmış Çalışmalar.....	11
1.3.1. <i>Cerrena unicolor</i> (D 30)' un hipoglisemik aktivitesi üzerine yapılan çalışma.....	12
<b>2. MATERYAL VE METODLAR</b> .....	<b>14</b>
2.1. Materyal.....	14
2.1.1. Makrofungus İzolatı.....	14
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri.....	16
2.2. Yöntemler.....	17
2.2.1. Makrofunguslardan Misel Eldesi ve Saklanması.....	17
2.2.2. Kültürel Yöntemler.....	17
2.2.3.1. Farklı sıcaklık değerlerinin <i>Cerrena unicolor</i> D 30 izolatının gelişimine etkisi.....	18
2.2.3.2. Farklı pH Değerlerinin <i>Cerrena unicolor</i> D 30 Tarafından EPS Üretimine Etkisi.....	19



## İÇİNDEKİLER(devam)

### Sayfa No

2.2.3.3. Karbon kaynağı tipinin <i>Cerrena unicolor</i> D 30 tarafından EPS üretimine etkisi.....	19
2.2.3.4. Azot kaynağı tipinin <i>Cerrena unicolor</i> D 30 tarafından EPS üretimine etkisi.....	19
2.2.3.5. Mineral madde tipinin <i>Cerrena unicolor</i> D 30 tarafından EPS üretimine etkisi.....	19
2.2.3.6. İnokulant yaşı ve yüzdesinin <i>Cerrena unicolor</i> D 30 tarafından EPS üretimine etkisi.....	19
2.3. Analitik Yöntemler.....	20
2.3.1. Eksopolisakkarit (EPS) üretiminin hesaplanması.....	20
2.3.2. Kuru hücre ağırlıklarının hesaplanması.....	21
2.3.3. pH ölçümü.....	21
<b>3. BULGULAR.....</b>	<b>22</b>
3.1. Farklı Sıcaklık Değerlerinin <i>Cerrena unicolor</i> D 30 Tarafından EPS Üretimine Etkisi.....	22
3.2. Farklı pH Değerlerinin <i>Cerrena unicolor</i> D 30 Tarafından EPS Üretimine Etkisi.....	24
3.3. Karbon Kaynağı Tipinin <i>Cerrena unicolor</i> D 30 Tarafından EPS Üretimine Etkisi.....	25
3.4. Karbon Kaynağı Miktarının <i>Cerrena unicolor</i> D 30 Tarafından EPS Üretimine Etkisi.....	27
3.5. Azot Kaynağı Tipinin <i>Cerrena Unicolor</i> D 30 Tarafından EPS Üretimine Etkisi.....	29
3.6. Azot Kaynağı Miktarının <i>Cerrena unicolor</i> D 30 Tarafından EPS Üretimine Etkisi.....	30
3.7. Mineral Madde Tipinin <i>Cerrena unicolor</i> D 30 Tarafından EPS Üretimine Etkisi.....	32
3.8. İnokulant Yaşı ve Yüzdesinin <i>Cerrena unicolor</i> D 30 Tarafından EPS Üretimine Etkisi.....	33

**İÇİNDEKİLER(devam)****Sayfa No**

<b>4.TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>36</b>
4.1. Farklı Sıcaklık Değerlerinin <i>Cerrena unicolor</i> D 30 İzolatının Gelişimine Etkisi.....	36
4.2. Farklı pH Değerlerinin EPS Üretimine Etkisi.....	37
4.3. Farklı Karbon Kaynaklarının EPS Üretimine Etkisi.....	38
4.3.1. Karbon kaynağı (sukroz) yüzdesinin EPS üretimine etkisi.....	39
4.4. Azot Kaynağı Tipinin EPS Üretimine Etkisi.....	40
4.4.1. Azot kaynağı (mikolojik pepton) yüzdesinin EPS üretimine etkisi.....	41
4.5. Mineral Madde Tipinin EPS Üretimine Etkisi.....	42
4.6. İnokulant Yaşı ve Yüzdesinin EPS Üretimine Etkisi.....	43
4.7. Sonuç.....	43
<b>KAYNAKÇA.....</b>	<b>45</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil2.1. <i>Cerrena unicolor</i> mantarının morfolojik görüntüsü.....	15
Şekil2.2. Araştırma parametrelerini belirlemek için kullanılan kültür sıvısı.....	18
Şekil2.3.Filtre kağıdı yardımı ile pelet ve süzüntü olarak ayrılan sıvı besiyeri.....	20
Şekil 3.1. Farklı sıcaklık değerlerinin <i>Cerrena unicolor</i> D 30 tarafından EPS üretimine etkisi.....	23
Şekil 3.2. Başlangıç pH değerinin <i>Cerrena unicolor</i> D 30 tarafından EPS üretimine etkisi.....	25
Şekil 3.3. Karbon kaynağı tipinin <i>Cerrena unicolor</i> D 30 tarafından EPS üretimine etkisi.....	27
Şekil 3.4. Karbon kaynağı miktarının <i>Cerrena unicolor</i> D 30 tarafından EPS üretimine etkisi.....	28
Şekil 3.5 Azot kaynağı miktarının <i>Cerrena Unicolor</i> D 30 tarafından EPS üretimine etkisi.....	30
Şekil3.6. Azot kaynağı miktarının <i>Cerrena unicolor</i> D 30 tarafından EPS üretimine etkisi.....	31
Şekil 3.7. Mineral kaynağı tipinin <i>Cerrena unicolor</i> D 30 tarafından EPS üretimine etkisi.....	33
Şekil 3.8. İnokulant yaşı ve miktarının <i>Cerrena unicolor</i> D 30 tarafından EPS üretimine etkisi.....	35

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa No

Çizelge:1.1 STZ ve <i>Cerrena unicolor</i> ile kontrol grubu farelerinin başlangıç ve final vücut ağırlıkları.....	12
Çizelge:1.2 STZ ve <i>Cerrena unicolor</i> ile kontrol grubu farelerinin başlangıç ve final vücut ağırlıkları.....	13
Çizelge 3.1. Farklı Sıcaklık Değerlerinin <i>Cerrena unicolor</i> D 30 İzolatının Gelişimine Etkisi.....	22
Çizelge 3.2. Farklı pH değerinin <i>Cerrena unicolor</i> D 30 tarafından EPS üretimine etkisi.....	24
Çizelge3.3.Karbon kaynağı tipinin <i>Cerrena unicolor</i> D 30 tarafından EPS üretimine Etkisi.....	26
Çizelge 3.4. Karbon kaynağı miktarının <i>Cerrena unicolor</i> D 30 tarafından EPS üretimine etkisi.....	28
Çizelge 3.5. Azot kaynağı tipinin <i>Cerrena unicolor</i> D 30 tarafından EPS üretimine etkisi .....	29
Çizelge 3.6. Azot kaynağı miktarının <i>Cerrena unicolor</i> D 30 tarafından EPS üretimine etkisi.....	31
Çizelge 3.7. Mineral kaynağı tipinin <i>Cerrena unicolor</i> D 30 tarafından EPS üretimine etkisi.....	32
Çizelge 3.8. İnokulant yaşı ve miktarının <i>Cerrena unicolor</i> D 30 tarafından EPS üretimine etkisi.....	34

## 1.GİRİŞ

Dünya nüfusunun giderek artması, beslenme ve sağlıkla ilgili sorunları da artırmıştır. Günümüzde bilim ve teknolojiye büyük ilerlemelere rağmen, doğal kaynakların bilinçsizce tüketimi ve karşılaşılan ekonomik güçlükler, doğal kaynakların çok amaçlı kullanılmasını zorunlu kılmıştır. Diğer taraftan enfeksiyon hastalıklarıyla mücadelede bugüne kadar geliştirilen doğal ve sentetik antibiyotiklerin, mikropların direnç kazanmaları sonucu etkisiz kalmaları ve çeşitli yan etkilerinin bulunması nedeniyle tıp bilimi yeni ve değişik antimikrobiyal maddeler keşfetmek için doğaya yönelmiştir. Doğal kaynaklar bakımından oldukça zengin olan ülkemizde sahip olduğumuz en önemli değerlerden birisi de halkımızın tükettiği doğal bir besin durumunda olan makrofunguslardır. Ülkemizde makrofungus biyotasına yönelik yeterli düzeyde araştırma olmasına karşın, makrofungusların medikal etkileri üzerine çok az araştırma bulunmaktadır. Makrofunguslar mükemmel besin değerleri yanında, çeşitli hastalıkların tedavisindeki medikal özellikleriyle de el üstünde tutulurlar. Başta yenilebilen türler olmak üzere birçok makrofungus türünün çeşitli ülkelerde halk ilacı olarak kullanıldığına dair bilgilere değişik kaynaklarda rastlamak mümkündür. Yapılan çeşitli araştırmalarla makrofungusların antibakteriyal, antiviral, antifungal, antiprotozoal, antitümör ve daha başka etkilere sahip maddeler içerdikleri tespit edilmiştir. Makrofunguslarda antimikrobiyal aktiviteden sorumlu bileşiklerin en iyi belirlenen grubu poliasetilenlerdir. Bu antimikrobiyal maddelerden 50' den fazlasının *Aleurodiscus*, *Clitocybe*, *Daedalea*, *Marasmius*, *Merulius*, *Pleurotus*, *Polyporus*, *Poria*, *Psathyrella* ve *Tricholoma* cinslerinin bir veya birkaç türünde bulunduğu belirlenmiştir. Fenolik bileşikler, purinler, pirimidinler, kuinonlar, terpenoidler ve fenil propanoid türevleri makrofunguslardan izole edilen diğer antimikrobiyal maddelerdir. Kalvasin, volvotoksin, flammütoksin, lentinan ve porisin denilen maddelerin ise, makrofunguslardan izole edilen antitümör ve antiviral etkili bileşikler olduğu bildirilmiştir (Duman vd., 2003).

Ülkemizde makrofungus florasına yönelik çalışmaların bir hayli artmasına karşın makrofungusların medikal etkileri üzerine çok az çalışma bulunmaktadır.

Doğada bolca yetişmekte olan makrofunguslar, son dönemlerde insanlar tarafından çokça tüketilen faydalı doğal ürünler olmakla beraber biyolojik aktiviteye sahip bileşikler içermektedirler. Özellikle Asya ülkeleri, sıvı besiyerlerinde üretilen polisakkarit karakterdeki metabolitlerin tıbbi açıdan çok değerli olduğunu kavramışlar ve bu konuya büyük ilgi duymaya başlamışlardır. Buna rağmen, fungal polisakkaritlerle ilgili çalışma ve yayın eksikliği bir çok bilim adamı tarafından vurgulanmaktadır (Fang vd., 2002).

Funguslar spor üreten, klorofil taşımamaları nedeniyle besinleri absorbe eden, genellikle hem eşeyli hem de eşeysiz olarak çoğalan, hif olarak bilinen ipliksi, dallanmış somatik yapıya sahip ve tipik olarak hücre duvarı bulunduran ökaryotik organizmalardır. Funguslar ilgili sistematik çalışmalar 250 yıl önce başlamış olmasına karşın bunların insanların hayatında uzun yıllardan beri yer aldığı bilinmektedir. Funguslar; fermantasyon yapmaları, orman ekosistemlerinde ayrıştırıcı olarak rol oynamaları, tıbbi önemi olan bileşiklerin ve pek çok ticari kimyasal maddenin üretilmesinde kullanılmaları nedeniyle ekolojik, ekonomik ve tıbbi bakımdan önemli organizma grubundan birini oluşturmaktadır. Ayrıca, funguslar insanlarda, hayvan ve bitkilerde önemli hastalıklara sebep olurlar (Ocak vd., 2007).

Besleyici değerlerine ek olarak pek çok yenilebilen mantar türünün uzun zamandan beri dünyanın birçok ülkesinde tıbbi amaçlarda da kullanıldığı bilinmektedir. Ayrıca pek çok yenilemeyen ve zehirli mantar türlerinin de önemli tıbbi özelliklerinin olduğu saptanmıştır. Mantarların immünolojik ve antikanser özelliklerinin yanı sıra antioksidan, antihipertensif, kolesterol düşürücü, karaciğer koruyucu, antifibrotik, antiinflamasyon, antidiyabetik, antiviral ve antimikrobiyal etkilerinin olduğu bilinmektedir (Demirhan vd., 2007)

Günümüzde pek çok hastalığın tedavisinde sentetik ilaçlar kullanılmaktadır. Oysa son yıllarda, yan etkilerinin olmaması ya da bertaraf edilebilecek kadar az olması nedeniyle doğal kaynaklı preparatlar tercih edilmektedir. Uzun zamandan beri bu amaçla kullanılan kaynaklardan biri de makrofunguslardır. Makrofungusların halk tıbbındaki kullanımlarına ilişkin ilk kayıtlar, eski Roma ve Yunan medeniyetlerine dek uzanmaktadır. Mantarın tıbbi öneminden ilk olarak bahseden, M.Ö. 400-470 yıllarında yaşamış olan Hipokrat' tır (Gücin, 1983). Birçok ülkede özellikle Çin ve Japonya gibi

Uzak Doğu ülkelerinde bazı makrofungusların çeşitli hastalıklara karşı halk ilacı olarak kullanıldığı bilinmektedir (Mizuno vd., 1990). Bazı türlerin de Çin halkı tarafından diüretik ve laksatif olarak kullanıldığı ve eczanelerde satıldığı rapor edilmektedir (Tamer vd., 1990). Ağaoğlu ve arkadaşları (1991), 1600' lü yıllarda Çin' de Wu-Shui isimli bir doktorun mantarı ilaç olarak kullandığını belirtmişlerdir (Günay, 1995).

Literatür incelemeleri sonucunda, tıbbi amaçlarla kullanılan makrofungusların daha çok yenilebilen türler olduğu anlaşılmaktadır. Bu tip makrofunguslar ile yapılan çalışmalar, mantarların tıbbi açıdan; antitümör, antimikrobiyal, hipoglisemik, hipolipidemik, karaciğeri koruyucu, antialerjik ve bağışıklık sistemini güçlendirici etki mekanizmalarının olduğunu göstermektedir (Espenshade ve Griffith, 1966; Benedict ve Brady, 1972; Anke 1989; Bobek vd., 1991; Wang vd., 1995; Kiho vd., 1996; Kim vd., 2002; Suay vd., 2000; Hatvani, 2001; Byung-Keun vd., 2002; Wasser, 2002; Yang vd., 2002; Gao vd., 2005; Lindequist vd., 2005).

Makrofungusların antimikrobiyal etkilerine, fungal yapıda sentezlenen ve ekseriyetle organizmaya has bazı fenolik bileşikler, purinler, pirimidinler, kuinonlar, terpenoidler ve fenil proponoid türevi antagonistik maddeler neden olmaktadır. Antitümoral etki gösteren en önemli maddeler ise kalvasin, volvotoksin, flammutoksin, lentinan ve porisin denilen yalnızca makrofunguslardan izole edilmiş maddeler olup aynı zamanda antiviral bileşiklerdir (Dülger,1999).

Makrofungusların antibiyotik üretim potansiyelini tespit etmek için yapılan ilk çalışmalarda Anchel, Hervey ve Wilkins (1941), 2000 den fazla fungal türün karpofor ve miseli ile çalışmış ve bunların önemli kısmında aktivite belirlemiş (Rosa vd., 2003), bu süreçte basidiomiset orjinli ilk antibiyotiğin geliştirilmesine kaynak olan pleuromutilin izole ve identifiye edilmiştir (Kavanagh vd., 1950). Son zamanlarda da makrofungusların antimikrobiyal aktivitelerine ilişkin çalışmalar süregitmektedir (Suay vd., 2000; Rosa vd., 2003; Zjawiony, 2004).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, makrofungusların ürettikleri ve büyüme ortamına salgıladıkları eksopolisakkaritlerin bir çok biyolojik aktiviteye sahip olduklarını göstermektedir ( Mizuno vd., 1990; Ng, 1998; Yang vd., 2002; Ding vd., 2004). Tümü makrofunguslar tarafından üretilen ve antitümör aktiviteye sahip lentinan (Chihara vd., 1970), schizopyllan (Tabata vd., 1981) ve krestin (Ng, 1998) ticari olarak üretimi ve satışı yapılan fungal eksopolisakkaritlerdir.

Mantarlarla ilgili yapılan son çalışmalarda, birçok biyolojik aktivitelerinin, antitümoral aktivitelerinin, hipoglisemik aktivitelerinin olduğu belirtilmiştir (Kim vd.,2001). Mantarlar yemek ve biyofarmasötikal olarak ilgi çekici özelliklerinin yanı sıra; hepatit, hiper tansiyon, hiper kolesterol ve kanser gibi birçok hastalıkta da kullanılmaktadır (Kim vd.,2001). Son günlerde mikrobiyal polisakkaritlerin geniş ölçekte endüstriyel olarak üretilerek kullanımları da kabul edilmiştir (Hwang vd.,2002).

Çok önemli potansiyele sahip olduğu görülen eksopolisakkarit üretimi konusunda, çalışılan makrofungus sayısı oldukça azdır. Sonuç olarak, Dünya çapında makrofungusların yapay besi ortamlarında kültüre alınmaları ve eksopolisakkarit üretim potansiyellerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların eksikliği hissedilmekte olduğu gibi ülkemizde şimdiye dek bu konuda yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

### **1.1 Polisakkaritler**

Polisakkaritler monosakkarit polimerlerinin birbirlerine glikozidik zincirlerle bağlanmalarıyla oluşmaktadırlar. Bazen kovalent zincirler ve aralarında pek çok çift karbon atomlarından meydana gelmektedir. Bu moleküllerin yapısı oldukça karmaşıktır. (Daba ve Ezereonye, 2003).

Birçok prokaryotik mikroorganizma hücre yüzeylerine cıvık ya da yapışkan materyal salgılayabilir. Birçok farklı polisakkarit ve birçok proteinden meydana gelen bu yapılar kapsül ve “slime layer” (cıvık tabaka) olarak isimlendirilir. Daha genel bir terim olarak, “glikokaliks” terimi de kullanılmaktadır. Glikokaliks, hücre dışında polisakkarit içeren materyal olarak isimlendirilir (Brock ve Madigan, 1994).

Doğada yaygın olarak bulunan polisakkaritler, yapı bakımından farklı makromoleküllerden oluşmaktadırlar. Monosakkarit polimerlerinin artıkları olan ve tekrarlayan birimler içeren birbirinden farklı proteinler ve nükleik asitler birbirlerine glikozidik bağlarla bağlanır. Polisakkaritler makromoleküller arasında biyolojik potansiyeli en yüksek olanlardır. Çünkü yapısal değişkenlik bakımından mükemmel bir potansiyele sahiptirler. Nükleotidlerdeki, nükleik asitler ve proteindeki aminoasitler birbirine sadece tek bir yolla bağlanabilirken oligosakkaritlerdeki monosakkarit üniteleri ve polisakkaritler çok sayıda farklı formlarda bağlardan ya da düz yapılardan oluşmaktadırlar. Polisakkaritler aynı zamanda ikincil yapıları, şeker artıklarının



konformasyonundan ya da moleküller inter ve intra-hidrojen zincir bağlarından oluşmaktadır. Örneğin, farklı dört monomer şeker 35560' a kadar değişik permütasyon oluşturarak tetrasakkaritler ile eşsiz bir şekilde bağlanabilirken, buna karşın dört aminoasit sadece 24 farklı permütasyon ile birbirine bağlanabilir. Polisakkarit yapılarındaki bu müthiş değişkenlik potansiyeli yüksek organizmalardaki çeşitli hücre-hücre interaksiyonlarını kusursuz düzenleyici mekanizma için gerekli olan esnekliği sağlamaktadır (Ooi ve Liu, 2000).

### **1.1.1. Bakteriyal polisakkaritler ve genel özellikleri**

Mikroorganizmalar intraselüler (depo) polisakkaritler, ekstraselüler (EPS) polisakkaritler, ve yapısal formdaki polisakkaritler olmak üzere 3 ayrı polisakkarit türü sentezlemektedirler. EPS formları hücre duvarı ile birleşmiş olabilen kapsüller veya büyük miktarlarda hücre duvarı dışında biriken ve kültür ortamına yayılan bağımsız salgılar olarak üretilen yapılardır (Yılmaz ve ark., 2007).

Bakteriyel EPS' ler genellikle immunojeniktirler. İn vitro çalışmalarda EPS' lerin varlığı katı besi ortamlarında mukoid koloni, sıvı besi ortamlarında ise oldukça viskoz bir görünüm ile tespit edilmektedir (Yılmaz ve ark.,2007).

Bakterinin dış yüzeyini kaplayan EPS kapsül veya slim formda olabilir. Kapsüller EPS bakteri hücre yüzeyindeki fosfolipid veya lipid-A moleküllerine kovalent bağ ile bağlanmaktadır. EPS' ler suda çözünen polimerlerdir ve doğada iyonik ya da iyonik olmayan yapılarda bulunabilirler (Yılmaz ve ark., 2007).

EPS' ler glikozid bağları ile birbirine bağlı olan şeker ünitelerinden oluşmaktadır. Bakteriyel EPS' lerin çoğunluğu düzenli oligosakkaridlerin tekrarlanan birimlerinden oluşmuş heteropolisakkarid yapıda, bazı bakteriyel EPS' ler ise tek tip şekerden meydana gelen bir homopolisakkarid yapıdadır. EPS' yi oluşturan homopolisakkaridlerin çoğunluğu nötr olmasına rağmen bir çok bakteriyel EPS negatif yük taşır ve yüksek kütleyle sahiptir. Ayrıca polisakkaridler hidrofilik özellik taşımakla birlikte çoğu polimerler lipofilik, hidrofilik ve biyofilm yapısında olabilen heterojenlerdir (Yılmaz ve ark., 2007).

EPS üretiminden sorumlu genler kromozomal veya plasmid DNA kodlu olabilir. EPS üretimini düzenlenmesi oldukça komplekstir ve hem pozitif hem de negatif regülatörler içermektedir. Bu regülatörlerden bazıları global regülatörlerdir. Bunlar hücre dışı enzimler gibi diğer hücre metabolizmalarının sentezini de düzenlemektedir. Ozmolarite ve dehidrasyon gibi dış uyarıların etkisiyle EPS üretimi etkilenmektedir (Yılmaz ve ark., 2007).

EPS' ler bakterinin olumsuz çevre şartlarından korunmasını ve çeşitli yüzeylere tutunmasını sağlamaktadır. Polisakkaritler, üretici suşlar tarafından katabolize edilemediklerinden enerji kaynağı değildirler, buna karşılık mikroorganizmayı veya ortamı kurumaya karşı korur, zararlı veya düşman bir ortamdan uzaklaştırır. EPS, bakteriyi koruyucu bir örtü şeklinde sarmakta ve olası tehlikelere karşı onları korumaktadır. EPS' nin bakteriyi koruma özelliği ayrıca antibiyotiklere karşıda fiziksel bir koruyuculuk şeklinde de ortaya çıkmaktadır. Ortamdaki metalik iyonların tutulmasını sağlarlar ayrıca bitki, insan ve hayvan patojenlerinin ürettikleri EPS' lerin virulans faktörler oldukları da bilinmektedir. Aynı zamanda bitkilerle bakteriler arasında bir etkileşim aracıdır. Sonuç olarak yüksek moleküler yapıya sahip EPS şekli koloninin direncini ve kararlılığını ortaya koymaktadır (Yılmaz ve ark., 2007).

Polisakkaropeptidlerin ürettikleri enzimler serbest radikalleri ve oksidatif zararlarını azaltmak için faydalı olabilirler. Ekstrasellüler ve intrasellüler polisakkaropeptidlerin her ikisi de immün sistemi güçlendirmeye yardımcı olabilirler. Polisakkaropeptidler biyolojik yanıt değiştiriciler olarak geleneksel tedavilerde tanımlanmıştır. Elde edilen kanıtlar belirli zaman aralıklarında belirli dozlarda verilen polisakkaropeptidlerin toksik olmadığını göstermiştir (Cui ve Chisti 2002).

### **1.1.2.Fungal Polisakkaritler**

Geçtiğimiz on sene boyunca mikroorganizmaların özellikle de mantarların ürettiği polisakkaritler çok dikkat çekmiştir. Bunun başlıca sebebi de, bağışıklığı güçlendirici, antitümör, ve hipolipidemik aktivite gösteren değişik biyolojik ve farmakolojik aktiviteye sahip olmalarıdır. *Lentinus edodes* tarafından Lentinan, *Schizophyllum commune* tarafından Schizophyllan ve *Trametes versicolor* tarafından üretilen Krestin ticari değere sahiptir (Hwang vd., 2003).

### 1.1.2.1. Schizophyllan ve Scleroglukan

Skleroglukan, fungal bir eksopolisakkarittir. Kurdlana benzer ve tahminen her ana zincirin üçüncü glikozuna (1,3)-a bağlı D-glikoz artıklarının bağlanmasından oluşmaktadır. Moleküler ağırlığı yaklaşık olarak  $5-6 \times 10^6$  daltondur (Sutherland, 1994).

Bir Basidiomycetes türü olan *Schizophyllum commune* Schizophyllan, *Sclerotium rolfii* ise Scleroglukan üretmektedir (Rau, 2004). Bu polimer; suda eriyebilen, yüksek stabilite sahip yapışkan halde bulunan;  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-glukanıdır (Maziero vd., 1999). Labrotuvar ortamında besiyerlerine inokule edilen *Schizophyllum commune* ve *Sclerotium rolfii*'den Schizophyllan ile Scleroglukan üretirken besiyerindeki değişimler gözlemlenmiştir. Besiyerlerindeki miseller kuvvetli şekilde çalkalanarak geliştirilmiş olan Schizophyllan ve Scleroglukan üretilirken besiyerindeki azot azalarak sıfır değerine yaklaştığında bu metabolitlerin üretimi de azalmakta hatta sabit faza geçmektedir. Her iki mantarda farklı miktarda kompleks azot kaynağı içeren yeast ekstrakt besiyerine ihtiyaç duymaktadır. *Sclerotium rolfii* yeast ekstrakttaki az konsantasyondaki azotu kullandığında da scleroglukan üretebilmektedir. Çalkalamalı biyoreaktör kullanılarak geliştirilen misel pelletlerindeki gelişim azalırken, hücre duvarından elde edilen serbest  $\beta$ -glukan miktarı artmaktadır. Fakat çok hızlı çalkalama önemli bir şekilde hiflere ve  $\beta$ -glukan' a zarar vermektedir. Mantarlar üzerinde çalkalama hızı denenmiş, bu baskının oluşan yapışkan Schizophyllan üretimini etkilediği gözlemlenmiştir. Her iki mantar için de besiyerinde bulunan glikoz önemlidir. Çünkü besiyerindeki glikoz tükendiğinde  $\beta$ -glukan oluşumu baskılanarak azalmaktadır. İnkübasyon esnasında önemsiz derecedeki glikoz azalması spesifik yapışkan serbest  $\beta$ -glukan salınımının azalmasına sebep olmaktadır (Rau, 2004).

Zamk gibi yapışkan ve lastikimsi Schizophyllan ve Scleroglukan polisakkaritleri ya hücre dışı duvarında gevşek bir şekilde birleşik ya da besiyerinde serbest olarak bulunmaktadır. Sıvı solüsyon içerisindeki Schizophyllan ve Scleroglukan, tripleks bir yapı oluşturur. Bu yapının dışına asılı olarak  $\beta$ -(1,6)-zinciri D-glukoz yapısı ile üçlü heliks oluşturur. Dimetilsülfoksit' te 135 °C' nin üstünde ve pH 12 ve üstü değerinde üçlü heliks erir, tek parça haline gelir ve rastgele sarılarak ortalama moleküler ağırlığı üçte birine iner. Doğal süspansiyona ek olarak ilave edilen içerik mantar hiflerinin artmasına ve internal zikzaklar yaparak filamöntöz ağ oluşturmasına sebep olur (Rau, 2004).

Schizophyllan Japonya'da 1986 yılından beri kanser hastalığına karşı bağışıklık sistemini destekleyici ajan olarak kullanılmaktadır. Klinik araştırmalar, glukanoların makrofaj aktivitesini, daha sonrada T-hücrelerin çok hızlı bir şekilde çoğalmalarına dayanarak glukanolun insanın bağışıklık ve savunma sistemini güçlendirdiğini vurgulamaktadır.

Schizophyllan maddesinin geleneksel kemoterapide kullanılmasına ilişkin daha önceden 367 hasta üzerinde yürütölen çalışmada tedavisi mümkün olmayan mide kanseri vakalarında ortalama yaşam süresinde önemli artışlar sağlanmışır. Schizophyllan yakın zaman da yapılan birçok çalışma da gırtlak kanseri hastalarında da önemli iyileşmeler göstermiştir. Düzenli yapılan çalışmalarda Schizophyllan' ın radyoterapiyle birlikte kullanımlarında, ikinci seviye kanser vakalarında önemli iyileşmeler sağladığı fakat üçüncü seviye vakalarda etkisinin olmadığı görölmüşür (Daba ve Ezereonye, 2003).

### 1.1.2.2. Lentinan

Günümüzde, meşe mantarının içerdiği lentinan maddesiyle kansere karşı savaşta önemli olduğu bilinen bağışıklık mekanizmasının güçlendirilmesi üzerine yoğun tıbbi çalışmalar yapılmaktadır. Bir polisakkarit olan lentinan çeşitli bakteri, mantar, virus ve parazitlerin neden olduğu enfeksiyonlara karşı vücudun güçlendirilmesinde yararlı olmaktadır. Hatta, bu özelliği nedeniyle AIDS hastalığına karşı da etkili olduğu belirtilmektedir. Meşe mantarının içerdiği eritadenine maddesi kolesterol, trigliserit ve fosfolipid seviyesini düşürücü etkiye sahiptir (Boztok ve Erkip 2002).

Lentinan, *Lentinus edodes* tarafından üretilir. İlk olarak 1969' da antitümör aktivitesi keşfedilmiştir. Lentinan klinik olarak insan kanser hücrelerinden ve AIDS' e kadar pek çok enfeksiyon hastalığında denenmiştir. Bununla birlikte hayvanlarda geniş bir kullanımı bulunmamaktadır. Lentinan antitümör ve immunostimulan etkisinden dolayı Marek hastalığında ya da viral hastalıklarda da kullanılabilir. İmmun sistem üzerine nasıl bir mekanizma ile etki ettiği çok az bilinmektedir.  $\beta$  –glukan üzerinden (lentinan tipik bir glukandır) etki ettiği düşünölmektedir. Lökosit yüzeyindeki reseptöre bağlanarak lökositin dalgalı bir sinyal göndermesini sağlar. Bu mantar türü dünyada bolca tüketilmektedir. Haşlanarak ya da kızartılarak tüketilen *Lentinula edodes*

mantarının bazı kişilerin derilerinde alerjik reaksiyonlara ve kollar bacaklarda çizgi şeklinde kırmızılıklar oluşmasına sebep olabilmektedir. Tüketilen miktarın ve pişirme şeklinin ilgisi olmadığı için, bu reaksiyona bilinmeyen bir kofaktörün sebep olduğu düşünülmektedir.

Japonya ve Çin’ de mantarlar yüzyıllardır yemeklere tat vermesi için baharat olarak, daha uzun ve sağlıklı yaşamak için bolca tüketilmektedir. *Lentinula edodes* Avrupa’da kültürde geliştirilerek, taze ya da kurutulmuş olarak tüketilmektedir. Dünyada ki toplam tüketiminin 10.000 ton civarında olmasından dolayı en çok tüketilen ikinci mantar türüdür.

*Lentinus edodes*’ in kimyasal bağları Lenthionin (1,2,3,5,6-Pentethihiepan); 1,2,4,5-Tetraathian; 1,2,3,5-Tetrathian ve 1,2,4, Trithiolan’ dan oluşmaktadır. Lentinan ısıya oldukça dayanıklıdır. Kurutulan *Lentinus edodes* pişirildiğinde, gama-glutmytransferi aktive olarak Lentinan korunur. Pişirilmeye başlandıktan 40 dk sonra Lentinan’ nın yapısı bozulmaktadır. Buzlukta dondurulan *Lentinus edodes*’ ten ve misellinden elde edilen polisakkaritin ana yapısı  $\beta$ -(1-3)-Glukan ve  $\beta$ -(1-4),  $\beta$ -(1-6)-glukan yan zincirlerinden oluşmaktadır. Solunum sorunu olan hastalara Lentinan verilmiş bu hastalarda IgG hücrelerinin *Lentinus edodes*’ in sporlarına karşı sayılarının arttığı gözlenerek alerjik reaksiyona sebep olmuştur. *Lentinus edodes* mantarı tüketildikten sonra derinin UVA ışığı ile temasa geçtiğinde alerjik reaksiyona sebep olduğu bulunmuştur (Anonim, 2004).

### 1.1.2.3. Grifon-D (GD)

*Grifola frondosa* A.B.D.’ nin batısında, Avrupa ve Asya da doğada yetişmektedir. (Ger vd., 1998). Yapılan birçok çalışmada *Grifola frondosa*’ dan elde edilen  $\beta$ -D-glukan’ nın güçlü antitümör etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bu  $\beta$ -D-glukan’ nın  $\beta$ -(1-6)-glukan zincirine  $\beta$ -(1-3) ile bağlanmıştır (Grifon-D, GD) (Daba ve Ezereonye, 2003). Ayrıca kan basıncını ve kan plazmasındaki yüksek lipoprotein oranını (HDL iyi kolesterol) değiştirmeden düşürmektedir. Buna karşın *Lentinus edodes* ise HDL oranını da düşürerek kan basıncını düşürebilmektedir. *Grifola frondosa* farelerde yapılan çalışmalarda kandaki glikoz metabolizmasını yavaşlattığı görülmüştür. Amerika’ da insanlar üzerinde yapılan klinik denemelerde göğüs kanserinde, AIDS

tedavisinde, Çin' de ise akciğer, mide hepatoselüler ve lösemi hastalıklarında öncü umut verici çalışmalar yapılmıştır (Ger vd., 1998).

#### 1.1.2.4. Krestin (PSK), Polisakkaropeptid (PSP) ve Coriolan

Ticari alanda en kullanışlı olan polisakkaropeptid Krestin ve polisakkaropeptid (PSP)' dir (Cui ve Chisti, 2003). Krestin ve polisakkaropeptid (PSP), *C. versicolor*' un misellerinin ekstraksiyonundan elde edilirken, Coriolan ise *C. versicolor*' un hücre dışına salgıladığı bir polisakkarittir. PSK, PSP ve Coriolan protein zincirine sahip olduğu ve antitümör etkisine sahip olduğu belirtilmektedir (Tavares vd., 2005). PSK ve PSP fizyolojik aktiviteleri benzer olmalarına rağmen yapısal yönden farklılıklar bulunmaktadır (Cui ve Chisti, 2003).

Mantarlardan elde edilen, Lentinan, Schizophyllan ve Krestin antitümör özellikleri nedeni ile Japonya'da büyük pazar payına sahiptir. Lentinan ve Schizophyllan sadece  $\alpha$ -glukanlardan oluşurken, Krestin bu polisakkaritlerden farklıdır. Krestin' de  $\alpha$ -glukanlar proteinle bağlanmış ve  $\alpha$ -glukan-protein kompleksi % 25-38 protein kısmından oluşmaktadır. Krestin (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -glukan ile (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glucopyranosidic her dördüncü glukoz ünitesine yan zincirle bağlanmıştır (Dong vd., 1998).

## 1.2. Makrofungusların Ürettiği Eksopolisakkaritler ve Kullanım Alanları

EPS'ler yeni işlevsellikleri ile pek çok ilginç fiziki, kimyasal ve rehological (maddenin sıvı halindeki özellikleri) özelliklerinden dolayı biyomateryaller gibi hareket ederler ve tekstil, deterjan, yapıştırıcı, mikrobiyal olarak zenginleştirilmiş petrol iyileştirmeleri (NEOR), atık su iyileştirmeleri, dere yatağı temizlemeleri, mayalanma, akarsu işleme sürecinde, kozmetik, eczacılık ve gıda katkı maddesi olarak oldukça geniş kullanım alanlarına sahiptirler. Ayrıca biyofilm özelliği gösteren EPS' ler bakteriyi deterjanlara ve antibiyotiklere karşı dirençli hale getirirler. Yine biyofilm bakteriyi yalnızca dış ortamdan koruyarak yaşayabilmesi için değil aynı zamanda genetik özelliklerinin korunmasında ve genetik bilgi değişiminde de daha iyi ortamlar

hazırlamaktadır. Bu polimerleri sadece bakteriyi saran bir biyofilm tabakası olarak fonksiyon göstermeyip ticari amaçla da kullanılmaktadır. EPS' ler aynı zamanda insanoğlu üzerinde anti-tümör, antivirüs ve ateş düşürücü etmen olarak, ilaç sanayisinde de kaplama materyali olarak pek çok fizyolojik aktivitelere katkıda bulunurlar ayrıca interferon, trombosit yığınları birikmesi ve faktör sentezlerini uyaran koloniler için teşvik edici olarak kullanılırlar. 40.000-70.000 Da gibi düşük mol ağırlıklı olanlar tıpta en çok kullanılanlardır. Dekstran-demir kompleksi anemi vakalarında, dekstran-kalsiyum kompleksi ise hayvan beslemede hipokalsemi tedavisinde kullanılır (Yılmaz ve ark., 2007).

Yapılan çalışmalar sonucunda EPS' lerin bağırsak mikrobiyotasını düzenlediği, kolesterolü düşürdüğü ve antiülser aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda kimya alanında inceltici olarak ve farmokolojinin birçok alanında da EPS' den yararlanılmaktadır. Bakteriler haricinde pek çok mantarda gelişimi boyunca glikoz ile ekstraselüler homopolimer sentezi yapmaktadır. Mantarlar tarafından üretilen bu polimerlerde gıda, kozmetik ve ecza endüstrilerinde ticari kullanım alanları bulurlar. Ayrıca  $\beta$  (1→3) ve  $\beta$  (1→3;1→6) mantarimsı glikan tiplerinin anti-tümör, anti-inflamatuar ve immunodilasyon aktivitelerine sahip oldukları bilinmektedir ( Yılmaz ve ark., 2007).

### **1.3. *Cerrena unicolor* ile Daha Önce Yapılmış Çalışmalar**

Literatürdeki araştırmalar incelendiğinde bugüne kadar *Cerrena unicolor* ile yapılmış çalışmalar lakkaz enzimi aktivitesi (Ledakowicz vd., 2007, Janusz vd., 2007, Stepanova vd., 2006, Wilkolazka vd., 2005, Michniewicz vd., 2005 Koroleva vd., 2004.), lakkaz enzimi aktivitesi ve lignin degradasyonu (Kim vd., 2002) çalışılmıştır. Janusz ve arkadaşları, (2006) tarafından sıvı besiyerinde lakkaz üretiminin arttırılmasına yönelik bir çalışma yapılmıştır. Ulrich ve arkadaşları, (2005) tarafından beyaz çürükçül bir mantar olan *Cerrena unicolor*' un farklı fizikokimyasal ve katalitik ortamlarda lakkaz üretimi araştırılmıştır. Ancak literatürde tıbbi anlamda bugüne kadar herhangi bir çalışmaya rastlanmamaktadır.

### 1.3.1. *Cerrena unicolor* (D 30)' un hipoglisemik aktivitesi üzerine yapılan çalışma

*Cerrena unicolor* (D30) tarafından üretilen EPS glisemik fareler üzerinde denenmiş ve çizelge 1.1 ve çizelge 1.2' deki sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada sağlıklı fareler (kontrol grubu) ve glisemik fareler kullanılmıştır. Önce diyabetli hayvanlar elde edebilmek için sağlıklı farelere oral yol ile STZ erilmiştir. Glisemik farelere oral yol ile *Cerrena unicolor* (D30) tarafından üretilen EPS verilmiştir. *Cerrena unicolor* verilen farelerde Çizelge 1.2' de görülüşü gibi kan-şeker seviyesinin 563.71' den 218.50' ye düşüşü görülmüşür (Yamaç ve ark., 2007). Aynı zamanda Langerhans adalarında diyabet sonucunda meydana gelen alan ve hücre sayısındaki azalmanın da *C. unicolor* (D30) tarafından üretilen EPS ile iyileşme sağlandığı göze çarpmaktadır. *C. unicolor* sağladığı bu faydalar sebebi ile çalışma materyali olarak seçilmiş ve optimizasyonu yapılmıştır.

Çizelge: 1.1 STZ ve *Cerrena unicolor* ile kontrol grubu farelerinin başlangıç ve final vücut ağırlıkları

Deney grupları	Ba°langıç vücut ağırlığı (g)	Final vücut ağırlığı (g)
NC	164.40 ± 2.85	170.00 ± 1.89
STZ	173.42 ± 4.31	164.24 ± 2.41
<i>Cerrena unicolor</i>	164.32 ± 2.48	161.58 ± 3.54



Çizelge:1.2: STZ ve *Cerrena unicolor* ile kontrol grubu farelerinin 7 gün sonunda kan-şeker seviyeleri ile pankreasta oluşan değişiklikler

Deney grupları	7 günlük ratlarda kan-şeker seviyesi (mg/dl)	Langerhans adalarının ortalama alanı (nm <sup>2</sup> )	Langerhans adalarının ortalama hücre alanı
NC	140.14 ± 15.17	17271.50 ± 1966.70	123.00 ± 7.96
STZ	563.71 ± 14.39	5271.25 ± 113.89	37.25 ± 3.41
<i>Cerrena unicolor</i>	218.50 ± 31.26	42074.33 ± 1811.72	295.33 ± 41.28

Oral yol ile alınıp kan-şeker seviyesini düşürmeye yardımcı olan ilaçların çeşitli yan etkilere sahip olması ve tam olarak bir iyileşme sağlamaması nedeni ile *Cerrena unicolor*' un kan-şeker seviyesini düşürmedeki etkisi ve sağladığı iyileşme göz önünde bulundurularak ilerleyen dönemlerde kullanılabilirliğinin arttırılması için en yüksek EPS üretimini veren optimum koşullar oluşturulmaya çalışılmıştır.

## 2. MATERYAL ve YÖNTEMLER

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Makrofungus izolatu

Çalışmamızın materyalini oluşturan *Cerrena unicolor* D-30 izolatu Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Fungikültür laboratuvarı bünyesinde bulunan makrofungus kültür koleksiyonu kapsamında korunmaktadır. Makrofungus örneği, 15.10.2005 tarihinde Sakarya/Geyve Kamışlı Köyü-Akyazı yol ayrımından (h:817 m; N 40 32 731-E 30 21 781) toplanmıştır. İzolasyonu takiben identifikasyonu yapılmıştır.

*Cerrena unicolor* (Bull. Fr.) Murr. Basidiomycota grubuna ait bir makrofungus olup sistematik pozisyonu şu biçimde özetlenebilir:

Alem	: Fungi
Filum	: Basidiomycota
Sınıf	: Basidiomycetes
Altsınıf	: Basidiomycetidae
Takım	: Polyporales
Familya	: Polyporaceae
Cins	: <i>Cerrena</i>
Tür	: <i>Cerrena unicolor</i>
	(Syn: <i>Dadalea unicolor</i> Bull.Fr.)



Şekil 2.1. *Cerrena unicolor* mantarının morfolojik görüntüsü

*Cerrena unicolor* ağaç zemin üzerinde 0,5-10 cm' e kadar ve kümeler halinde büyüyen raf mantarlarıdır (Şekil 2.1.) Basidiyokarpın üst yüzeyleri beyazdan griye, griden kahverengiye kadar değişik renklenme gösterir. Genellikle saça benzer uzantılar içeren alglerle kaplıdır. Üzerlerinde belirgin büyüme zonları vardır. Himenyum beyazdan duman rengine kadar renklenme gösterir. Tipik olarak tüpe benzer şekilde lamelleri vardır. Tüpler 0,4-4 mm derinliktedir. Porlar diş gibi tırtıklı olup çapları 2-3 mm, beyazdan griye değişik renklindedir. Fungusun sporları elipsoid, düzgün ve 4.5-5.5×2.5-3.5 µm boyutlarındadır. Parazitik ya da saprofitik, genellikle ölmüş ağaç gövdelerinde büyüyen tek yıllık bir mantardır.

*Cerrena unicolor* endüstriyel olarak önemli olan lakkaz enziminin potansiyel üreticisi olarak bilinmektedir (Janusz vd., 2006).

### 2.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Çalışmada kullanılan tüm besiyerleri içeriği distile suda çözülüp otoklavda 121 °C sıcaklıkta, 15 dakika süreyle steril edilmiştir.

#### **Besiyeri 1: Potato Dextrose Agar (PDA) Besiyeri**

Ticari preparat olarak elde edilen hazır besiyerinden 39 g/l oranında tartılarak hazırlanır. Makrofungusların misel kültürlerini geliştirmek için kullanılır. (Lee vd., 2003)

#### **Besiyeri 2: Potato Malt Peptone (PMP) Besiyeri**

Malt extract	10	g
Peptone	1	g
Potato Dextrose Broth	24	g
Distile su	1000	ml

Makrofungus hücrelerini sıvı besiyerinde kitlesel formda geliştirmek için kullanılmıştır. (Kim vd., 2002)

### Besiyeri 3: Basal Medium

Glikoz	20	g
Peptone	2	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	g
MgSO <sub>4</sub>	0,5	g
Distile su	1000	ml

Optimum koşulları belirlemek için kullanılmıştır.

## 2.2. Yöntemler

### 2.2.1. Makrofunguslardan Misel Eldesi ve Saklanması

Makrofunguslardan misel formu elde etmek için, makrofunguslardan steril pens yardımı ile alınan doku parçaları, steril şartlarda Potato Dekstrose Agar (PDA) besiyerine inoküle edilmiştir. Makrofungusların yüzey sterilizasyonu % 96' lık alkol ile işlem gördükten sonra bek alevinde yakılarak gerçekleştirilmiştir. Besiyerine üç nokta ekimi ile inoküle edilen doku parçaları, 27 °C' de 7 gün süre ile inkübe edilmiştir.

Petrilerde büyütülen misel formları petri ve yatık PDA tüplerinde geliştirilerek stok kültür haline getirilmiş ve + 4 °C' de saklanmıştır. Stok kültürleri 3 ayda bir tazelenmiştir.

### 2.2.2. Kültürel yöntemler

EPS üretimini gerçekleştirmek için gerekli olan kültür, stok kültürden PDA besiyerine inoküle edilerek 27 °C' de 7 gün süre ile inkübe edilmiştir (Kim vd., 2005). Gelişen misellerden steril bistüri yardımı ile eşit büyüklükte parçalar çıkarılmıştır. Çıkarılan parçalar, 50 ml Potato Malt Medium (PMP) içeren 250 ml' lik erlenlere aktarılmıştır. PMP içeren 250 ml' lik erlenler çalkalamalı etüvde 30 °C' de 150 rpm hızında geliştirilmiştir. Dört günlük inkübasyon süresi sonunda büyüyen hücreler Heidolph model homojenizatör ile homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenizat, EPS üretiminin optimizasyonu çalışmalarında inokülant olarak kullanılmıştır.

Aksi belirtilmedikte % 4 oranında inokülant kullanılarak inoküle edilen erlenler, uygun sıcaklık değerinde 7 gün inkübe edildikten sonra, üretilen hücre kuru ağırlığı, eksopolisakkarit ve besiyeri pH değerleri belirlenmiştir (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Araştırma parametrelerini belirlemek için kullanılan kültür sıvısı

### 2.2.3.1. Farklı Sıcaklık Değerlerinin *Cerrena unicolor* (D 30) İzolatının Gelişimine Etkisi

*Cerrena unicolor* (D 30) izolatının ana kültürleri 27 °C' de 7 gün büyütülmüş ve gelişen makrofungus kolonisinin aktif büyüyen uç kısımlarından 6 mm çapında diskler elde edilmiştir. Patates dekstroza agar besiyerini içeren petrilerin merkez kısmına bir adet makrofungus diski aktarılarak petriler 27 °C' de 7 gün boyunca izlenmiştir. İzolatın farklı sıcaklık değerlerinde gelişiminin belirlenebilmesi için, besiyerindeki koloni çapı dijital kumpas ile günlük olarak ölçülmüş ve 7 günde ulaşılan toplam koloni çapı değerlendirilmiştir. Bu amaçla kolonilerin çapları farklı düzlemler dikkate alınarak günlük olarak ölçülmüştür.

### **2.2.3.2. Farklı pH Değerlerinin *Cerrena unicolor* (D 30) Tarafından EPS Üretimine Etkisi**

Çalışmada başlangıç besiyeri pH' ı 4.0' dan 8.0' a kadar 0.5 birim aralıklarla ayarlanmıştır. pH değerlerinin ayarlanması için NaOH ve HCl kullanılmıştır.

### **2.2.3.3. Karbon kaynağı tipinin *Cerrena unicolor* (D 30) tarafından EPS üretimine etkisi**

Çalışmada karbon kaynağı miktarının *Cerrena unicolor* (D 30) izolatu tarafından EPS üretimine etkisi bir araştırma parametresi olarak araştırılmıştır. Bu amaçla karbon kaynağı tipi olarak kullanılan fruktoz, ksiloz, galaktoz, maltoz, mannoz, arabinoz, sukroz, basal mediumda glukoz yerine, % 2 oranında kullanılmıştır.

### **2.2.3.4. Azot kaynağı tipinin *Cerrena unicolor* (D 30) tarafından EPS üretimine etkisi**

Çalışmada azot kaynağı tipi olarak corn step liqour, pepton casein, mikolojik pepton, üre, amonyum hidrojen fosfat, amonyum sülfat, amonyum sitrat, amonyum nitrat, amonyum klorid, beef ekstrakt powder, pepton, NaNO<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub>, % 2 oranında kullanılmıştır.

### **2.2.3.5. Mineral madde tipinin *Cerrena unicolor* (D 30) tarafından EPS üretimine etkisi**

Çalışmada, Ca (CaCO<sub>3</sub>), Fe (Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), Na (NaNO<sub>3</sub>), Mn (MnSO<sub>4</sub>), K(KNO<sub>3</sub>) ve Zn(ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) mineral maddelerinin *Cerrena unicolor* D30 izolatının eksopolisakkarit üretimine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, bahsedilen mineral maddeler basal besiyerine 5 mM konsantrasyonda ilave edilmiştir.

### **2.2.3.6. İnokulant yaşı ve yüzdesinin *Cerrena unicolor* (D 30) tarafından EPS üretimine etkisi**

Çalışmada inokulant yaş ve miktarının etkisi de araştırma konusu yapılmıştır. İnokulant yaşının etkisini incelemek amacı ile 4, 8 ve 12 günlük inkübasyon sonucunda elde edilen homojenizatlar kullanılmıştır. İnokulant yüzdesinin etkisi ise, besiyeri içeren erlenlere %1' den % 5' e kadar olan farklı oranlarda ekim yapılarak belirlenmiştir.

### 2.3. Analitik Yöntemler

Çeşitli çevresel ve besinsel faktörlerin *Cerrena unicolor* D 30 izolatu tarafından EPS üretimine etkisini konu alan çalışmamızda, 7 günlük inkübasyon süresi sonunda erlenler süzülerek araştırma parametrelerinin değişimi izlenmiştir.

#### 2.3.1. Eksopolisakkarit (EPS) üretiminin hesaplanması

Farklı sıvı besiyerleri içeren 250 ml' lik erlenler filtre kağıdı yardımı ile süzülerek pellet ve süzüntü olarak iki kısma ayrılmıştır (Şekil 2.3.). Her süzüntü hacminin 4 katı kadar etanol eklenerek kuvvetlice çalkalandıktan sonra 1 gece boyunca 4 °C' de bekletilmiştir (Lee vd., 2003). EPS sıvı ortamdan 7500 rpm' de 10 dakika santifürlenerek ayrılmıştır. Santrifüjleme işlemi sonucunda oluşan EPS çökeltisi saf etanol yardımı ile alınarak önceden darası alınmış küçük kaplara aktarılmış ve 35 °C' de kurutulmuştur. Kurutulan EPS tartılarak miktarı belirlenmiştir.



Şekil 2.3. Filtre kağıdı yardımı ile pelet ve süzüntü olarak ayrılan sıvı besiyeri



### **2.3.2. Kuru hücre ağırlıklarının hesaplanması**

Çalkalamalı etüvde farklı besiyerlerinde geliştirilen hücreler 7. gün sonunda önceden tartılmış filtre kâğıdı yardımı ile süzölmüştür. Filtre kağıdında kalan pellet formundaki makrofungus hücreleri, distile su ile 3 kez yıkanmıştır. 45 °C kurutulduktan sonra ağırlıkları tartılmıştır. Kuru misel ağırlığı filtre kâğıdının ağırlığı çıkarılarak hesaplanmıştır.

### **2.3.3. pH ölçümü**

Sıvı besiyerleri hazırlanırken başlangıç pH değeri 5.5 olarak ayarlanmıştır. 7. gün sonunda pH değeri ölçülerek değişim gözlenmiştir.

Tüm çalışmalar 3 paralel halinde gerçekleştirilmiş olup, elde edilen sonuçlar, ortalama  $\pm$  standart sapma biçiminde sunulmuştur.

### 3. BULGULAR

Bu çalışmada hipoglisemik aktivitesi önceki bir çalışma ile (Yamaç ve ark., 2007) belirlenmiş olan *Cerrena unicolor* (D 30) izolatının EPS üretimi için gerekli optimum koşullar belirlenmeye çalışılmıştır. Değerlendirme parametreleri olarak *Cerrena unicolor* D 30 izolatının 7. gün sonunda eksopolisakkarit üretim miktarı, hücre kuru ağırlığı, pH değeri miktarları belirlenmiştir.

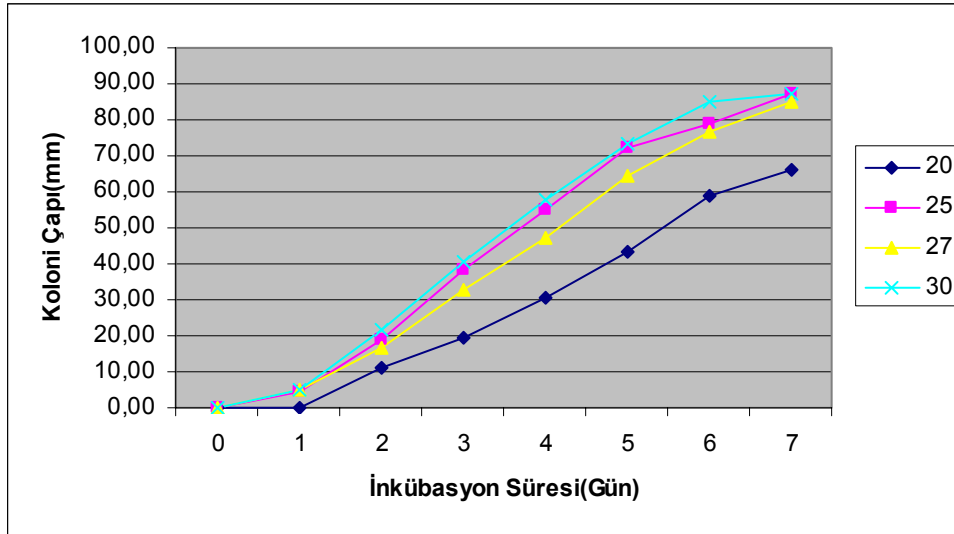
#### 3.1. Farklı Sıcaklık Değerlerinin *Cerrena unicolor* (D 30) İzolatının Gelişimine Etkisi

Çalışmada 20, 25, 27, 30 °C deki büyüme değerleri başlangıç gününden 7. güne kadar ölçülerek belirlenmiş ve Çizelge 3.1' de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Farklı Sıcaklık Değerlerinin *Cerrena unicolor* (D 30) İzolatının Gelişimine Etkisi

Sıcaklık (°C)	Büyüme değerleri (mm)							
	0.gün	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün	6.gün	7.gün
20	0	0	11.20 ±0.75	19.70 ±1.20	30.50 ±2.06	43.50 ± 2.52	59.10 ± 1.63	66.10 ±4.49
25	0	4.62 ± 0.47	18.75 ± 0.95	38.12 ± 2.32	55.00 ± 2.70	72.50 ± 1.58	78.62 ± 5.43	87.00 ± 0.00
27	0	5.00 ± 0.70	16.875 ± 1.03	32.87 ± 1.43	47.50 ± 1.41	64.25 ± 2.25	76.75 ± 0.64	85.00 ± 2.61
30	0	5.25 ± 0.64	21.50 ± 1.68	40.50 ± 1.58	58.00 ± 1.08	73.37 ± 2.80	85.25 ± 2.36	87.00 ± 0.00

Farklı sıcaklık aralıklarındaki büyüme değerleri grafik halinde Şekil 3.1' de sunulmuştur. Koloni çapı bakımından en yüksek oranda büyüme 30 °C' de gerçekleşmiş ve çalışma bu sıcaklıkta yapılmıştır.



Şekil 3.1. Farklı Sıcaklık Değerlerinin *Cerrena unicolor* (D 30) Tarafından EPS Üretimine etkisi

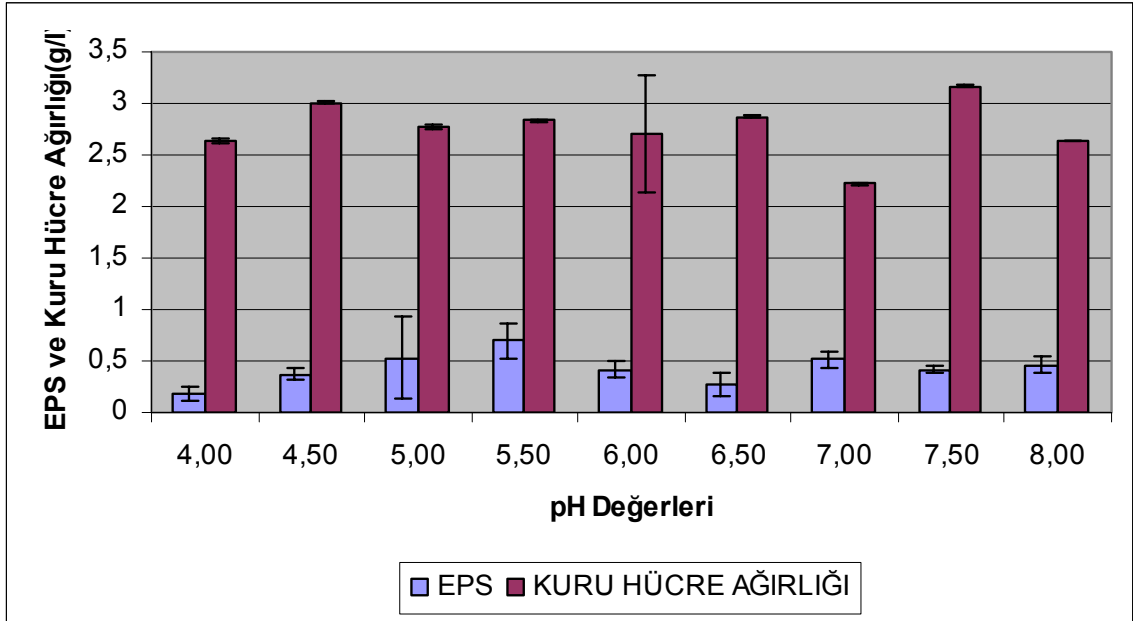
### 3.2. Farklı pH Değerlerinin *Cerrena unicolor* (D 30) Tarafından EPS Üretimine Etkisi

Başlangıç pH değerinin EPS üretimine etkisinin belirlenebilmesi için, besiyeri başlangıç pH' sı 4.0-8.0 aralığında 0.5 lik birim aralığı ile ayarlanmıştır. 7. gün sonunda elde edilen değerler Çizelge 3.2. de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Farklı pH değerinin *Cerrena unicolor* (D 30) tarafından EPS üretimine etkisi

Besiyeri başlangıç pH değeri	EPS üretimi (g/l)	Kuru hücre ağırlıkları (g/l)	Final pH
4.0	0.18 ± 0,06	2.64 ± 0.03	3.71
4.5	0.37 ± 0.06	3.01 ± 0.02	3.74
5.0	0.53 ± 0.40	2.77 ± 0.02	3.65
5.5	0.70 ± 0.17	2.83 ± 0.01	3.85
6.0	0.42 ± 0.07	2.71 ± 0.57	3.83
6.5	0.28 ± 0.11	2.87 ± 0.00	3.80
7.0	0.52 ± 0.08	2.22 ± 0.00	3.98
7.5	0.42 ± 0.04	3.17 ± 0.00	3.87
8.0	0.46 ± 0.08	2.64 ± 0.00	3.91

Başlangıç pH değerinin EPS üretimine etkisi araştırılmış ve sonuçlar grafik halinde Şekil 3.2' de sunulmuştur. En yüksek EPS üretimi pH 5.5' te gerçekleşmiş olup, çalışmaya bu pH değerinde ve 30 °C' de sıcaklıkta devam edilmiştir.



Şekil 3.2. Başlangıç pH değerinin *Cerrena unicolor* (D 30) tarafından EPS üretimine etkisi

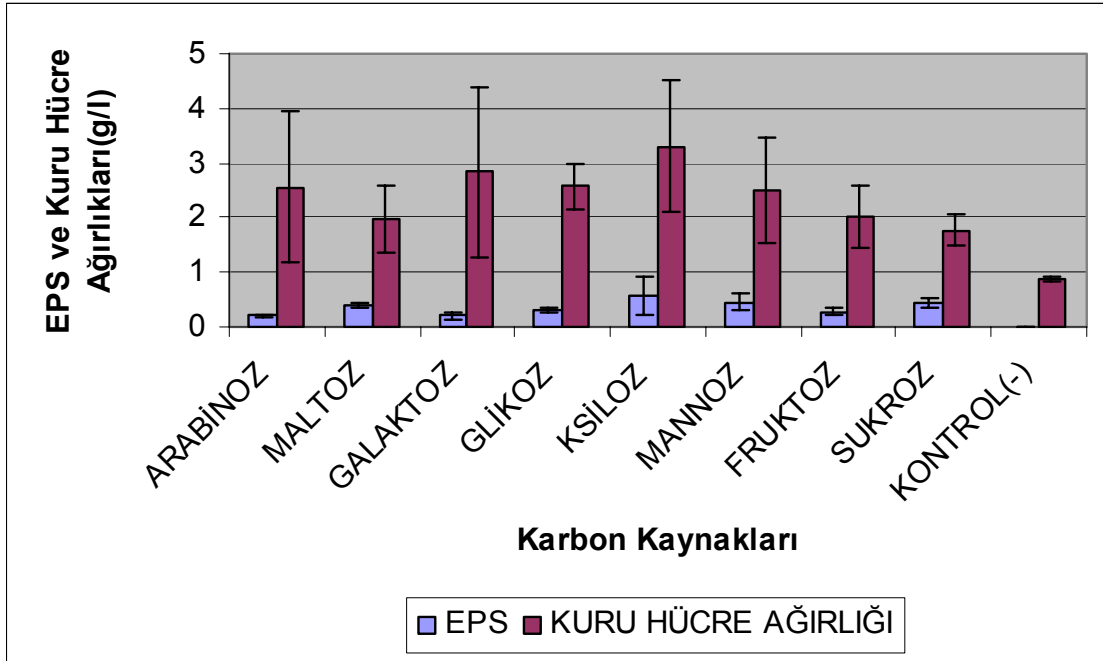
### 3.3. Karbon kaynağı tipinin *Cerrena unicolor* (D 30) tarafından EPS üretimine etkisi

Çalışmada karbon kaynağı olarak arabinoz, maltoz, galaktoz, glikoz, ksiloz, mannoz, fruktoz ve sukroz % 2 oranında kullanılmıştır. Elde edilen değerler Çizelge 3.3' de sunulmuştur.

Çizelge 3.3. Karbon kaynağı tipinin *Cerrena unicolor* (D 30) tarafından EPS üretimine etkisi

Karbon kaynakları	EPS üretimi (g/l)	Kuru hücre ağırlıkları (g/l)	Final pH
Arabinoz	0.20 ± 0.00	2.56 ± 1.39	4.19
Maltoz	0.38 ± 0.04	1.99 ± 0.61	4.26
Galaktoz	0.20 ± 0.06	2.83 ± 1.54	4.44
Glikoz	0.30 ± 0.03	2.58 ± 0.42	4.14
Ksiloz	0.55 ± 0.35	3.30 ± 1.21	4.38
Mannoz	0.45 ± 0.15	2.50 ± 0.98	3.98
Fruktoz	0.27 ± 0.07	2.01 ± 0.56	4.48
Sukroz	0.45 ± 0.09	1.77 ± 0.27	4.12
(-) kontrol	0.00 ± 0.00	0.88 ± 0.03	6.45

(-) Kontrol grubunda karbon kaynağı kullanılmamış olup, 8 farklı karbon kaynağı kullanılarak elde edilen sonuçlar Şekil 3.3' te grafik halinde sunulmuştur. En yüksek EPS üretimini veren ksilozda standart sapma değerinin yüksek olması nedeni ile sukroz karbon kaynağı olarak seçilmiş ve ilerleyen aşamalarda karbon kaynağı olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.3. Karbon kaynağı tipinin *Cerrena unicolor* (D 30) tarafından EPS üretimine etkisi

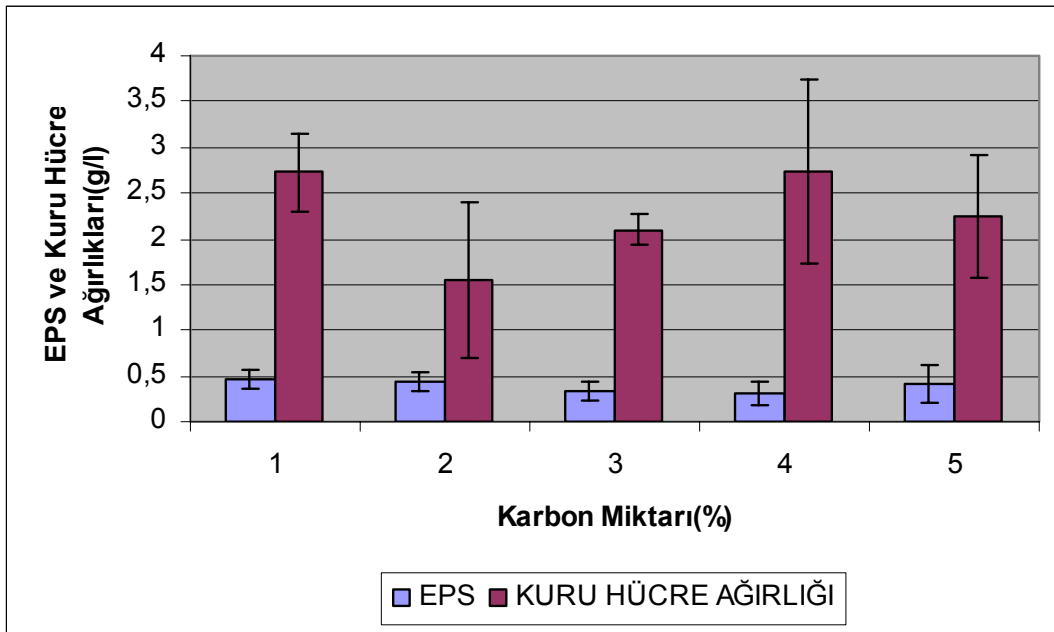
#### 3.4. Karbon Kaynağı Miktarının *Cerrena unicolor* (D 30) Tarafından EPS Üretimine Etkisi

Karbon kaynakları arasında en yüksek EPS üretimini sağlayan sukroz, uygun karbon kaynağı olarak seçilmiş ve %1' den % 5' e kadar olan farklı oranlarda denenmiştir. Elde edilen sonuçlar çizelge 3.4' te sunulmuştur.

En yüksek üretim % 5 oranında sukroz kullanılan besiyerinde gerçekleşmiş ve bundan sonraki aşamalarda karbon kaynağı olan sukroz % 5 oranında kullanılmıştır.

Çizelge 3.4. Karbon kaynağı miktarının *Cerrena unicolor* (D 30) tarafından EPS üretimine etkisi

Besiyeri sukroz oranı (%)	EPS üretimi (g/l)	Kuru hücre ağırlığı (g/l)	Final pH
1	0.47 ± 0.102	2.73 ± 0.43	3.87
2	0.43 ± 0.106	1.54 ± 0.85	4.01
3	0.34 ± 0,11	2.10 ± 0.16	3.96
4	0.32 ± 0.13	2.73 ± 1.003	4.006
5	0.42 ± 0.21	2.24 ± 0.671	4.03



Şekil 3.4. Karbon kaynağı miktarının *Cerrena unicolor* (D 30) tarafından EPS üretimine etkisi



### 3.5. Azot Kaynağı Tipinin *Cerrena unicolor* (D 30) Tarafından EPS Üretimine Etkisi

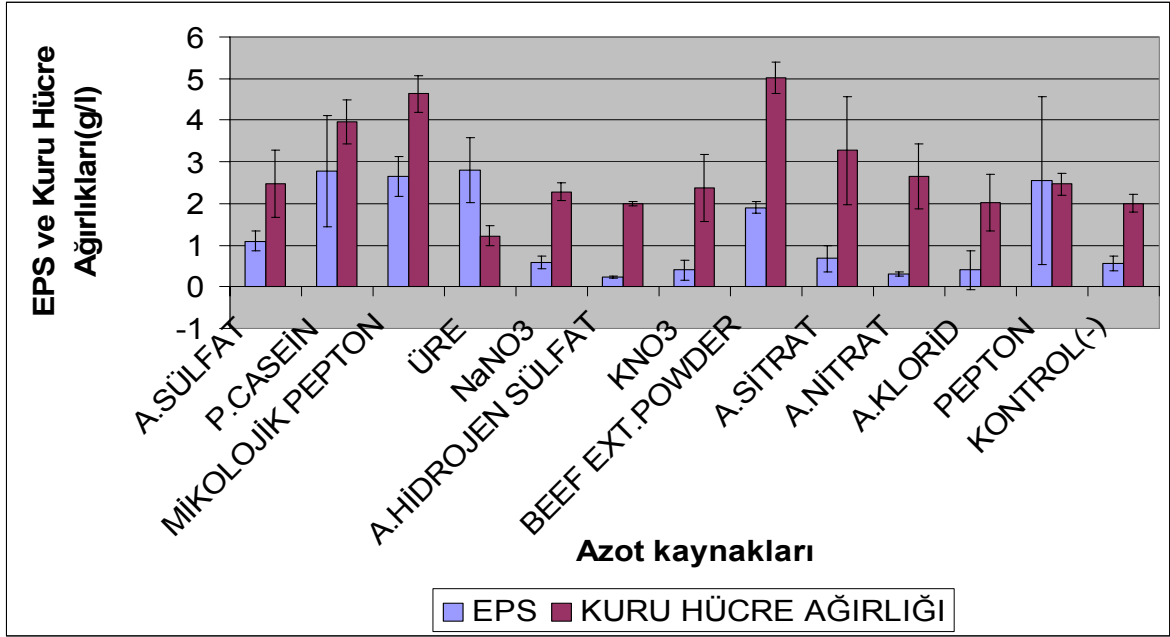
Çalışmada azot kaynağı olarak pepton casein, mikolojik pepton, üre, amonyum hidrojen fosfat, amonyum sülfat, amonyum sitrat, amonyum nitrat, amonyum klorid, beef extract powder, pepton,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ , % 2 oranında kullanılmıştır. Elde edilen değerler çizelgede sunulmuştur.

Çizelge 3.5. Azot kaynağı tipinin *Cerrena unicolor* (D 30) tarafından EPS üretimine etkisi

Azot kaynakları	EPS üretimi (g/l)	Kuru hücre ağırlıkları (g/l)	Final pH
Amonyum sülfat	11.00 ± 0.23	2.48 ± 0.80	3.03
Pepton casein	2.78 ± 1.34	3.97 ± 0.53	3.87
Mikolojik Pepton	2.66 ± 0.48	4.63 ± 0.44	4.52
Üre	2.80 ± 0.79	1.22 ± 0.24	4.46
$\text{NaNO}_3$	0.58 ± 0.15	2.28 ± 0.21	3.73
Amonyum hidrojen fosfat	0.23 ± 0.02	2.00 ± 0.05	3.01
$\text{KNO}_3$	0.40 ± 0.23	2.38 ± 0.81	3.91
Beef extract powder	1.90 ± 0.14	5.02 ± 0.38	3.46
Amonyum sitrat	0.68 ± 0.31	3.27 ± 1.29	3.05
Amonyum nitrat	0.31 ± 0.06	2.65 ± 0.79	3.64
Amonyum klorid	0.40 ± 0.47	2.03 ± 0.68	2.91
Pepton	2.55 ± 2.02	2.47 ± 0.26	4.12
(-) kontrol	0.57 ± 0.18	2.004 ± 0.22	3.64

Farklı azot kaynakları kullanılarak elde edilen değerler Şekil 3.5' te gösterilmektedir. (-) kontrol grubunda azot kullanılmamıştır. Üre kullanılan besiyerinde daha yüksek oranda EPS üretimi gerçekleşmiş olmasına rağmen, mikolojik pepton

kullanılan besiyerinde standart sapmanın daha düşük olması nedeni ile çalışmaya azot kaynağı olarak mikolojik pepton kullanılarak devam edilmiştir.



Şekil 3.5 Azot Kaynağı Miktarının *Cerrena unicolor* (D 30) Tarafından EPS Üretimine Etkisi

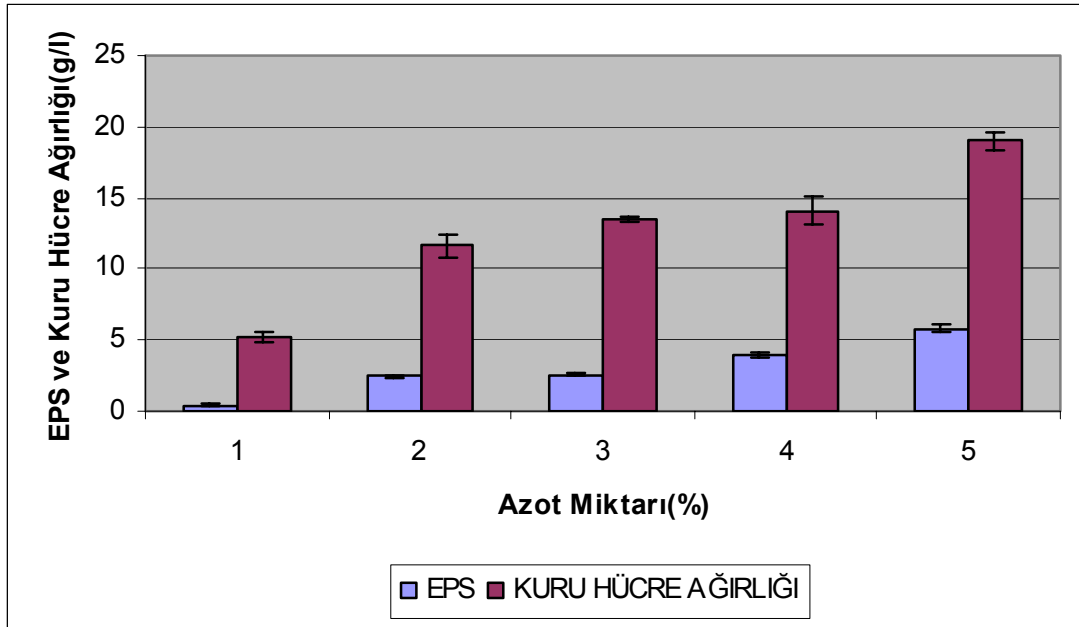
### 3.6. Azot Kaynağı Miktarının *Cerrena unicolor* (D 30) Tarafından EPS Üretimine Etkisi

Çizelge 3.5' te de görüldüğü gibi, 2.66 g/l ile en yüksek EPS üretimini veren mikolojik pepton %1' den % 5' e kadar farklı oranlarda besiyerinde kullanılmıştır. % 5 oranında mikolojik pepton kullanılmasıyla EPS üretimi 5.83 g/l olarak ölçülmüştür.

Çalışmanın ilerleyen aşamalarında azot kaynağı olarak kullanılan mikolojik pepton % 5 oranında kullanılmıştır.

Çizelge 3.6. Azot kaynağı miktarının *Cerrena unicolor* (D 30) tarafından EPS üretimine etkisi

Besiyeri mikolojik pepton oranı(%)	EPS üretimi (g/l)	Kuru hücre ağırlıkları (g/l)	Final pH
1	0.44 ± 0.21	5.21 ± 0.77	4.69
2	2.43 ± 0.14	11.63 ± 0.87	4.62
3	2.56 ± 0.28	13.50 ± 0.56	4.89
4	3.94 ± 0.81	14.11 ± 1.36	5.22
5	5.83 ± 0.66	19.00 ± 2.51	5.27



Şekil3.6. Azot kaynağı miktarının *Cerrena unicolor* (D 30) tarafından EPS üretimine etkisi

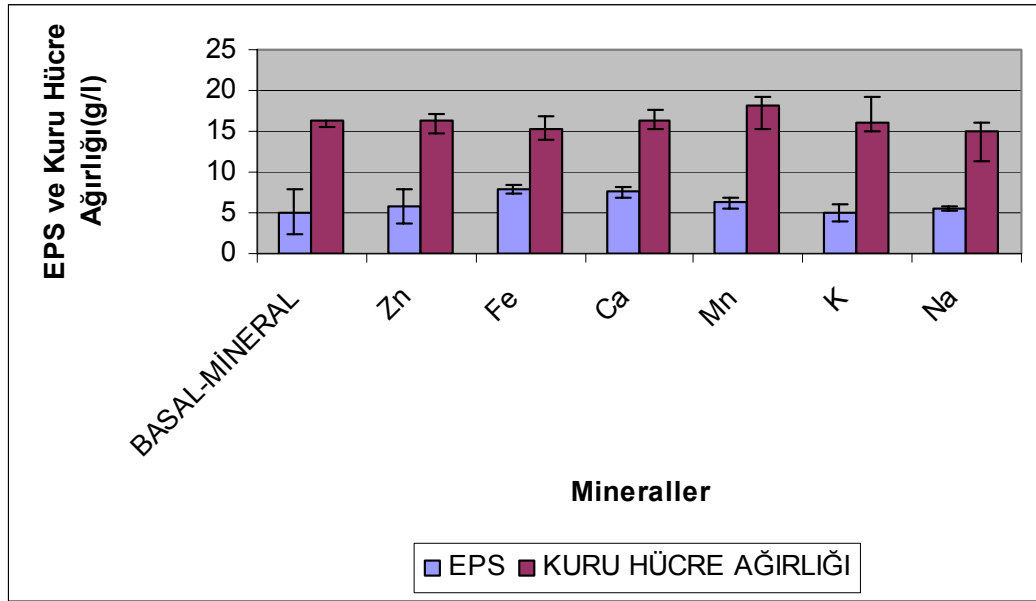
### 3.7. Mineral Madde Tipinin *Cerrena unicolor* (D 30) Tarafından EPS Üretimine Etkisi

Besiyerinde mineral madde olarak çinko, demir, kalsiyum, mangan, potasyum ve sodyum kullanılmıştır. Bununla birlikte mineral madde olmayan besiyeri de çalışmaya dahil edilmiştir. En yüksek EPS üretimi Ca ve Fe' nin ayrı ayrı kullanıldığı besiyerinde sırasıyla 7.53 g/l ve 7.92 g/l olarak gerçekleşmiştir. En düşük EPS üretimi ise mineral madde kullanılmayan besiyerinde 5.02 g/l olarak ölçülmüştür.

Çizelge 3.7. Mineral kaynağı tipinin *Cerrena unicolor* (D 30) tarafından EPS üretimine etkisi

Mineraller	EPS üretimi (g/l)	Kuru hücre ağırlıkları(g/l)	Final pH
Basal-mineral	5.02 ± 2.76	16.29 ± 0.88	4.67
Çinko (Zn)	5.73 ± 2.17	16.19 ± 1.41	4.85
Demir (Fe)	7.92 ± 0.61	15.35 ± 1.46	5.25
Kalsiyum (Ca)	7.53 ± 0.72	16.22 ± 1.03	4.78
Mangan (Mn)	6.24 ± 70	18.22 ± 3.08	5.29
Potasyum (K)	5.05 ± 1.06	16.17 ± 1.06	4.98
Sodyum (Na)	5.52 ± 0.18	14.87 ± 3.47	5.25

Mineral maddeler ile yapılan optimizasyon aşamasından elde edilen verilen Şekil 3.7' de gösterilmektedir.



Şekil 3.7. Mineral kaynağı tipinin *Cerrena unicolor* (D 30) tarafından EPS üretimine etkisi

### 3.8. İnokulant Yaşı ve Yüzdesinin *Cerrena unicolor* (D 30) Tarafından EPS Üretimine Etkisi

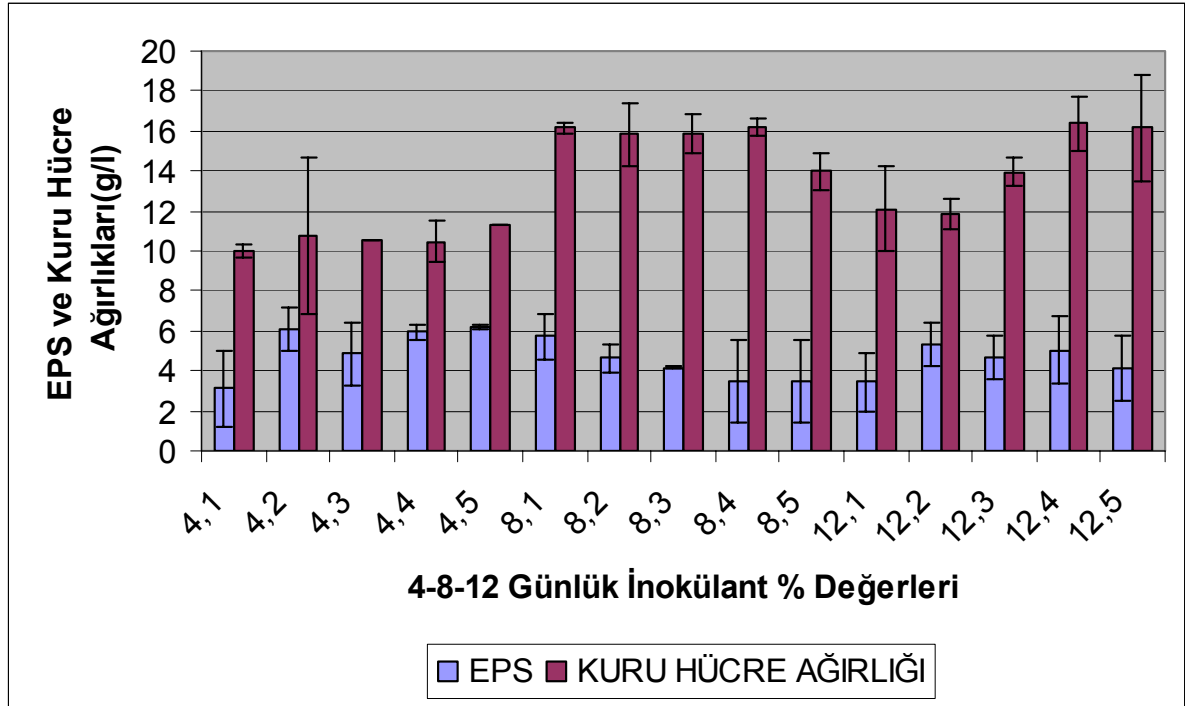
4, 8 ve 12 günlük inkübe edilen besiyeri kullanılmış ve her birinden %1' den % 5' e kadar değişen oranlarda ekim yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.8' de sunulmuştur.

En yüksek EPS üretimi 4 günlük besiyerine % 5 oranında ekim yapılması sonucu 6.21 g/l olarak gerçekleşmiştir.

Çizelge 3.8. İnokulant yaşı ve miktarının *Cerrena unicolor* (D 30) tarafından EPS üretimine etkisi

İnokulant yaşı	İnokulant miktarı (%)	EPS üretimi (g/l)	Kuru hücre ağırlıkları (g/l)	Final pH
4 gün	1	3.10 ± 1.94	10.01 ± 0.31	5.07
	2	6.09 ± 1.12	10.734 ± 3.90	4.91
	3	4.86 ± 1.57	10.58 ± 0.011	4.67
	4	5.94 ± 0.35	10.47 ± 1.05	4.65
	5	6.21 ± 0.09	1131 ± 0.04	4.49
8 gün	1	5.71 ± 1.12	16.15 ± 0.31	5.35
	2	4.62 ± 0.72	15.84 ± 1.58	5.23
	3	4.18 ± 0.07	15.89 ± 1.01	5.26
	4	3.5 ± 2.09	16.21 ± 0.41	5.21
	5	3.49 ± 2.08	13.97 ± 0.89	5.20
12 gün	1	3.46 ± 1.45	12.10 ± 2.10	4.90
	2	5.35 ± 1.11	11.85 ± 0.79	4.56
	3	4.67 ± 1.05	13.96 ± 0.73	4.38
	4	5,03 ± 1,67	16,371 ± 1,33	4.40
	5	4.14 ± 1.66	16.17 ± 2.66	4.40

4, 8 ve 12 günlük inokulantların EPS ve kuru hücre değerleri grafik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.8 İnokulant yaşı ve miktarının *Cerrena unicolor* (D 30) tarafından EPS üretimine etkisi

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

*Cerrena unicolor* (D 30) izolatu tarafından eksopolisakkarit üretimi için optimum koşullarının belirlendiği bu çalışmada, besiyerinde farklı karbon, azot, mineral maddelerin yanı sıra, farklı pH inokulant yaşı ve miktarının EPS üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır.

##### 4.1. Farklı Sıcaklık Değerlerinin *Cerrena unicolor* (D 30) İzolatının Gelişimine Etkisi

Sıcaklık en önemli makrofungusların gelişebilmesi için gerekli en önemli çevresel faktörlerdendir (Jonathan ve Fasidi, 2002). Çalışmada *Cerrena unicolor* için en uygun sıcaklığın belirlenmesi için farklı sıcaklık aralıklarında koloni çapları ölçülerek büyüme değerleri belirlenmiştir. Bu değerler 20, 25, 27, 30 °C' dir. Sonuçlar 1. günden 7. güne kadar her gün ölçülerek tespit edilmiştir. En fazla büyümenin 87 mm ile 30 °C' de 7. günün sonunda gerçekleştiği tespit edilmiştir (Şekil 3.1). 20 °C' de 1. gün sonunda hiç büyüme gözlenmemiştir. 1. günden 7. güne kadar en fazla büyüme 30 °C sıcaklıkta gözlenmiştir.

Jonathan ve Fasidi, (2002) tarafından *Psathyrella atroumbonata* üzerine yapılan çalışmada 10 °C' den 45 °C' ye kadar 5 °C aralıklarla kuru misel ağırlıkları ölçülmüş ve en fazla misel hücresinin 30 °C' de olduğu görülmüştür. Yine Jonathan ve Fasidi, (2003) tarafından *Volvariella esculenta* üzerine yapılan bir başka çalışmada bu kez 0 °C ile 50 °C arasında 5 °C aralıklarla koloni çapları ölçülmüş ve en fazla büyümenin 25 °C ile 35°C arasında gerçekleştiği görülmüştür. Ancak en fazla koloni çapı 15 mm ile 35 °C ile gerçekleşmiştir. 0 °C ile 10 °C arasında ise hiç büyüme kaydedilmemiştir. Jonathan ve Fasidi' ye göre bunun sebebi, bu sıcaklıklarda bu mantarın metabolik aktivitesi için gerekli esansiyel besin maddelerinin absorpsiyonunun düşmesi olabilir. Bununla birlikte 45 ve 50 °C sıcaklıklarda da hiç büyüme gözlenmemiştir. Jonathan ve Fasidi' ye göre bunun nedeni bu sıcaklıklarda fungal metabolik proseslerin yürütülebilmesi için gerekli katalizör enzimlerin denatüre olması olabilir.

Adejoye ve arkadaşları, (2007) tarafından *Schizophyllum commune* üzerine yapılan çalışmada 0-50 °C arasında 5 °C aralıklarla yapılmıştır. *Schizophyllum*



*commune* için optimum sıcaklığın 102.97 mm koloni çapı ile 25 °C’ de gerçekleştiği gözlenmiştir.

Benzer çalışmalarda da görüldüğü gibi makrofungusların optimum büyümesi için gerekli sıcaklık değerlerinin 25 ile 35 °C arasında olduğu söylenebilir.

#### 4.2. Farklı pH Değerlerinin EPS Üretimine Etkisi

Sıcaklıkla birlikte pH da fungus gelişimi için en önemli çevresel faktörlerden biridir (Jonathan ve Fasidi,2002). Besiyeri pH’ı hücre zarı işlevine, hücre görünümü ve yapısına, tuzlarına çözünmesine, substratların iyonik durumuna, çeşitli besinlerin kullanılmasına ve biyosentez ürünlerine etki edebilir (Kim vd., 2002). Makrofungusların gelişimi için gerekli pH aralıkları 5.0 ile 6.5 arasında değişiklik göstermektedir.

Çalışmada besiyerinin başlangıç pH’ ı 4’ ten 8’ e kadar 0,5 aralıklarla 9 farklı ph derecesine ayarlanmıştır. En yüksek EPS üretimi pH 5.5’ te gerçekleşmiştir. Çizelge 3.1’ de de görüldüğü gibi bu değer 0,7 g/l olarak bulunmuştur. En düşük EPS üretimi ise pH 4.0’ da 0.18 g/l olarak gerçekleşmiştir. pH 5.5’ te en yüksek EPS üretimi tespit edilmiş olmasına rağmen, en yüksek kuru hücre ağırlığı ise 3.17 ile pH 7.5’ te bulunmuştur. En düşük EPS üretimi ise 0.18 g/ l ile pH 4.0’ te gerçekleşmiştir.

Kim ve arkadaşları, (2002) tarafından *Cordyceps militaris* üzerine yapılan çalışmada en yüksek EPS üretimi pH 6.0 da 0.29 g/l olarak gerçekleşmiştir. Bununla birlikte maksimum kuru hücre üretimi ise pH 9.0’ da 8.1 g/l olarak gerçekleşmiştir. Yine Kim ve arkadaşları, (2002) tarafından *Cordyceps militaris* üzerine yapılan bir başka çalışmada en yüksek EPS üretimi pH8.0’ da gerçekleşmiştir. Kim ve arkadaşları tarafından, (2002) *Paecilomyces sinclairii* üzerine yapılan çalışmada başlangıç pH değeri 3.0 ile 9.0 arasında ayarlanmış ve EPS ve kuru hücre üretimi bakımından optimum pH 6.0 olarak bulunmuştur.

Hwang ve arkadaşları tarafından, (2003) *Phellinus linteus* üzerine yapılan çalışmada başlangıç pH 3.0 ile 9.0 arasında ayarlanmış, optimum EPS ve kuru hücre üretiminin pH 4.0’ da gerçekleştiği bulunmuştur. Hang-Shu ve arkadaşları, (2004) tarafından *Agaricus blazei* üzerine yapılan çalışmada başlangıç pH 4.0 ile 7.0 arasında 1 birim aralıkla ayarlanmıştır. En yüksek EPS üretimi pH 7.0’ da bulunmuştur. Bu

değer *Agaricus blazei*' nin yüksek pH' a sahip ortamlarda daha iyi geliştiğini göstermektedir. Zhang ve arkadaşları, (2006) tarafından *Tremella aurantialba* üzerine yapılan çalışmada başlangıç pH' ı 7.0 olan besiyerinde en yüksek EPS üretimi 1.97 g/l olarak tespit edilmiştir.

Makrofunguslar optimum gelişimlerini genellikle pH 5.0 ile 7.0 aralığında gerçekleştirmektedirler. Bununla birlikte daha asidik ya da bazik ortamları da tercih edebilmektedirler.

#### 4.3. Farklı Karbon Kaynaklarının EPS Üretimine Etkisi

Besiyerinde karbon kaynağı olarak arabinoz, mannoz, maltoz, galaktoz, ksiloz, glikoz, sukroz ve fruktoz %2 oranında kullanılmıştır. Elde edilen değerler çizelge 3.3' de sunulmuştur. En yüksek EPS üretiminin mannoz ve sukrozda gerçekleştiği görülmüştür. Mannozun pahalı bir şeker olması nedeniyle, sonraki çalışmalarda karbon kaynağı olarak sukroz seçilmiştir. Kuru hücre üretimlerine bakıldığında mannoz kullanılan besiyerinde 2.5 g/l, sukroz kullanılan besiyerinde ise 1.77 g/l olduğu görülmüştür.

Sukroz, çeşitli araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen ve çeşitli makrofungus türleri tarafından eksopolisakkarit üretim koşullarının optimizasyonunu konu alan çalışmalarda, üretimin en fazla olduğu karbon kaynağı olarak seçilmiştir. Örneğin, Kim ve arkadaşları tarafından *Cordyceps militaris*' in çeşitli suşları ile gerçekleştirilen çalışmaların tümünde, karbon kaynağı olarak sukroz kullanılan besiyerinde en yüksek EPS üretimi gerçekleşmiştir. Kim ve arkadaşlarının bu makrofungusun çeşitli suşları ile gerçekleştirdikleri çalışmalarda sukroz kullanılan besiyerinde elde edilen en yüksek EPS üretimi 0.65, 0,95 ve 9.90 g/l olarak gerçekleşmiştir (Kim ve ark., 2001, 2002). Sonuçlar sukrozun bu tür için iyi bir karbon kaynağı olduğunun yanı sıra suşlar arasındaki farklılıkların boyutlarını da vurgulamaktadır.

Benzer olarak, Kim arkadaşları, (2002) tarafından *Paecilomyces sinclairii* üzerine yapılan çalışmada sukroz kullanılan besiyerinde yine en yüksek EPS üretimi 1.3 g/l olarak bulunmuştur. Kim arkadaşları, (2003) tarafından *Phellinus linteus* üzerine yapılan çalışmada sukroz kullanılan besiyerinde 1.6 g/l ile en yüksek EPS üretimi gözlenmiştir.

Xu ve Yun (2003), tarafından *Auricularia polytricha* üzerine yapılan çalışmada en yüksek EPS üretimi yine sukroz kullanılan besiyerinde 1.03 g/l olarak gerçekleşmiştir.

Cardoso ve arkadaşları (2004), tarafından *Botryosphaeria sp.*, üzerine yapılan çalışmada en yüksek EPS üretimi 3.7 g/l değeri ile sukrozda sağlanmıştır.

Fan ve arkadaşları tarafından (2005) *Agaricus brasiliensis* üzerine yapılan çalışmada en yüksek EPS üretimi sukroz kullanılan besiyerinde 6.94 g/l olarak gerçekleşmiştir.

Diğer birçok karbon kaynağının da optimizasyon çalışmalarında farklı türler tarafından tercih edildiği belirlenmiştir. Kim ve arkadaşları, (2003) tarafından *Phellinus gilvus* üzerine yapılan başka bir çalışmada en yüksek EPS üretimi fruktoz kullanılan besiyerinde gözlemlenmiştir.

Kim ve arkadaşları, (2002) tarafından *Paecilomyces tenuipes* üzerine yapılan çalışmada glikoz kullanılan besiyerinde en yüksek EPS üretimi 0.82 g/ l olarak gerçekleşmiştir. Kim ve arkadaşları, (2004) tarafından *Collybia maculata* üzerine yapılan çalışmada maltoz bulunan besiyerinde en yüksek EPS üretimi 0.31 g/l olarak tespit edilmiştir.

Xiao ve arkadaşları tarafından (2003) *Cordyceps jiangxiensis* üzerine yapılan çalışmada en yüksek EPS üretimi maltoz ve gliserol kullanılan besiyerinde 1,73 g/l olarak gerçekleşmiştir.

Görüldüğü gibi çeşitli makrofungus izolatlarının eksopolisakkarit üretim çalışmalarının birçoğunda sukroz en iyi karbon kaynağı olarak bulunmuştur. Bununla birlikte, eldeki örnekler her makrofungus türünün ve hatta suşunun farklı karbon kaynağı ile en iyi EPS üretimini verebileceğini göstermektedir.

#### **4.3.1. Karbon kaynağı (sukroz) yüzdesinin EPS üretimine etkisi**

Çalışmada en yüksek EPS üretimini veren sukroz % 1' den % 5' e kadar besiyerinde kullanılmış, çizelge 3.4' de görüldüğü gibi en iyi EPS değeri % 5 oranında sukroz kullanılan besiyerinde gerçekleşmiştir.

Kim ve arkadaşları, (2002) tarafından *Cordyceps militaris* üzerine yapılan çalışmada en yüksek EPS üretimini veren karbon kaynağı %6 oranında kullanılmıştır. Kim ve arkadaşları, (2002) tarafından *Cordyceps militaris* üzerine yapılan bir başka çalışmada % 3 oranında sukroz kullanılan besiyerinde en yüksek EPS üretimi gözlenmiştir. En yüksek kuru hücre üretimi ise % 4 oranında sukroz kullanılan besiyerinde gerçekleşmiştir. Kim ve arkadaşları tarafından, (2002) *Paecilomyces sinclairii* üzerine yapılan çalışmada % 6 oranında sukroz kullanılan besiyerinde en yüksek EPS üretimi tespit edilmiştir.

#### 4.4. Azot Kaynağı Tipinin EPS Üretimine Etkisi

Besiyerinde azot kaynağı olarak üre, mikolojik pepton, pepton casein, beef extract powder, corn steep liqour, amonyum sülfat, amonyum sitrat, amonyum hidrojen fosfat, amonyum nitrat, amonyum klorid,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$  %2 oranında kullanılmıştır. Negatif kontrol grubunda ise azot kaynağı kullanılmamıştır. En yüksek EPS değeri mikolojik peptonda bulunmuştur. Bu değer çizelge 3.5' de de görüldüğü gibi 2.66 g/l' dir.

*Cordyceps militaris*' in optimizasyonunda en yüksek EPS üretimi polipepton kullanılan besiyerinde 1.19 g/l olarak gerçekleşirken, *Cordyceps militaris*' in farklı bir suşunda corn steep powder kullanılan besiyerinde EPS üretimi 3.1 g/l ile en yüksek oranda gerçekleşmiştir (Kim 2001, 2002).

Kim arkadaşları, (2002) tarafından *Paecilomyces sinclairii* üzerine yapılan çalışmada corn steep powder kullanılan besiyerinde yine en yüksek EPS üretimi 10 g/l olarak bulunmuştur.

Kim arkadaşları, (2003) tarafından *Phellinus gilvus* üzerine yapılan başka bir çalışmada en yüksek EPS üretimi corn steep liqour kullanılan besiyerinde gözlemlenmiştir. Kim arkadaşları, (2003) tarafından *Phellinus linteus* üzerine yapılan çalışmada corn steep powder kullanılan besiyerinde 1.97 g/l ile en yüksek EPS üretimi gözlenmiştir.

Kim arkadaşları, (2001) tarafından *Cordyceps militaris* üzerine yapılan çalışmada corn steep powder kullanılan besiyerinde 1.97 g/ l ile en yüksek EPS üretimi gerçekleşmiştir.

Chun-Ping Xu and Jong-Won Yun<sup>1</sup>, tarafından (2003) *Auricularia polytricha* üzerine yapılan çalışmada en yüksek EPS üretimi malt ekstrakt kullanılan besiyerinde 0.80 g/l olarak gerçekleşmiştir.

Kim arkadaşları, (2002) tarafından *Paecilomyces tenuipes* üzerine yapılan çalışmada corn steep powder kullanılan besiyerinde en yüksek EPS üretimi 0.82 g/l olarak gerçekleşmiştir. Kim arkadaşlar, (2004) tarafından *Collybia maculata* üzerine yapılan çalışmada marton A-1 bulunan besiyerinde en yüksek EPS üretimi 0.60 g/l olarak tespit edilmiştir. Zhang ve arkadaşları, (2006) tarafından *Tremella aurantialba* üzerine yapılan çalışmada casamino acid kullanılan besiyerinde en yüksek EPS üretimi 1.98 g/l olarak gerçekleşmiştir. Ayrıca en yüksek kuru hücre üretimi de casamino acid kullanılan besiyerinde 25.8 g/l olarak gerçekleşmiştir. Fan ve arkadaşları ,(2005) tarafından *Agaricus brasiliensis* üzerine yapılan bir çalışmada yeast ekstrakt kullanılan besiyerinde 9.468mg/50 ml EPS üretildiği bulunmuştur. Lin ve Sung, (2005) tarafından *Antrodia cinnamomea* üzerine yapılan çalışmada kalsiyum nitrat kullanılan besiyerinde 0.75 g/l olarak en yüksek EPS üretimi gerçekleşmiştir.

Cho ve arkadaşları, (2006) tarafından 1.50 *Tremella fuciformis* üzerine yapılan çalışmada tripton kullanılan besiyerinde en yüksek EPS değeri bulunmuştur. Bu değer 1.50 g/l' dir.

Kim ve arkadaşları, (2006) tarafından *Ganoderma resinaceum* üzerine yapılan çalışmada corn steep liqour kullanılan besiyerinde 1.07 g/l olarak gerçekleşmiştir.

Makrofungusların besiyerinde farklı karbon istekleri olduğu gibi, farklı azot isteklerinin olduğu göze çarpmaktadır. *Cordyceps militaris* örneğinde olduğu gibi bir türün farklı suşlarında da farklı azot istekleri olduğu görülmektedir.

#### **4.4.1. Azot kaynağı (mikolojik pepton) yüzdesinin EPS üretimine etkisi**

Besiyerinde en yüksek EPS üretimi gösteren mikolojik pepton %1' den % 5' e kadar farklı oranlarda denenmiş, bu oranlardan % 5 oranında mikolojik pepton kullanılan besiyerinde en yüksek EPS üretimi görülmüş. Çizelge 3.6' da da görüldüğü gibi 5.83 g/ l olarak gerçekleşmiştir. Bununla birlikte yine bu oranda en yüksek kuru hücre üretimi de 19 g/l olarak gerçekleştiği görülmüştür. En düşük EPS üretimi ise amonyum hidrojen fosfat kullanılan besiyerinde 0.23 g/l, en düşük kuru hücre ağırlığı ise üre kullanılan besiyerinde 1.22 g/l olarak gerçekleşmiştir.

Kim ve arkadaşları, (2002) tarafından *Cordyceps militaris* üzerine yapılan çalışmada en yüksek EPS üretimini veren azot kaynağı olan corn steep powder %10 oranında kullanılmıştır. Cha ve arkadaşları (2004), tarafından *Cordyceps sinensis* üzerine yapılan çalışmada azot kaynağı olarak % 9 oranında yeast ekstrakt kullanıldığında en yüksek EPS üretimi 8.1 g/l olarak gerçekleşmiştir.

Kim ve arkadaşları, (2006) tarafından *Ganoderma resinaceum* üzerine yapılan çalışmada soy pepton % 10 oranında kullanılmıştır.

Benzer çalışmalarda da görüldüğü gibi besiyerinde kullanılan azot miktarı arttıkça EPS üretiminde de artış gözlenmektedir.

#### 4.5. Mineral Madde Tipinin EPS Üretimine Etkisi

Çalışmada kalsiyum ( $\text{CaCO}_3$ ), demir ( $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), sodyum ( $\text{NaNO}_3$ ), mangan ( $\text{MnSO}_4$ ), çinko ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) ve potasyum ( $\text{KNO}_3$ ) besiyerinde 5 mM oranında kullanılmıştır. Bu elementler makrofunguslarda misel büyümesi için en çok tercih edilen biyoelementlerdir (Park ve Kim, 2000). Demir ve kalsiyum kullanılan besiyerlerinde EPS üretimi sırasıyla 7.92 g/l, 7.53 g/l olarak bulunmuş ve Çizelge 3.7' de sunulmuştur. Bununla birlikte mineral madde kullanılmayan besiyerinde de EPS üretimi 5.02 g/l olarak bulunmuştur.

Kim ve arkadaşları (2002) tarafından *C. militaris* üzerine yapılan çalışmada  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  kullanılmış ve en yüksek EPS üretimi 1.82 g/l ile  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  kullanılan besiyerinde gerçekleşmiştir. *C. militaris* üzerine yapılan başka bir çalışmada en yüksek EPS üretimi  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  kullanılan besiyerinde 2.2 g/l olarak gerçekleşmiştir.

Kim ve arkadaşları (2002), tarafından *Phellinus gilvus* üzerine yapılan çalışmada en yüksek EPS üretimi Mg ( $\text{MgSO}_4$ ) kullanılan besiyerinde 2.80 g/l olarak gerçekleşmiştir. Kim ve arkadaşları tarafından (2002) *Paecilomyces sinclairii* üzerine yapılan çalışmada en yüksek EPS üretimi K ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) kullanılan besiyerinde 4.4 g/l olarak gerçekleşmiştir.

Kim ve arkadaşları, (2003) tarafından *Phellinus linteus* üzerine yapılan çalışmada en yüksek EPS üretimi Ca ( $\text{CaCl}_2$ ) kullanılan besiyerinde 2.03 g/l olarak gerçekleşmiştir.

Ping Xu ve Won Yun (2003) tarafından *Auricularia polytricha* üzerine yapılan çalışmada en yüksek EPS üretimi  $K_2HPO_4$  kullanılan besiyerinde 1.43 g/l olarak gerçekleşmiştir. Aynı zamanda kuru hücre üretimi de en yüksek oranda 6.93 g/l bu mineralin kullanıldığı besiyerinde gerçekleşmiştir.

Kim ve arkadaşları, (2006) tarafından *Ganoderma resinaceum* üzerine yapılan çalışmada  $MnCl_2$  kullanılan besiyerinde EPS üretimi 1.58 g/l olarak gerçekleşmiştir.

Makrofungusların gelişimleri için en iyi biyoelementlerden biri olarak bilinen  $K_2HPO_4$  birçok mantar türünde en yüksek EPS üretimini sağlamaktadır.

#### 4.6. İnokulant Yaşı ve Yüzdesinin EPS Üretimine Etkisi

Çalışmada 4,8 12 günlük inokulum besiyerinde %1' den % 5' e kadar farklı oranlarda kullanılmıştır. En yüksek EPS üretimi Çizelge 3.8' de de görüldüğü gibi 4 günlük inokulanttın % 5 oranında kullanıldığında 6,21 g/l olarak gerçekleşmiştir. En düşük EPS üretimi ise 4 günlük inokulanttın % 1 oranında kullanıldığında gerçekleşmiştir. Bu değer ise 3,1 g/l' dir.

#### 4.7. Sonuç

Daha önce *Cerrena unicolor* tarafından üretilen EPS' lerin kullanıldığı fareler üzerinde yapılan hipoglisemik aktivite çalışmasında oral yol ile alınan EPS' lerin hipoglisemik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Yamaç ve ark., 2007). *Cerrena unicolor* D 30' un optimizasyonun yapıldığı bu çalışmada en yüksek EPS değerinin elde edilmesi için besiyerinde farklı besin maddeleri kullanılmış ve bununla birlikte farklı çevresel koşullar da denenmiştir. Hipoglisemik aktiviteye sahip *Cerrena unicolor*' dan elde edilen EPS' lerin ilerleyen yıllarda ticari anlamda karlı bir üretiminin sağlanabilmesi, maksimum EPS üretimini verebilmesi için optimizasyonu yoluna gidilmiştir. Tıbbi olarak antitümör, antioksidan, hipoglisemik, antimikrobiyal, hipoglisemik, hipolipidemik, karaciğeri koruyucu, antialerjik ve bağışıklık sistemini güçlendirici etkileri olduğu bilinen *Ganoderma carnosum*, *Lentinus edodes* gibi mantarların çok uzun yıllardan beri özellikle Uzakdoğu' da tabletler halinde ticari preparat olarak kullanımı bulunmaktadır. Özellikle shiiteke mantarı olarak bilinen

*Lentinus edodes* artık Avrupa ve Amerika' da da yoğun olarak tedaviye destek olarak kullanılmaktadır. Hipoglisemik aktiviteye sahip olan *Cerrena unicolor* da karakterizasyonu yapıp, *in-vivo* ve *in-vitro* koşullarda çalışmalarının yapılmasının ardından diyabet hastalarında da kullanılabilir hale gelebilir. Özellikle oral yol ile alınıp kan- şeker seviyesini dūřürmesi bu mantar için bir avantaj olarak göze çarpmaktadır. Bu aşamada optimizasyonu da önem kazanmaktadır.



## KAYNAKÇA

Anke, H., Bergendorff, O., Sterner, O., 1989, Assays of the Biological Activities of Guaine Sesquiterpenoids Isolated from the Fruit Bodies of Edible *Lactarius Species*. Fd Chem. Toxic., 27(6),393-397.

Anonim, 2004, <http://www.lsbu.ac.uk/water/hygly.html>

Bobek, P., Ginter, E., Jurcovicova, M., Kuniak, L., 1991, Cholesterol-lowering Effect of the Mushroom *Pleurotus ostreatus* Pereditary Hypercholesterolemic rats. Ann. Nutr. Metab.35, 191-195.

Boztok K., Erkip N., 2003 Meşe Mantarının (*Lentinus edodes*) Ağaç Kütükleri Üzerinde Yetiştiriciliği 39,149-155

Brock, T.D. and Madigan M.T., 1994, Biology of Microorganism, Seventh Edition, Prentice-Hall International Inc. P899,1054.

Cardoso S., Lourdes M., Silva A., Obert M., Dekker and Barbosa 2004 Comparison of Botryosphaeran Production by the Ascomyceteous Fungus *Botryosphaeria sp.*, Grown on Different Carbohydrate Carbon Sources, and Their Partial Structural Features 6,480-486

Cui, J. And Chisti, Y., 2003, Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor* Physiological Activity, Uses and Production, Biotechnology Advances 21,109-122

Daba, A.S. and Ezereonye, O.U., 2003 Anti-cancer Effect of Polysaccharides isolated From Higher Basidiomycetes Mushrooms, African Journal of Biotechnology, 2,672-678

Demirhan A., Yel Ö.F., Yıldız A., Gül K., 2007 Bazı Makrofungus Türlerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Bir Çalışma 19 (4), 425-433

Dong, Y., Kwan, C.-Y., Chen, Z.-N and Yang M.-M.-P.,1998, Antitumor Effects of a Refined Polysaccharide Peptide Fraction Isolated From *Coriolus Versicolor*: *In-vitro* and *in-vivo* Studies, *Asia Pacific Bio Tech News*,2,71-75

Duman, R., Doğan, H.H., Ateş, A., 2003 *Morchella conica*(Pers.) Boudier ve *Suillus lutesus* (L.) S.F. Gray Makrofunguslarının Antimikrobiyal aktiviteleri

Dülger,B., ve Şen, F., 1999, *Russula delica* Fr. Makrofungusunun Antimikrobiyal Aktivitesi, *Tr.J. of Biology*,23,127-133

Espenshade, M.A., Griffith, E.W.,1966, Tumor Inhibiting basidiomycetes isolation and cultivation in the laboratory. *Mycologia*. 58(4), 511-517.

Fang Q.H and Zhong J.J., 2002, Effect of Initial pH on Production of Ganoderic Acid and Polisaccharide by Submerged Fermentation of *Ganoderma lucidium*, *Process Biochemistry*, 37,769-774

Ger, E., Angelucci, J. And Coleman, P., 1997 Activity of Shiitake and Maitake Mushrooms, *Delaware Medical Journal*,69,149-151

Gücin, F., 1983 Elazığ İli Sınırları İçerisinde Yetişen Bazı Makrofunguslar Üzerinde Taksonomik Bir Araştırma (Doktora Tezi), E.Ü. Fen-Fak. Biyoloji Bölümü, İzmir

Hatvani, N., 2001, Antibacterial Effect of the Culture Fluid of *Lentinus edodes* Mycelium Grown in Submerged Liquid Culture. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17,71-74.

Hwang H.J,Kim S.V., Xu C.P., Choi J. W. And Yun J.W. 2002 Production and Molecular Characteristic of Four Groups of Exopolysaccharides From Submerged Culture of *Phellinus Gilvus*

Hwang H.J., Kim S.V., Xu C.P., Choi J. W. And Yun J.W 2001 Influence of nutritional conditions on the mycelial growth and exopolysaccharide production in *Paecilomyces sinclairii* 34,389-393

Hwang H.J., Kim S.V., Xu C.P., Choi J. W. And Yun J.W 2001 Mycelial Growth And Exo-Biopolymer Production by Submerged Culture of Various Edible Mushrooms Under Different Media 34,56-61

Hwang H., Kim S., Wonchoi J., Wonyun J., 2003 Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC6190 33,309-319

Hwang H.J., Kim S.W., Xu C.P., Choi J.W. and Yun J.W. 2002 Production And Molecular Characteristics of Four Groups of Exopolysaccharides From Submerged Culture of *Phellinus gilvus* 94,708-719

Jonathan S.G. and Fasidi I.O. 2002 Studies on *Psathyrella Atroumbonata* (Pegler ), a Nigerian Edible Fungus 81,481-484

Jonathan S.G. and Fasidi I.O., Ajayi E.J. 2003 Physico-chemical Studies on *Volvariella esculenta* (Mass) Singer, a Nigerian Edible Fungus 85,339-342

Kim, D.H., Shim, S.B., Kim, N.J., Jang, I.S., 1999, B-Glucuronidase-Inhibitory Activity and Hepatoprotective Effect of *Ganoderma lucidum*. Biol. Pharm. Bull. 22(2), 162-164.

Kim, S., Ping Xu C., Hwang H., Wonchoi J., Kim C., WonYun J. 2002 Production and Characterization of Exopolysaccharides from an Entomopathogenic Fungus *Cordyceps militaris* NG3 712-714

Kim Y., Cho, -S., Eom -J, and Shin W 2002 Purification and Characterization of a Laccase from *Cerrena unicolor* and Its Reactivity in Lignin Degradation 23,985-989

Ledakowicz L.S., Ledakowicz S., Michniewicz A. 2007 Bio-scoring of Linen Fabrics with Laccase Complex From *Cerrena unicolor* 5/15,92-103

Lin E.,S. And Sung S.,2005 Cultivating Conditions Influence Exopolysaccharide Production by the Edible Basidiomycete *Antrodia Cinnamomea* in Submerged Culture

Maziero, R., Cavazzoni, V. and Bononi, V.,1999, Screening of Basidiomycetes for the Production of Exopolysaccharide and Biomass in Submerged Culture, *Revista De Microbiology*,30,77-84

Mizuno, T., Inagaki, R., Kanao, T., Hagiwara, T., Nakamuro, T., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T., Asakura, A., 1990, Antitumor Activity and Some Properties of Water-insoluble Hetero-glycans from "Himematsutake" the Fruiting Body of *Agaricus blazei* Murill. *Agric. Biol. Chem.*, 54(11),2897-2905.

Ocak, İ., Doğan S., Ayyıldız N., Hasenekoğlu İ.,2007 Akarlardan İzole Edilmiş Entomopatojen Bir Fungus Türü: *Bauveria bassiana*

PingXu C, WooKim S., Hwanga J., and WonYun L.,2002 Application of Statistically Based Experimental Designs for The Optimization of Exo-Polysaccharide Production by *Cordyceps militaris* NG3 36, 127-131

Rau, U.,2004, Glukans Secreted by Fungi, *Turkish Electronic Journal of Biotechnology*, 2.30-36

Suay, I., Arenal, F., asensio, F.J., Basilio, A., Cabello, M.A., Diez, M.T., Garcia, J.B., Val, A.G., Gorrochategui, J., Hernandez, P., Pelaez, F., Vicente M.F., 2000 Screening of Basidiomycetes for Antimicrobial Activities, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 78, 129-139.

Sutherland, I. W., 1994, Structure-function Relationships in Microbial Polysaccharides, *Biotech.Adv.*, 12,393-448

Tamer, A.Ü., Gücin, F., Solak, M.H., 1990, *Ganoderma Lucidium* (Leys, Ex Fr.) Karst. Makrofungusunun Antimikrobiyal Aktivitesi, X. Ulusal Biyoloji Kongresi, 18-20 Temmuz, Bildiriler Kitabı, Sayfa 51-57, Erzurum

Tavares, A.P.M., Agapito, M.S.M., Coelho,M.A.Z.,Lopez da Silva, J.A.,Barros-Timmons, A., Countinho,J.A.P. and Xavier A.M.R.B.,2005 Selection and Optimization of Culture Medium for Exopolysaccharide Production by *Coriolus (Trametes) versicolor*, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*,21,1499-1597

Xiao J.H., Chen D.X., J.W. , Liu Z.L.,Liu ,W., Wan H. , Fang N. , Xiao Y. , Qi Y. And Liang Z.Q. 2003 Optimization of Submerged Culture Requirements for The Production of Mycelial Growth and Exopolysaccharide by *Cordyceps Jiangxiensis* JXPJ0109 96,1105-1116

Xu C., and Wonyun J., 2003 Optimization of Submerged Culture Conditions for Mycelial Growth and Exo-biopolymer Production by *Auricularia polytricha* (woodearsfungus) Using The Methods of Uniform Design and Regression Analysis 38,193-199

Wasser, S.P., 2002, Medicinal Mushrooms as a Source of Antitumor and Immunomodulating Polysaccharides. *Appl. Microbial. Biotechnol*, 60,258-274.

Yang, B.K., Ha, S.Y., Jeong, S.C., Jeon, Y.J., Ra, K.S., Das, S., Yung, J.W., Sang, C.H., 2002, Hypolipidemic Effect of an Exo-Biopolymer Produced from Submerged Mycelial Culture of *Auricularia polytricha* in Rats. *Biotechnology Letters*, 24, 1319-1325.

Yamaç, M., Zeytinoglu, M., Kanbak, G., Bayramoglu, G., Şenturk, H., Hypoglycemic Effect of Crude Exopolysaccharides Produced by *Cerrena unicolor* (Bull.) Murrill (Polyporaceae), *Coprinus comatus* (O.F. Müll.) Pers. (Agaricaceae), and *Lenzites betulina* (L.) Fr. (Polyporaceae) Strains in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats, *Pharmaceutical Biology*, 47 (2), 2009, accepted - in press

Yılmaz, M., Çelik, G.Y., 2007 Bakteriyel Ekstrasellüler Polisakkaritler (EPS) 5,2-7