Seçilen *Ganoderma* İzolatlarının Biyolojik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

Göksu Ceylan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ocak 2020

Evaluation of Biological Activities by Selected *Ganoderma* Isolates

Göksu Ceylan

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

January 2020

Seçilen *Ganoderma* İzolatlarının Biyolojik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

Göksu Ceylan

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Yamaç

Ocak 2020

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Mustafa YAMAÇ danışmanlığında hazırlamış olduğum "Seçilen Ganoderma İzolatlarının Biyolojik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi" başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 20/01/2020

Göksu Ceylan

İmza

ÖZET

Bu çalışmada DPPH radikal süpürücü aktiviteleri ile gerçekleştirilen tarama sonrası seçilen 4 *Ganoderma* izolatının kültür sıvısı ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktların antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksik etkisi araştırılarak değerlendirilmiştir.

Antioksidan aktivitenin araştırılması amacı ile DPPH radikal süpürücü aktivite, redükleyici güç, metal şelatlayıcı aktivite ve beta-karoten linoleik asit yöntemi uygulanmıştır. OBCC 6069 kodlu izolat ekstraktının DPPH süpürücü aktivite yönteminde 1,934 mg/ml, redükleyici güç 0,416 mg/ml ve metal şelatlayıcı aktivite yönteminde 2,730 mg/ml EC_{50} değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Antimikrobiyal aktivitenin araştırılması için disk difüzyon yöntemi uygulanmış ve *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) suşlarına karşı antimikrobiyal etki gözlemlenmiştir. MİK ve MBK deneyleri uygulanarak etkin dozlara ulaşılmıştır. MTT yöntemi ile izolat ekstraktının sitotoksik etkisinin araştırılması ardından, OBCC 3 ve OBCC 5109 kodlu izolatların apoptotik etki varlıkları sorgulanmıştır.

Anahtar kelimeler: Makrofungus, Antioksidan aktivite, Sitotoksik aktivite, Antimikrobiyal aktivite

SUMMARY

In the study, it was investigated antioxidant, antimicrobial and cytotoxic effects of 4 *Ganoderma* isolates which were selected a screening program depends on their DPPH radical scavenging activities.

DPPH radical scavenging activity, reducing power, metal chelating activity and beta-carotene linoleic acid method have been applied for the investigation of antioxidant activity. The OBCC 6069 coded isolate extract was determined to have 1.934, 0.41 and 2.730 mg/ml EC_{50} values for DPPH radical scavenging, reducing power and metal chelating activities, respectively. To determine antimicrobial activity, disc disfussion method was applied and antimicrobial effect was observed against *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) strains. Effective doses have been obtained by applying MIC and MBC experiments. After determining of the cytotoxic effect of isolate extracts with MTT assay, the presence of apoptotic effect of OBCC 3 and OBCC 5109 coded isolates was researched.

Keywords: Macrofungus, Antioxidant activity, Cytotoxic activity, Antimicrobial activity

TEŞEKKÜR

Tez danışmanlığımı üstlenen, bilgisini hiçbir zaman esirgemeyen, çalışmalarımın planlanmasında ve yürütülmesinde desteğini her koşulda devam ettiren sevgili hocam Prof. Dr. Mustafa Yamaç' a teşekkür ederim. Tez süresince değerli bilgileri ve yardımları ile yanımda olan Doç. Dr. Zerrin Cantürk'e çok teşekkür ederim.

İzolasyonların yapıldığı *Ganoderma* cinsine ait örnekleri sağlayarak tezime olan katkıları için Yakup Erdem hocam' a ve 'Türkiye Mantar Avcıları' grup üyelerine teşekkürü borç bilirim. Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü' nde korunan *Ganoderma* izolatlarını çalışmamda kullanmam için benimle paylaşan Dr. Mustafa Kemal Soylu' ya ve bazı izolatların identifikasyonunu yaparak tezime önemli katkıda bulunan Prof. Dr. Hasan Hüseyin Doğan'a çok teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olduğunu bildiğim canım arkadaşım Seda Hacıoğlu'na bu süreçte bana olan tüm desteği için çok teşekkür ederim. Çalışmalarım sırasındaki yardım ve destekleri için Bahar Gülce Korkmaz'a ve Şafak Zeybek'e çok teşekkür ederim. Bu yolda ilerlememde tüm destekleri ve öğrettikleri için Ayşe Betül Karaduman'a ve Melike Çetin'e teşekkür ederim.

Daha önce olduğu gibi lisansüstü eğitimim sürecinde de beni destekleyen ve her koşulda arkamda olduklarını bildiğim canım annem Handan Ceylan'a ve canım abim Gökay Ceylan'a ne kadar teşekkür etsem az olur.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET ... vi
SUMMARY ... vii
TEŞEKKÜR ... viii
İÇİNDEKİLER ... ix
ŞEKİLLER DİZİNİ ... xii
ÇİZELGELER DİZİNİ ... xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ... xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ ... 1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI ... 2
2.1. Antioksidanlar ve Serbest Radikaller ... 2
2.1.1. Serbest radikaller ... 2
2.1.2. Antioksidanlar ... 4
2.1.2.1. Antioksidan enzimler ... 5
2.1.2.2. Antioksidan tayin yöntemleri ... 6
2.2. Antikanser Aktivite ... 8
2.2.1. Nekroz ... 8
2.2.2. Apoptoz ... 9
2.3. Antimikrobiyal Aktivite ... 9
2.3.1. Antimikrobiyal Aktivite Tayin Yöntemleri ... 9
2.3.1.1. Dilüsyon testi ... 9
2.3.1.2. Disk difüzyon testi ... 10
2.4. Makrofungusların Önemi ve Yapılan Bazı Çalışmalar ... 10
3. MATERYAL VE YÖNTEM ... 14
3.1. Materyal ... 14
3.1.1. Makrofungus izolatları ... 14
3.1.2. Antimikrobiyal aktivite tayininde kullanılan test mikroorganizmaları ... 18
3.1.3. Sitotoksik Etkinin Araştırılmasında Kullanılan Hücre Hatları ... 19
3.1.4. Besiyerleri ... 19
3.1.5. Kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler ... 21
3.1.6. Cihazlar ... 22
3.2. Yöntem ... 24

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2.1. Yüksek antioksidan aktiviteye sahip izolatların seçimi 24
3.2.1.1. Makrofungus izolatlarının aktiflenmesi, üretilmesi ve kültür sıvısı eldesi 24
3.2.1.2. DPPH radikal süpürücü aktivite yöntemi 25
3.2.1.3. Kültür sıvılarının fenolik madde içeriklerinin belirlenmesi 25
3.2.3. Seçilen makrofungusların kültür sıvısı ekstraksiyonu 27
3.2.2. Antioksidan Aktivite Tayini....28
3.2.2.1. DPPH radikal süpürücü aktivite tayini 28
3.2.4.2. Redükleyici güç ölçümü ile antioksidan aktivite tayini 29
3.2.4.3. Metal şelatlayıcı aktivite tayini 30
3.2.4.4. Beta karoten–lineloik asit yöntemi 31
3.2.4.5. Toplam fenolik madde miktarı tayini 31
3.2.3. Sitotoksisite Tayini 31
3.2.3.1. Hücrelerin kültür ortamında çoğaltılması 31
3.2.3.2. MTT yöntemi ile sitotoksik aktivite 32
3.2.3.3. Akış sitometride Annexin V-PI yöntemi ile apoptotik etkinin belirlenmesi.... 33
3.2.4. Antimikrobiyal Aktivite Tayini 33
3.2.4.1. Disk difüzyon yöntemi.... 34
3.2.4.2. Minimal inhibitör konsantrasyon yöntemi (MİK) 34
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 36
4.1. DPPH yöntemi ile yüksek antioksidan aktiviteye sahip kültür sıvısının belirlenmesi 36
4.2. Seçilen makrofungusların antioksidan aktivitesinin araştırılması....40
4.2.1. DPPH radikal süpürücü aktivite tayini....40
4.2.2. Redükleyici güç ölçümü ile antioksidan aktivite tayini 43
4.2.3. Metal şelatlayıcı aktivite tayini....46
4.2.4. Beta karoten – lineloik asit yöntemi 48
4.2.5. Toplam fenolik madde miktarı tayini....51
4.3. Sitotoksisite Tayini 53
4.3.1. MTT yöntemi ile sitotoksik aktivite....53
4.3.2. Akış sitometride Annexin V-PI yöntemi ile apoptotik etkinin belirlenmesi....55
4.4. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi 60
4.4.1. Disk difüzyon yöntemi....60

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.4.2. Minimal inhibitör konsantrasyon yöntemi (MİK).....64
5. SONUÇ VE ÖNERİLER..... 67
KAYNAKLAR DİZİNİ..... 69

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil **Sayfa**

2.1 Serbest radikaller ve antioksidanlar arasında yaşanan dengesizlik…….……3

2.2 Disk difüzyon yöntemi uygulanan petri görüntüsü ……...…….…….....…10

3.1 Tarama çalışmasında kullanılan bazı *Ganoderma* izolatlarına örnekler…….....…14

3.2 OBCC 6061, OBCC 6069, OBCC 3, OBCC 5109 kodlu izolatların PDA besiyerindeki misel gelişimleri……..…….……..……..25

3.3 Standart eğri için hazırlanan gallik asit konsantrasyon serisi…….…….26

3.4 Ekstraksiyon işlemi sırasında oluşan etil asetat-kültür sıvısı faz ayrımı…….……28

3.5 BHT'nin farklı konsantrasyonlarının gösterdiği renk değişimi ……...29

3.6 Askorbik asit'in farklı konsantrasyonlarının gösterdiği renk değişimi ……29

4.1 İzolatların DPPH radikal süpürücü aktivite tayini renk değişimleri …….……..……41

4.2 İzolatların redükleyici güç tayini renk değişimleri……..……..44

4.3 İzolatların metal şelatlama aktivite tayini ile elde edilen renk değişimleri…….……..47

4.4 İzolatların fenolik madde içeriklerine göre renk değişimleri ……...52

4.5 İzolat ekstraktlarının MCF-7 hücre hattı üzerine olan sitotoksik etkisi…….....……...…..54

4.6 İzolat ekstraktlarının 3T3 hücre hattı üzerine olan sitotoksik etkisi……..…….……...55

4.7 OBCC 3 ve OBCC 5109 kodlu izolatların 3T3 hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri…..……...58

4.8 OBCC 3 ve OBCC 5109 kodlu izolatların MCF-7 hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri…..…..59

4.9 *P. aeruginosa* a: MİK plaka görüntüsü b: MBK petri görüntüsü ……..65

4.10 *E.coli* a: MİK plaka görüntüsü b: MBK petri görüntüsü…….……...65

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge **Sayfa**

3.1 Tarama çalışmasında kullanılan makrofungus izolatları……..…….…….15

3.2 Makrofungus kültür sıvıvı ekstraktının antimikrobiyal etkilerinin araştırılmasında kullanılan test mikroorganizmaları……...……18

3.3 Makrofungus izolatlarının sitotoksik aktivitesinin araştırıldığı hücre hatları…….…….....…19

3.4 Çalışmalar esnasında kullanılan kimyasal maddeler, çözeltiler ve kullanım alanları…….…....21

3.5 Çalışmalar süresince kullanılan cihazlar ve markaları…….…….23

3.6 Tarama çalışmasında kullanılan gallik asit standart eğrisi……..…….…....26

4.1 Makrofungus izolatlarının DPPH radikal giderimi, toplam fenolik madde içerikleri ve biyomas ağırlıkları……..……...…….….36

4.2 İzolatların ve bilinen antioksidanların DPPH radikal süpürücü antioksidan aktivite testi için EC_{50} değerleri……..……...……..40

4. 3 Makrofungus izolatlarının bazı diğer çalışmalarla kıyaslanması…….…….…….…42

4.4 İzolatların ve bilinen antioksidanların redükleyici güç testi için EC_{50} değerleri…..……..….....43

4.5 Makrofungus izolatlarının redükleyici güç ile elde edilen EC_{50} değerlerinin bazı diğer çalışmalarla kıyaslanması……..……...…….…..45

4.6 İzolatların metal şelatlama aktivite tayini ile elde edilen EC_{50} değerleri……..……..……..46

4.7 Beta karoten- linoleik asit yöntemi ile renk koruma yüzdeleri…….……49

4.8 Makrofungus izolatlarının ve bazı diğer çalışmaların % renk korumalarının karşılaştırılması….50

4.9 İzolatların gallik asit eşdeğeri cinsinden toplam fenolik madde miktarı değerleri……...…51

4.10 Makrofungus izolatlarının ve bazı diğer çalışmaların toplam fenolik madde miktarlarının karşılaştırılması……..53

4.11. İzolat ekstraktlarının sitotoksik etki IC_{50} değerleri…….……..54

4.12 OBCC 3 ve OBCC 5109 kodlu izolatların 3T3 ve MCF-7 hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri…….……...57

4.13 Disk difüzyon yönteminde kullanılan test organizmaları ve elde edilen zon çapları……..…....61

4.14 *G. lucidum* ekstraktının disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesi ……..…….…..62

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

Çizelge **Sayfa**

4.15 Farklı makrofungusların disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesi ……...63

4.16 Makrofungus izolatlarının MİK ve MBK değerleri……..……..……64

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
CO_2	Karbondioksit
H_2O	Su
$O_2^{\cdot -}$	Süperoksit radikali
H_2O_2	Hidrojen peroksit
$OH^{\cdot}$	Hidroksil radikali
$^1O_2$	Singlet oksijen
$ROO^{\cdot}$	Peroksil radikali
$LOO^{\cdot}$	Lipit peroksil
$RO^{\cdot}$	Alkoksil
$NO^{\cdot}$	Nitrik Oksit
NO_2	Nitrojen dioksit
HOCl	Hipoklorik asit
O_3	Ozon
ONOO-	Peroksinitrit
N_2O_3	Dinitrojen trioksit
LOOH	Lipit peroksit
HNO_2	Nitrik asit
Fe^{+3}	Ferrik demir
Fe^{+2}	Ferrus demir
Cu^{+2}	Bakır iyonu
$K_3[Fe(CN)_6]$	Potasyum ferrisiyanid
EC_{50}	Etkin konsantrasyon 50
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
HAT	Hidrojen atom transferi
ET	Elektron transferi
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
ROT	Reaktif oksijen türleri

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mantarlar binlerce yıl öncesinden günümüze kadar birçok süreçte insanların hayatında yer almaktadır. Besin olarak tüketildikleri gibi tıbbi özellikleriyle de insan hayatında bulunmuşlardır. *Ganoderma lucidum* (Reishi), *Lentinus edodes* (Shiitake), *Inonotus obliquus* (Chaga) gibi mantarlar Kore, Çin, Japonya ve Doğu Rusya'da insanlar tarafından doğadan toplanıp kullanılmıştır. Özellikle Uzak Doğu'da tıbbi öneme sahip olan mantarlar kaynatılarak tüketilmektedirler (Wasser, 2002).

Mantarlar alkaloidler, lektinler, lipitler, peptidoglikanlar, fenolikler, poliketitler, polisakkaritler, proteinler, polisakkarit protein / peptitler, steroidler, terpenoidler gibi birçok biyoaktif metabolite sahiptirler. Bu denli çeşitli metabolitler aracılığı ile antibakteriyel, antifungal, antienflamatuar, antioksidan, antiviral, sitotoksik, hepatoprotektif, hipokolesterolemik, hipoglisemik gibi birçok aktivite göstermektedirler (Agrawal ve Dhanasekaran, 2019).

Mantarların farmakolojik özellikleri ile ilgili literatürden edinilen bilgiler ışığında çalışmamızda ilk olarak 54 adet makrofungus izolatının DPPH radikal süpürücü aktivitesi araştırılmıştır. Araştırılan izolatlar arasından yüksek aktivitesi ile ilk sıralarda yer alan dört izolat sonraki araştırmalar için seçilmiştir. Seçilen izolat ekstraktları ile ilk olarak DPPH radikal süpürücü, metal şelatlayıcı, beta karoten-linoleik asit yöntemi ve redükleyici güç ölçümü ile antioksidan aktivite yöntemleri uygulanmıştır. Ayrıca, ekstraktlarda bulunan toplam fenolik madde miktarı da belirlenmiştir. Antioksidan aktivitenin, sitotoksik etki ile olan ilişkisi göz önüne alınıp izolat ekstraktlarının sitotoksisitesi ve apoptotik etkilerinin varlığı sorgulanmıştır. Aynı zamanda izolat ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon yöntemi ile araştırılmış, seçilen test mikroorganizmaları için minimal inhibitör ve bakterisidal konsantrasyonlar belirlenmiştir.

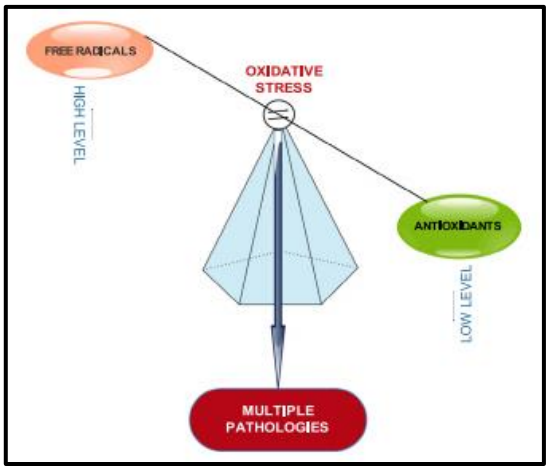
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Antioksidanlar ve Serbest Radikaller

2.1.1. Serbest radikaller

Serbest radikaller, atomunda eşleşmemiş elektron taşıyan ve hücrelerin duyarlı kısımlarına saldırarak hasara sebebiyet veren moleküllerdir (Okçu ve Keleş, 2009). Serbest radikaller kararlı hale getirilemediği taktirde vücutta DNA'ya, lipitlere, proteinlere ve karbonhidratlara zarar vermektedir. Antioksidanların yeterli olmayıp reaktiflerin nötralize edilmemesi durumlarında zarar verdikleri yapıların hasar almaları sonucu olarak damar sertliği (ateroskleroz), Parkinson ve Alzheimer gibi nöron hastalıkları, şeker, astım, romatoid artrit, kanser, akciğer ve cilt hastalıkları meydana gelmektedir (Okçu ve Keleş, 2009).

Antioksidan savunma sistemi ile reaktif oksijen türlerinin (ROS) arasında yaşanan dengesizlik sonucu ortaya çıkan hücresel olguya "oksidatif stres" denilmektedir (Grzesik vd., 2018). Yapılan araştırmalarda solunan oksijenin yaklaşık %5'inin eşdeğer azalımı ile hidroksil, süperoksit ve hidrojen peroksit gibi çeşitli reaktif türlerine dönüştürüldüğü tahmin edilmektedir (Sen ve Chakraborty, 2011). Günümüzde oksidatif strese bağlı olarak hastalıkların ortaya çıkmasının nedenleri arasında sigara içimi, kimyasallara maruz kalma, ilaçlar, stres gibi faktörler de sayılmaktadır. Oksidanlar (serbest radikaller veya reaktif türler) lehine olan fizyolojik dengesizlik beraberinde oluşan oksidatif stresi betimleyen görseli Şekil 2.1'de sunulmuştur (Ighodaro ve Akinloye, 2018).



Şekil 2.1 Serbest radikaller ve antioksidanlar arasında yaşanan dengesizlik (Ighodaro ve Akinloye, 2018)

Reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS) hücresel redoks işlemlerinden kaynaklanan ürünlerdir (Sen ve Chakraborty, 2011). Reaktif oksijen türleri olarak süperoksit (O_2^{-}), hidroksil ($OH^{\cdot}$), peroksil ($ROO^{\cdot}$), lipit peroksil ($LOO^{\cdot}$) ve alkoksil ($RO^{\cdot}$) radikalleri sayılabilmektedir. Reaktif azot türleri olarak ise nitrik oksit ($NO^{\cdot}$) ve nitrojen dioksit (NO_2) radikalleri söylenebilmektedir. Bu iki grup kendi aralarında reaktif olmayan türlere dönüşebilmektedirler. Oksidanlar olarak isimlendirilmiş olan hidrojen peroksit (H_2O_2), ozon (O_3), singlet oksijen ($^1O_2$), hipokloröz asit (HOCl), nitrik asit (HNO_2), peroksinitrit (ONOO-), dinitrojen trioksit (N_2O_3) ve lipit peroksit (LOOH) ise serbest radikaller arasında gösterilmeyen moleküllerdir. Ancak organizmada bir patolojik durum ya da fiziksel olay karşısında radikal reaksiyonlarına yol açmaktadırlar (Karabulut ve Gülay, 2016). Oksidasyon prosesi olan Fenton ve Haber- Weiss reaksiyonları sonucu oluşan hidroksil reaktifleri Denklem (2.1), (2.2), (2.3)'de sunulmuştur (Grzesik vd., 2018).

(2.1)

$$H_2O_2 + Cu^{+}/Fe^{+2} \longrightarrow OH^{\cdot} + OH^{\cdot} + Cu^{+2}/Fe^{+3}$$ Fenton reaksiyonu

(2.2)

$$Cu^{+2}/Fe^{+3} + O_2 \longrightarrow Cu^{+}/Fe^{+2} + O_2$$

(2.3)

$O_2 + H_2O_2 \longrightarrow OH^{\cdot} + OH^{-} + O_2$ Haber- Weiss reaksiyonu

2.1.2. Antioksidanlar

Antioksidanlar oksitlenebilir durumda olan bir reaktif ile karşılaştıklarında onların oksidasyonunu engelleyen ve kararlı hale dönüştüren maddelerdir (Granato vd., 2018).

Antioksidanlar ilk olarak endüstride ortaya çıkmış ve kullanımı o alanlarda yaygın olsa da asıl olarak insan sağlığı için önemli bir basamakta yer almaktadır. Antioksidanlar endojen ve eksojen olmak üzere iki ana başlık altında sınıflandırılmıştır. Endojen antioksidanlar enzimatik ve nonenzimatik olarak ikiye ayrılırken, enzimatik olmayan antioksidan sınıfı ise vitaminler ve ilaç olarak kullanılan antioksidanlar olarak sınıflandırılmaktadır (Aydemir ve Sarı, 2009).

Vücudumuzda endojen antioksidanların yetersiz kalması ya da birtakım aksaklıkların oluştuğu durumlar sözkonusudur. Bu durumlarda sistemin düzene sokulması, problemlerin üstesinden gelinmesine yardımcı olmak ve yeri geldiğine sistemi indüklemek adına eksojen antioksidanlar kullanılmaktadır. Eksojen kaynaklı antioksidanlar beslenme ile gıdalardan karşılanmaktadır. Beslenme ve antioksidan gıda alımında yaşanan bir azalma söz konusu olduğunda hücresel hasara neden olan oksidatif stres olasılığının artmasının da söz konusu olabileceği belirtilmiştir (Sen ve Chakraborty, 2011). E vitamini, C vitamini, folik asit, koenzim Q10, beta karoten, likopen, selenyum ve fenolik maddeler bilinen ve yaygın olarak kullanılan eksojen antioksidanlardır.

Antioksidanlar pek çok önemli özelliklere sahiptir; DNA'yı onarma, serbest radikalleri ortamdan toplama, ksantin oksidaz reaksiyonunda oluşan süperoksitin üretiminin inhibisyonunu sağlamaları ve peroksillerin oluşum zincirlerini engelleyerek lipid peroksidasyonunu inhibe etmeleri gibi önemli aşamalarda yardımcı olmaktadırlar. Antioksidan maddeler, serbest radikal ve radikal olmayan oksitleyici ajanların temizleyicileri, bastırıcı, zincir kırıcı, onarıcı ve hatta oksidanların üretimini engelleyen bileşiklerdir. Aynı zamanda geçiş metali şelatlayıcı maddeler ve endojen antioksidan

bileşiklerin üretimini uyarabilen bileşikler olarak görev alan yapılar olduklarından bahsedilmektedir (Sevim, 2011).

2.1.2.1. Antioksidan enzimler

İnsan vücudunda hücre içerisinde gerçekleşen metabolik olaylar sonucu ortaya çıkan serbest radikallerin ortamdan uzaklaştırılması ya da inhibisyonundan sorumlu birtakım enzimler bulunmaktadır. Bu enzimler süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) olarak sayılmaktadır.

- **Süperoksit Dismutaz (SOD)**

Süperoksit dismutaz (SOD) hücrede bulunan en güçlü antioksidan enzim olup detoksifikasyon enzimlerinin ilk sırasında yer almaktadır. Reaktif oksijen türlerine karşı savunma sisteminde birinci basamaktadır ve potansiyel olarak zararlı olan süperoksit anyonunu daha az tehlikeli hale getirmektedir. Gerçekleşmesine yardımcı olduğu reaksiyon zinciri Denklem (2.4)'te sunulmuştur (Ighodaro ve Akinloye, 2018).

Kofaktör olarak metal iyonlarını kullanmaktadır ve bu nedenle iyonların tiplerine göre farklı formlarda bulunmaktadır.

(2.4)

$$O_2^{(-)} + O_2^{(-)} \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

- **Katalaz (CAT)**

Katalaz (CAT) kofaktör olarak demir ve magnezyum kullanmakta olan bir enzimdir. SOD tarafından başlatılan reaksiyonu takip eder ve hidrojen peroksidi (H_2O_2) su ile oksijene indirgenmesini katalizler. Böylece detoksifikasyon işlemini tamamlanmaktadır. Hücrelerde kontrol halinde sürekli olarak bulunan bir enzimdir. Reaksiyon zinciri Denklem (2.5)'te ifade edilmiştir (Ighodaro ve Akinloye, 2018).

(2.5)

$$2H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2H_2O + O_2$$

- **Glutatyon Peroksidaz (GPx)**

Glutatyon peroksidaz (GPx) enzimi hidrojen peroksidi (H_2O_2) suya parçalayan önemli bir enzimdir. Lipit peroksitlerin mitokondride, bazen ise sitozolde alkollerine dönüştürmektedir. Selenyum kofaktörüne bağlı bir enzim olan GPx böylelikle oksidatif strese karşı koruyucu bir rol oynamaktadır (Ighodaro ve Akinloye, 2018).

2.1.2.2. Antioksidan tayin yöntemleri

Antioksidanlar, reaktif oksijen türlerinin zararlı etkisini esas olarak iki mekanizma ile nötralizasyonunu sağlamaktadırlar (Prior vd., 2005). Bu sistemler:

- Hidrojen Atomu Transferi (HAT)
- Tek Elektron Transferi (SET)

➢ **Hidrojen Atomu Transferi Yöntemleri (HAT)**

HAT yöntemleri antioksidan bileşiğin reaktiflere hidrojen atomu bağışlaması ile kararlı hale dönmelerini sağlamaktadır. Bu sistem içerisinde gerçekleşen tepkime Denklem (2.6)'da sunulmaktadır (Prior vd., 2005).

(2.6)

$$X^{\cdot} + AH \longrightarrow XH + A^{\cdot}$$

HAT deneylerini oksijen radikal absorbans kapasitesi tayini (ORAC), total radikal yakalayıcı aktivite tayini (TRAP) ve karotenoid (Krosin) ağartma yöntemi olarak saymak mümkündür. Her bir yöntem de farklı reaktiflerin kullanılması ile hidrojen atomu bağışı yapan antioksidan bileşiğin kabiliyetinin ölçülmesini esas almaktadırlar.

➢ **Tek Elektron Transferi Yöntemleri (SET)**

SET tabanlı yöntemlerde, bir antioksidanın metaller, radikaller ve karboniller dahil olmak üzere herhangi bir bileşiği kararlı hale getirmek adına elektron aktarma yeteneğinin tespiti yapılmaktadır. SET yönetiminde gerçekleşen reaksiyonlar Denklem (2.7), (2.8), (2.9), (2.10)' da verilmiştir.

(2.7)

$$X^{\cdot} + AH \longrightarrow X^{-} + AH^{\cdot +}$$

(2.8)

$$AH^{\cdot +} \longrightarrow A^{\cdot} + H_3O^{+}$$

(2.9)

$$X^{-} + H_3O^{+} \longrightarrow XH + H_2O$$

(2.10)

$$M(III) + AH \longrightarrow AH^{+} + M(II)$$

SET reaksiyonları genel anlamda yavaş ilerleyen ve sonuçların gözlemlenmesinde zamana ihtiyaç duyulan sistemlerdir. Bu neden ile SET yöntemleri ile antioksidan aktivite potansiyeli hesaplanırken yüzde azalma oranı olarak sunulmaktadır (Prior vd., 2005).

Antioksidan bileşiklerin elektron vermeleri ile aktivite kapasitelerinin ölçülmesinde 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürücü aktivite, ABTS radikal katyon giderimi, Cu (II) kullanılan toplam antioksidan kapasite (CUPRAC), demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan güç yöntemi (FRAP) ile metal şelatlayıcı antioksidan aktivite ve lipid peroksidasyon ürünlerinin ölçülmesi yöntemleri kullanılmaktadır.

2.2. Antikanser Aktivite

Kanser, hücrenin mutasyona uğraması ile oluşan anomalilerin sonucunda apoptoza uğrayamaması ve kontrolsüz çoğalmasıdır (Ponder, 2001). Serbest radikaller ve oluşan oksidatif stres beraberinde 'oksidatif hasar' meydana getirmektedir. ROS ve RNS' nin DNA hasarı ve kanserleşme sürecinde ilişkili olduğu bilinmektedir. Yaşanan bir DNA mutasyonunun karsinogenezde hayati bir önemde olduğu belirtilmektedir. Bu bilgiler ile yapılan araştırmalarda çeşitli tümörlerde yüksek seviyelerde oksidatif DNA lezyonlarına rastlanmıştır (Sen ve Chakraborty, 2011).

Kanser dünya çapında en yaygın ölüm nedenlerinden birini oluşturmaktadır. Çoğunlukla kanserin tedavisi radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi operasyonlardan oluşmaktadır. Ancak kanser gelişimi ve kanser türüne karşı verilen savaşta alınan sonuçlar değişmektedir.

Kullanılmakta olan antikanser ilaçlar toksik yapıları ve tümöre özgü yapıda olmamasıyla tedavi sırasında saç dökülmesi, bağırsak epitel hücre dejenerasyonu, böbrek toksisitesi gibi sayılabilecek daha pek çok istenmeyen yan etkiler göstermektedir (Xu ve Wang, 2015). Bu nedenlerden dolayı, Amerikan Kanser Derneği ve Ulusal Kanser Enstitüsü kanser tedavilerinde özellikle immünoterapi gibi hedefe yönelik, hormon ve fotodinamik tedaviler, kan nakli ve kök hücre nakli, lazer tedavisi gibi birkaç yeni tedavi geliştirmişlerdir (Agrawal ve Dhanasekaran, 2019). Bu ilerleme ile bilim insanları bütünleştirici tıbba yönelmişlerdir, yani geleneksel tıbbın tamamlayıcı ve alternatif olanlarla birleştirilmesine önem vermektedirler.

2.2.1. Nekroz

Hücrenin enerjisinin tükenmesi, enflamatuar bir yanıtın indüklemesi ya da farklı enfeksiyon, iskemi gibi sebeplerin oluşturduğu patolojik olaylar sonucu oluşan programlanmış farklı bir hücre ölümü biçimidir (Freedman vd., 2004). Yapılan araştırmalarda hücrede gerçekleşen enerji yoksunluğu, radikaller gibi etkiler ile hücrenin nekroza gittiği sırada hücreyi otofajiye sürüklediğini de belirtmektedirler.

2.2.2. Apoptoz

Canlılardaki hücrelerin normal gelişim süreçlerinde azalmalarından sorumlu programlanmış hücre ölümleri için kullanılan ifadedir (Kerr vd., 1972).

İnsan yaşamı boyunca hücre sayılarının kontrolde tutulması apoptoz mekanizması ile dengede tutulmaktadır. Apoptozun herhangi bir durumdan dolayı mekanizmasının hasarı kontrolsüz büyümeye sebep olmaktadır. Hasar mutasyonlardan kaynaklanabildiği gibi apoptozun inhibe edici moleküllerinin ekspresyonlarının çalışmaması kaynaklı olabilmektedir (Freedman vd., 2004).

2.3. Antimikrobiyal Aktivite

Mikroorganizmalar hayatın her noktasında bulunup yaşamamız için önemli olsalar da bazen kötü sonuçlara sebebiyet verdikleri ve birçok hastalığın nedeni oldukları kaçınılamaz bir durumdur. Geçmişten günümüze kadar insanlar pek çok hastalık için tedavi yöntemi ve ilaç aramışlardır. Gün geçtikçe duyulan yeni antimikrobiyal madde gereksiniminin karşılanması için patojen mikroorganizmalara karşı aktivite tayinleri yapılmaya devam edilmektedir. Farklı birçok yöntem uygulanarak etkin maddenin bulunmasında ve üretilmesinde çaba harcamaktadırlar.

2.3.1. Antimikrobiyal Aktivite Tayin Yöntemleri

Zararlı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkinin varlığının araştırılmasında belli yöntemler halen kullanılmaktadır (Reller, 2009).

2.3.1.1. <u>Dilüsyon testi</u>

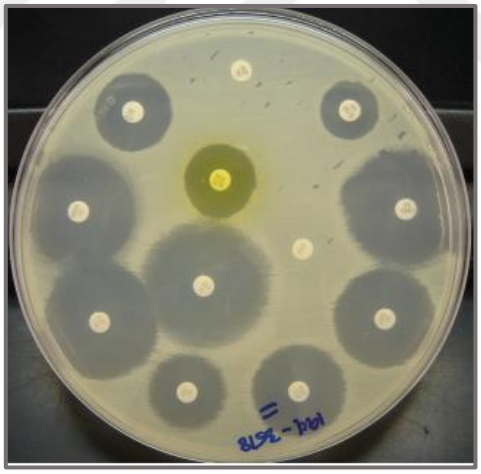
Yöntem sıvı besiyeri içeren tüplere antibakteriyal maddenin eklenmesi ve ardışık olarak dilüsyonunun hazırlanması ile başlamaktadır. Ardından belirli oranda organizmanın inoküle edilip inkübasyona bırakılması ve üreme ile oluşan bulanıklığa göre değerlendirilmesi yapılmaktadır. Tüplerde bulunan madde konsantrasyonunun etkinliği belirlenmektedir (Reller, 2009).

Yöntemin minimalize edilmesi ile beraber 96 kuyucuklu plakalar kullanılarak daha fazla maddenin araştırılmasının sağlandığı yöntem geliştirilmiştir. Minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) denilen bu yöntem ile aktivite tayini daha pratik hale gelmiştir (Syal, 2017).

2.3.1.2. Disk difüzyon testi

Yöntem 1940 yılında geliştirilmiştir ve halen yaygın olarak her alanda kullanılmakta olan bir testtir (Balouiri vd., 2016). Disk difüzyon yöntemi pratik, basit ve standardize edilmiş bir testtir.

Petri kaplarında bulunan katı besi ortamı üzerine inoküle edilen mikroorganizmanın yaydırılması sağlanır. Ardından ticari olarak satılan kağıt disklere denenecek maddenin emdirilip daha sonra petri kaplarına yerleştirilmesi ve aktivite varlığında zon oluşumun gözlemlenmesi ile uygulanan bir yöntemdir. (Şekil 2.2)



Şekil 2.2 Disk difüzyon yöntemi uygulanan petri görüntüsü (Reller, 2009)

2.4. Makrofungusların Önemi ve Yapılan Bazı Çalışmalar

Mantarlar 5000 yıl öncesinden günümüze gıda ve tıbbi kullanımları yanı sıra çeşitli uygulamalar içinde bulunarak hayatımızda yer almışlardır. Gıda olarak tercih edilmelerinin sebepleri yüksek derecede protein, vitamin, lif ve minerallere sahip olmalarından

kaynaklanmaktadır. Tıbbi önemi ile dikkat çeken aynı zamanda yenilebilir mantar türleri arasında başlıca *Agaricus, Lentinus, Pleurotus, Hericium, Ganoderma* olmak üzere pek çok tür sayılabilmektedir.

Mantarlar ile yapılan araştırmalarda birincil ve ikincil biyoaktif metabolitlere sahip oldukları belirlenmiştir (alkaloidler, yağ asitleri, lektinler, nükleik asitler, nükleositler, peptitler, fenolikler, polisakkaritler, proteinler, statinler, steroidler, terpenoidler vb.). Sahip oldukları bu biyoaktif metabolitler antibakteriyel, antifungal, antienflamatuar, antioksidan, antiproliferatif, antitümör, antiviral, hipokolesterolemik, hipoglisemik, hipotansif, immünomodülatör gibi pek çok aktivite göstermektedir. Örneğin *Hericium erinaceus* ve *Ganoderma lucidum*'un antiaging, antioksidan etkilerinin olduğu, *Pleurotus cornucopiae*' nin antioksidan etkiye sahip olduğu, *Armillaria mellea*' nın fenolik bileşiklerce zengin olduğu belirtilmektedir (Agrawal ve Dhanasekaran, 2019). Mantarlarla yapılan araştırmaların sayısının artması ile türlere özgü biyoaktif metabolitlerin varlığı belirlenmiştir. *Ganoderma*' da ganoderik asit, ganodermadiol; *Flammulina velutipes*'te flammulin; *Lentinus edodes*'de lentinan gibi antimikrobiyal, antikanser, antidiyabetik gibi birçok aktivite gösterdiği kanıtlanan biyoaktif metabolitler litaretüre eklenmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız yöntemler ile ilişkili olarak farklı araştırmacıların yapmış oldukları çalışmalara değineceğiz.

Dulay vd. (2017), *L. tigrinus* ve *P. djamour* asetonitril ve hekzan kullanarak yaptıkları ekstraksiyon işlemi sonrasında izolatlarının antioksidan ve antimikrobiyal etkisini araştırmışlardır. Radikal süpürücü aktivitelerinin olduğunu belirtmişlerdir ve özellikle asetonitril ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarının yüksek olması potansiyel gücün kaynağı olduğunu belirtmişlerdir. Her iki makrofungusun asetonitril ekstraktlarının antibakteriyel etkisi olduğunu gözlemlemişlerdir.

Kozarski vd. (2012) yaygın olarak tüketilen *Ganoderma applanatum, Ganoderma lucidum, Lentinus edodes* ve *Trametes versicolor* makrofunguslarının polisakkaritlerini elde ederek kullandıkları çalışmalarında DPPH radikal süpürücü aktivite, metal şelatlayıcı aktivite, lipit peroksidasyonu ve redükleyici güç tayinlerini uygulamışlardır. *G. applanatum ve L. edodes*'in polisakkaritlerinin güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduklarını

belirtmişlerdir. Özellikle *G. applanatum*'un metal şelatlama aktivitesi, redükleyici güç ve lipit peroksidasyon inhibisyon EC_{50} değerlerinin sırası ile 3,58, 2,07 ve 0,18 mg/ml olduğunu rapor etmişlerdir.

Yapılan bir başka çalışma ile Çelik vd. (2014) *Ganoderma lucidum* fungusunun metanol ve etanol estraktlarının antimikrobiyal etkisini ve antioksidan aktivitesini (DPPH radikal süpürücü, metal şelatlayıcı, beta karoten yöntemi ile toplam antioksiadan aktivite) araştırmışlardır. Çalışmalarında ekstraktlaının beta-karoten, likopen, fenolik bileşikler ve flavanoid bileşikler içerdiğini belirlemişlerdir. Aynı zamanda *Candida glabrata* (RSKK 04019), *Candida albicans* (ATCC 90028) ve *Bacillus subtilis* (RSKK 24) suşlarına karşı yüksek bir antimikrobiyal etkiye sahip olduklarını rapor etmişlerdir. Çalışmalarında antioksidan ve antimikrobiyal etkisi bulunan ekstrakt aktivitelerinin sahip oldukları biyoaktif metabolitlerden kaynaklandıklarını belirmişlerdir.

Makrofungusların fruktifikasyon yapılarının yaygın olarak kullanılması yanı sıra kültür ortamına alınarak farklı kültür tiplerinde daha kısa sürede üretilip kültür sıvısından ya da misel yapısından biyoaktif metabolitlerin tespit edildiği çalışmalarda mevcuttur. Kamble vd., (2011) *Ganoderma* makrofungusunun antimikrobiyal aktivitesini araştırdıkları çalışmalarında sıvı besiyerinde üreterek elde ettikleri makrofungus miselini kurutmuşlardır. Ardından aseton, metanol, kloroform ve su kullanarak ekstrakte ettikleri miselin gram (+) ve gram (-) bazı organizmalar üzerindeki aktivitesini araştırdıklarında aseton ekstraktının *Salmonella typhi*'ye karşı, su ekstraktının ise *Corynebacterium diphtheriae* karşı en geniş zon çaplarını elde etmişlerdir. Çalışmalarında makrofungusların daha kısa sürede üretilerek doğal antimikrobiyal metabolitlere ulaşılabileceğini belirtmektedirler.

Menikpurage vd. (2012), *P. cystidiosus* izolatının ilk olarak aseton ile yaptıkları ekstraksiyon sonrasında ekstraktlarının hekzan, diklorametan ve etil asetat ile sırası ile yaptıkları ayırma işleminden kalan kısmını da kullanarak antioksidan aktivite ve sitotoksik etkisini araştırmışlarıdır. Özellikle ayırma sonrası arta kalan fraksiyonun DPPH süpürücü (A4-2, A4-3 sırası ile EC_{50}: 0,81 ve 0,82 mg/ml) ve nitrik oksit süpürücü aktivitelerinin (A4-2, A4-3 sırası ile EC_{50}: 0,87 ve 0,61 mg/ml) diğer fraksiyonlardan yüksek oluşu dikkatlerini çekmiştir. Hep-2 hücre hattına karşı sitotoksik etkilerinin A4-2> A4-3> A4> A sırasında

olduğunu belirtirken, A4-2 ve A4-3 fraksiyonlarının IC_{50} değerlerinin sırası ile 3,1 mg/ml ve 3,6 mg/ml konsantrasyonlarda olduğunu belirlemişlerdir.

Yapılan daha birçok çalışma ile makrofungusların antikanser aktiviteye kapasitelerinin yüksek olduğunu belirlenmiştir. Örneğin *Trametes versicolor* un fruktifikasyon yapısı ve misellerinin ekstraksiyonu sonrası prostat, mide, serviks, kolon ve akciğer kanserlerinin yanı sıra lösemi, lenfoma ve melanoma hücre hatlarını baskıladığı yapılan araştırmalar ile kanıtlanmıştır (Chu vd., 2002).

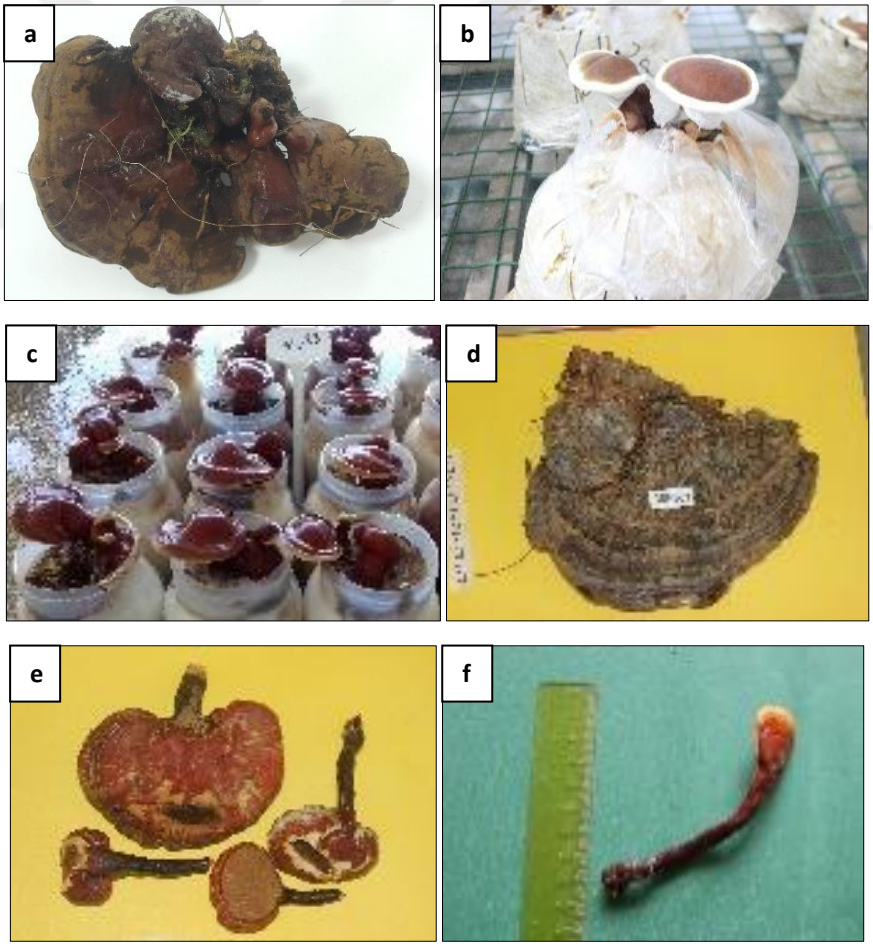
Makrofungusların yapılan aktivite çalışmalarında sahip oldukları gücün fenolik maddelerden geldiğini düşünmeleri ve toplam fenolik maddelerinin belirlendiği birçok çalışma mevcuttur. Bunlardan biri de Palacios vd. (2011) *Agaricus bisporus, Boletus edulis, Calocybe gambosa, Cantharellus cibarius, Craterellus cornucopioides, Hygrophorus marzuolus, Lactarius deliciosus* ve *Pleurotus ostreatus*'un Folin–Ciocalteau yöntemi ile toplam fenolik madde miktarını ve mantar örneklerinin yüksek basınç kromatografisi (HPLC) kullanılarak madde analizini yapmışlardır. Elde ettikleri verilerde *Agaricus bisporus* ve *Boletus edulis* örneklerinin yüksek içeriğe sahip olduğunu *Hygrophorus marzuolus* izolatının ise en düşük fenolik madde içeriğine sahip olduğunu belirlemişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Makrofungus izolatları

Çalışmada Türkiye'nin farklı illerinden izole edilmiş olan ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Basidiomycetes Kültür Koleksiyonu (OBCC) bünyesinde korunan makrofungus izolatları kullanılmıştır (Şekil 3.1, Çizelge 3.1). İzolatlara ait stok kültürler +4 °C' de saklanmış, gereken durumlarda Patates Dekstroz Agar (PDA) besiyerinde 28°C' de 1 hafta üretilerek aktif hale getirilmiştir.



Şekil 3.1 Tarama çalışmasında kullanılan bazı *Ganoderma* izolatlarına örnekler a: OBCC 5109, b: OBCC6050, c: OBCC 6059, d: OBCC 6062, e: OBCC 6065 f: OBCC 6068 (Fotoğraf, Dr. Mustafa Kemal Soylu)

Çizelge 3.1 Tarama çalışmasında kullanılan makrofungus izolatları

OBCC	**Tür İsimleri**	**Lokalite**
5109*	*Ganoderma lucidum*	Merkez / Edirne
6050*	*Ganoderma lucidum*	Araştırma Alanı / Yalova
6052*	*Ganoderma carnosum*	Güneyköy / Yalova
6059*	*Ganoderma resinaceum*	Heykel Sahil / Yalova
6061*	*Ganoderma carnosum*	Yalova
6062*	*Ganoderma carnosum*	İznik
6065*	*Ganoderma lucidum*	Hamzalı Köyü – Orhangazi / Bursa
6066*	*Ganoderma sp*	Hamzalı Köyü – Orhangazi / Bursa
6068*	*Ganoderma lucidum*	Gacık Köyü- Çiftlikköy / Yalova
6069*	*Ganoderma lucidum*	Araştırma Alanı / Yalova
6070*	*Ganoderma carnosum*	Araştırma Alanı / Yalova
6071*	*Ganoderma carnosum*	Araştırma Alanı / Yalova
3	*Ganoderma* sp.	Türkmenbaba / Eskişehir
1004	*Ganoderma* sp.	Merkez / Eskişehir
1010	*Ganoderma* sp.	Merkez / Eskişehir
1146	*Ganoderma* sp.	Merkez / Eskişehir
3012	*Ganoderma* sp.	Sivrihisar / Eskişehir
3013	*Ganoderma* sp.	Kurtşeyh-Sivrihisar / Eskişehir
5008	*Ganoderma* sp.	Trabzon

Çizelge 3.1 Tarama çalışmasında kullanılan makrofungus izolatları (devam)

OBCC	Tür İsimleri	Lokalite
5090	*Ganoderma* sp.	Manisa
5091	*Ganoderma* sp.	Çan / Çanakkale
5092	*Ganoderma* sp.	Çekmeköy / İstanbul
5093	*Ganoderma* sp.	Trabzon
5094	*Ganoderma* sp.	Şarköy / Tekirdağ
5095	*Ganoderma* sp.	Şarköy / Tekirdağ
5096	*Ganoderma* sp.	Şarköy / Tekirdağ
5098	*Ganoderma* sp.	Muğla
5099	*Ganoderma* sp.	Antalya
5100	*Ganoderma* sp.	Bozguç Köyü-Çan / Çanakkale
5101	*Ganoderma* sp.	Etili Bucağı-Çan / Çanakkale
5102	*Ganoderma* sp.	Yeniköseler-Polatlı/Ankara
5103	*Ganoderma* sp.	Yeniköseler-Polatlı/ Ankara
5106	*Ganoderma* sp.	Adapazarı / Sakarya
5108	*Ganoderma* sp.	Göcek / Muğla
5110	*Ganoderma* sp.	Çukurova / Adana
5111	*Ganoderma* sp.	Görele / Giresun
5116	*Ganoderma* sp.	Kısıkköy / İzmir
6051	*Ganoderma* sp.	Kurtköy / Yalova

Çizelge 3.1 Tarama çalışmasında kullanılan makrofungus izolatları (devam)

OBCC	Tür İsimleri	Lokalite
6053	*Ganoderma* sp.	Fındıklı / Yalova
6054	*Ganoderma* sp.	Elmalı Yolu / Yalova
6055	*Ganoderma* sp.	Denizçalı Köyü / Yalova
6056	*Ganoderma* sp.	Merkez / Yalova
6057	*Ganoderma* sp.	Merkez / Yalova
6058	*Ganoderma* sp.	Elmalık Köyü Yolu / Yalova
6060	*Ganoderma* sp.	Elmalık Yolu / Yalova
6063	*Ganoderma* sp.	Hamzalı Köyü – Orhangazi / Bursa
6064	*Ganoderma* sp.	Hamzalı Köyü – Orhangazi / Bursa
6067	*Ganoderma* sp.	İstanbul
6072	*Ganoderma* sp.	Orhangazi / Bursa
6073	*Ganoderma* sp.	Orhangazi / Bursa
6074	*Ganoderma* sp.	Penn State University / ABD
6035	*Ganoderma lucidum*	Çin / Ticari Suş
6076	*Ganoderma lucidum*	Agroma Mantarcılık / Ticari Suş

*: Prof. Dr. Hasan Hüseyin Doğan (Selçuk Üniversitesi) tarafından mikro ve makromorfolojik yöntemlerle identifiye edilmiştir.

3.1.2. Antimikrobiyal aktivite tayininde kullanılan test mikroorganizmaları

Tarama çalışması sonrası yüksek antioksidan aktivite göstermesi ile seçilen makrofungus izolatlarının antimikrobiyal aktivitesini belirlemek üzere 3 gram negatif, 3 gram pozitif bakteri suşu ile 2 maya ve 2 küf olmak üzere 10 adet test mikroorganizması kullanılmıştır. Kullanılan test mikroorganizmalarının suş numaraları Çizelge 3.2. 'de sunulmuştur.

Çizelge 3.2 Makrofungus kültür sıvıvı ekstraktının antimikrobiyal etkilerinin araştırılmasında kullanılan test mikroorganizmaları

Test Mikroorganizması		**Suş no**	**Suş adı**
Bakteri	Gram (+)	NRLL B-767	*Staphylococcus aureus*
		NRRL 1018	*Micrococcus luteus*
		NRRL B-744	*Bacillus subtilis*
	Gram (-)	ATCC 27853	*Pseudomonas aeruginosa*
		ATCC 25922	*Escherichia coli*
		NRLL B-4420	*Salmonella typhimurium*
Fungus	Maya	ATCC 13803	*Candida tropicalis*
		ATCC 60193	*Candida albicans*
	Küf	NRRL 1957	*Aspergillus flavus*
		NRRL 807	*Penicillium chrysogenum*

3.1.3. Sitotoksik Etkinin Araştırılmasında Kullanılan Hücre Hatları

Tarama çalışması sonrası yüksek aktivite göstermesi ile seçilen makrofungus izolatlarının sitotoksik aktivitesini belirlemek üzere kanserli ve sağlıklı hücre hattı kullanılmıştır. Kullanılan hücre hatlarının standart hat numaraları Çizelge 3.3. 'te sunulmuştur.

Çizelge 3.3 Makrofungus izolatlarının sitotoksik aktivitesinin araştırıldığı hücre hatları

Suş no	**Hücre hattı**
ATCC HTB-22™	İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı (MCF-7)
ATCC CRL-1658™	Fare Embriyo Fibroblast Hücre Hattı (NIH/3T3)

3.1.4. Besiyerleri

Patates Dekstroz Agar (PDA)

Ticari hazır besiyerinden (Merck) 39 g/L oranında tartılarak, 1.2 atm basınç altında 121 °C sıcaklıkta 15 dakika otoklavda steril edilerek hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılan makrofungus izolatlarını aktiflemek için kullanılmıştır.

Mushroom Complete Medium (MCM)

Glukoz	20	g
Pepton from meat	2	g
KH_2PO_4	0,5	g
K_2HPO_4	1	g
Yeast ekstrakt	2	g
Distile su	1000	ml

Seçilen makrofungus izolatlarının kültür sıvılarından antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksik etkilerinin belirlenmesi aşamasında izolatların üretilmesinde kullanılmıştır.

Mueller Hinton Broth (MHB)

Ticari hazır besiyerinden (Himedia) 21 g/L oranında tartılarak, 1.2 atm basınç altında 121 °C sıcaklıkta 15 dakika otoklavda steril edilerek hazırlanmıştır. Antimikrobiyal aktivite çalışmasında test mikroorganizması olarak kullanılan bakterilerin aktiflenmesi amacı ile kullanılmıştır.

Çift Kuvvetli Mueller Hinton Broth (MHB)

Ticari hazır besiyerinden (Himedia) 42 g/L oranında tartılarak, 1.2 atm basınç altında 121 °C sıcaklıkta 15 dakika otoklavda steril edilerek hazırlanmıştır. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi aşamasında MİK testinde bakterilerin üreme ortamı olarak kullanılmıştır.

Mueller Hinton Agar (MHA)

Ticari hazır besiyerinden (Merck) 34 g/L oranında tartılarak, 1.2 atm basınç altında 121 °C sıcaklıkta 15 dakika otoklavda steril edilerek hazırlanmıştır. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi aşamasında bakterilerin üreme ortamı olarak kullanılmıştır.

Sabouraud Dekstroz Agar (SDA)

Ticari hazır besiyerinden (Acumedia) 65 g/L oranında tartılarak, 1.2 atm basınç altında 121 °C sıcaklıkta 15 dakika otoklavda steril edilerek hazırlanmıştır. Antimikrobiyal aktivite çalışmasında test mikroorganizması olarak kullanılan mayaların aktiflenmesi amacı ile kullanılmıştır.

Sabouraud Dekstroz Broth (SDB)

Ticari hazır besiyerinden (Merck) 30 g/L oranında tartılarak, 1.2 atm basınç altında 121 °C sıcaklıkta 15 dakika otoklavda steril edilerek hazırlanmıştır. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi aşamasında mayaların üreme ortamı olarak kullanılmıştır.

Malt Ekstrakt Agar (MEA)

Ticari hazır besiyerinden (Merck) 48 g/L oranında tartılarak, 1.2 atm basınç altında 121 °C sıcaklıkta 15 dakika otoklavda steril edilerek hazırlanmıştır. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi aşamasında küflerin üreme ortamı olarak kullanılmıştır.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Ticari hazır besiyeri içerisine %10'luk fetal sığır serumu (FBS), %1'lik penisilin, %1'lik promisin eklenmesi ile hazırlanmıştır. Sitotoksisite çalışmasında kullanılan hücrelerin çoğaltılması için kullanılmıştır.

3.1.5. Kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler

Çalışmalar esnasında kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler Çizelge 3.4. 'te belirtilmiştir.

Çizelge 3.4 Çalışmalar esnasında kullanılan kimyasal maddeler, çözeltiler ve kullanım alanları

Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	**Kullanıldığı Çalışma**
%0,0004' lük beta-karoten Tween 80 Linoleik asit Kloroform	Beta karoten – lineloik asit yöntemi

Çizelge 3.4 Çalışmalar esnasında kullanılan kimyasal maddeler, çözeltiler ve kullanım alanları (devam)

Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	**Kullanıldığı Çalışma**
%0.005'lik DPPH Metanol	DPPH radikal süpürücü aktivite tayini
2 mM $FeCl_2$ 5 mM Ferrozin	Metal şelatlayıcı aktivite tayini
%10'luk Folin Ciocalteu Reaktifi %20'lik Na_2CO_3	Toplam fenolik madde miktarı tayini
%1'lik $K_3[Fe(CN)_6]$ %10'lik TCA %0.1'lik $FeCl_3$ PO_4 tamponu (pH:6.6 200 mM)	Redükleyici güç tayini
%1'lik Tween80-Ringer %70'lik TTC	Antimikrobiyal aktivite
3-(4,5-dimetiltriazol-2-yl)-2,5-difeniltetrrazolium bromid (MTT) Dimetil sülfoksit (DMSO) Fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) Annexin V-FITC apoptoz tespit kiti	Sitotoksiste

3.1.6. Cihazlar

Çalışmalar süresince kullanılan cihazlar ve markaları Çizelge 3.5. 'te belirtilmiştir.

Çizelge 3.5 Çalışmalar süresince kullanılan cihazlar ve markaları

Cihazın Adı	**Marka ve Modeli**
Spektrofotometre	Shimadzu UV-2450 UV-VIS Spectrophotometer
Mikroplaka okuyucu (ELİSA)	BioTek Cytation 3
Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 320 Eppendorf 5810 R
Akış sitometri cihazı	BD Accuri C6 Flow Cytometer
Hücre sayma sistemi	Innovatis, Roche, Germany
Steril kabin	Thermo Electron Corporation Hera Safe
Isıtıcı ve manyetik karıştırıcı	Heidolph MR Hei-Tec D-91126 Scwabach
Su banyosu	Adventec LD-220 Water Bath Nuve
Etüvler (Steril CO_2 inkübatörü, çalkamalı inkübatör)	Invova 44 New Brunswick Scientific Memmert Thermo Scientific Hera Cell 240
Vorteks	Velp Scientifica 2x3
pH-metre	Eutech Instruments Ion 510
Analitik terazi	Ohaus corp Kern 440-33
Mikro pipetler	Eppendorf Multipette Plus Eppendorf Research Pl
Rotary Evaporatör	Büchi vacuum controller V- 800

3.2. Yöntem

Çalışma kapsamında kültür koleksiyonunda korunan *Ganoderma* cinsine ait makrofungus izolatlarına ait kültür sıvılarının DPPH radikali süpürücü aktiviteleri ve toplam fenolik madde içeriklerine göre bir ön elemeden geçirilmişlerdir. Bu eleme ile seçilen izolatların kültür sıvısı ekstraktları elde edilerek antioksidan, sitotoksik ve antimikrobiyal aktiviteleri kapsamlı biçimde araştırılmıştır.

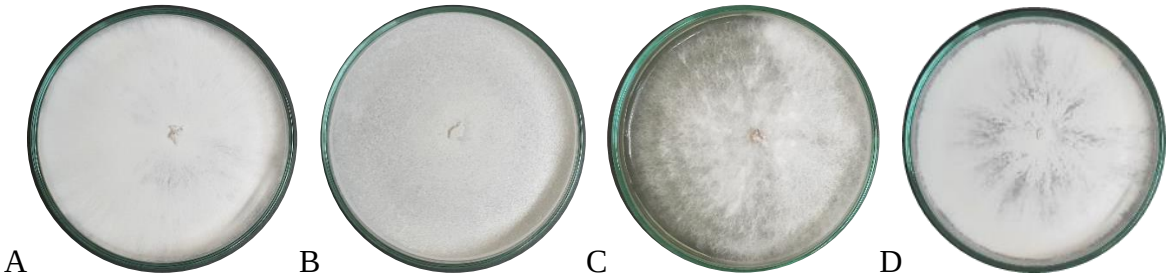
3.2.1. Yüksek antioksidan aktiviteye sahip izolatların seçimi

3.2.1.1. Makrofungus izolatlarının aktiflenmesi, üretilmesi ve kültür sıvısı eldesi

Çalışmada kullanılacak makrofungus izolatlarının aktiflenmesi, uygun kültür ortamında üretilmesi ve kültür sıvılarının elde edilmesi işlemleri literatürde önerilen biçimde gerçekleştirilmiştir (Paliya vd., 2014).

Çalışmada ilk olarak antioksidan aktiviteleri taranacak makrofungus izolatları PDA besiyerinde 27 °C' de karanlık ortamda 7 gün inkübe edilerek aktiflenmiştir. (Şekil 3.2) İzolatların üremelerinin ardından kolonilerin sınırlarından 6 mm çapında 5 adet misel diski alınarak 250 ml'lik erlenlerde bulunan 100 ml MCM besiyerine inokülasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolatlar statik kültür koşullarında 27 °C' de 10 gün boyunca inkübasyona bırakılarak üremeleri sağlanmıştır.

İzolatların üremelerinin sağlandığı on günün sonunda kurutma kağıdı kullanılarak kültür sıvısı ve misel kitlesini ayırmak için kaba süzümleri gerçekleştirilmiştir. Ardından kültür sıvılarının misellerden tamamen arındırılması için 6000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı toplanmıştır. Bu biçimde elde edilen kültür sıvıları DPPH radikali süpürücü aktivite ve toplam fenolik madde içerik tayinleri için kullanılmışlardır.



Şekil 3.2 OBCC 6061 (a), OBCC 6069 (b), OBCC 3 (c), OBCC 5109 (d) kodlu izolatların PDA besiyerindeki misel gelişimleri

Kültür koleksiyonundan seçilen 54 adet makrofungus izolatının kültür sıvıları ile yapılan DPPH radikali süpürücü aktivite ve toplam fenolik madde içerik tayinleri ile elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak yüksek aktivite gösteren makrofungus izolatları belirlenmiştir. Eş zamanlı olarak izolatların hücre kitleleri kurutulup tartılarak biyomas ağırlıkları elde edilmiştir.

3.2.1.2. DPPH radikal süpürücü aktivite yöntemi

DPPH radikal süpürücü aktivite, Baskar vd. (2008) uyguladıkları yönteme göre belirlenmiştir. Çalışmada hücre kitlelerinden ayırılan kültür sıvılarının deney tüplerine dağıtılarak ve üzerine %0,005'lik DPPH çözeltisi eklenmiştir, 30 dakikalık inkübasyon sonrasında 517 nm absorbansda spektrofotometrede ölçümü yapılarak % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır.

İzolatların sıvı besiyerinde üretilmeleri ve sıvı besiyerinin direk kullanılmasından dolayı ekim yapılmamış besiyeri de aynı koşullarda tutularak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak askorbik asit ve BHT kullanılmıştır.

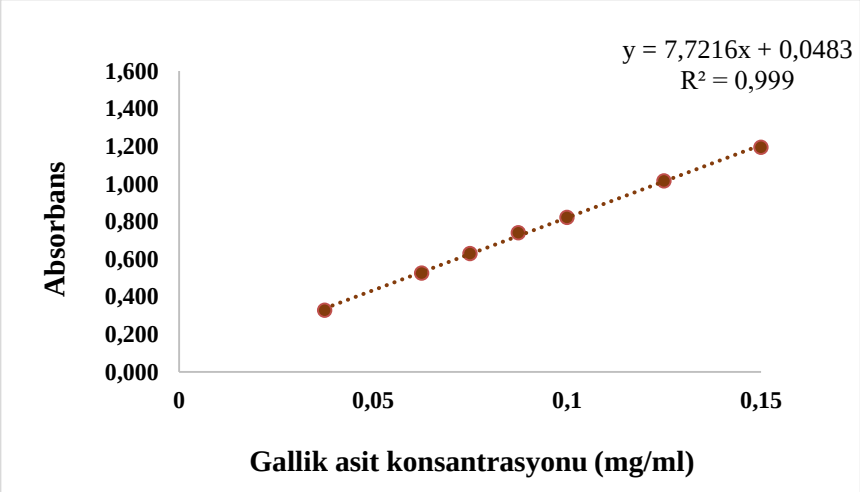
3.2.1.3. Kültür sıvılarının fenolik madde içeriklerinin belirlenmesi

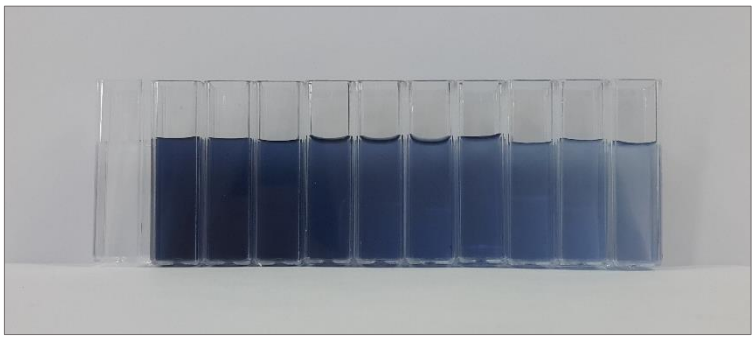
Üretilen makrofungus izolatlarının kültür sıvılarının fenolik madde miktarlarının belirlenmesi, Singleton vd. (1999) uyguladıkları yöntem esas alınarak uygulanmıştır.

Yöntemde kültür sıvılarından 1 ml alınarak tüplere dağıtılmış ve üzerlerine seyreltilmiş Folin–Ciocalteu reaktifi eklemiştir. Reaksiyon karışımının 3 dakika bekletilmesinin ardından üzerlerine Na_2CO_3 eklenmiştir. Karanlık ortamda 2 saat inkübasyon süresinin sonunda spektrofotometrede 750 nm' de absorbansları ölçülmüştür.

Tarama çalışmasında fenolik madde içeriğinin değerlendirilmesinde oluşturulan gallik asit standart eğrisi Çizelge 3.6 ‘da sunulmuştur (Şekil 3.3).

Çizelge 3.6 Tarama çalışmasında kullanılan gallik asit standart eğrisi





Şekil 3.3 Standart eğri için hazırlanan gallik asit konsantrasyon serisi (sol başta kör olmak üzere, 0,200-0,150-0,125-0,100-0,087-0,075-0,062-0,050-0,037 mg/ml konsantrasyon aralığı)

DPPH radikali süpürücü aktivite tayinine göre yüksek inhibisyon değerine sahip olan izolatların tekrar üretilerek kültür sıvılarının ekstraktları elde edilmiş ve çalışmanın sonraki aşamalarındaki araştırmalara kültür sıvısı ekstraktları ile devam edilmiştir.

3.2.3. Seçilen makrofungusların kültür sıvısı ekstraksiyonu

Yapılan tarama çalışmasının sonucuna göre yüksek inhibisyon değerine sahip olan OBCC 3, OBCC 5109, OBCC 6061 ve OBCC 6069 kodlu izolatlar seçilerek biyoaktif metabolitlerin elde edilmesi için yapılacak ekstraksiyon işlemi öncesinde sıvı besiyerinde tekrar üretilmişlerdir. İnkübasyon sonunda üretilen makrofungus izolatlarının kültür sıvısını toplamak amacı ile tarama çalışmasında uygulanan işlemler bu aşamada da uygulanmıştır.

Makrofungus izolatlarının biyoaktif metabolitlerini kültür sıvısından ayırmak için 1:1 (v/v) oranlarında etil asetat kullanılarak sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İzolatların 250 ml' lik kültür sıvıları 500 ml' lik ayırma hunilerine aktarılmış, ardından üzerlerine etil asetat eklenmiştir. Yüzey hacim oranını artırarak maksimum ekstraktı elde edebilmek amacıyla etil asetat 3 aşamada eklenip, her ekleme aşamasından sonra iyice çalkalanarak karışmaları sağlanmıştır. Çalkalamanın ardından polarite farkı nedeniyle oluşan faz ayrımı gerçekleşene kadar beklenmiştir (Şekil 3.4). Alt kısımda kalan kültür sıvısı fazı ayırma hunisinin vanası açılarak alınmıştır. Üst kısımda kalan etil asetat fazı ise ayrı bir kapta toplanıp içinde kalan suyun uzaklaştırılması için sodyum karbonat eklenerek karıştırılmıştır. Sodyum karbonatın dibe çöküp toplanmasının ardından filtre kağıdı yardımı ile süzülen etil asetat ekstraktı ayrı bir şişede toplanmıştır.

Rotary evaporatör yardımı ile etil asetat uçurularak uzaklaştırılmıştır. Makrofungus izolatlarının ekstraktları, çalışmanın sonraki aşamalarında kullanılmak üzere 1 mg/ml konsantrasyonlarda olacak şekilde metanol ile çözülerek -20 °C' de kullanılıncaya dek muhafaza edilmiştir.



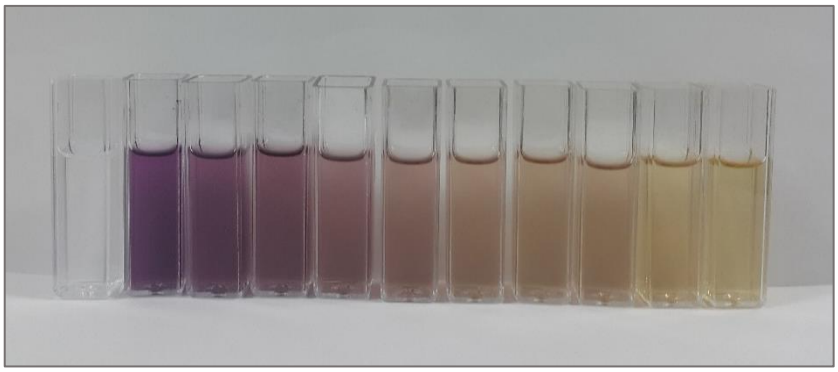
Şekil 3.4 Ekstraksiyon işlemi sırasında oluşan etil asetat-kültür sıvısı faz ayrımı

3.2.2. Antioksidan Aktivite Tayini

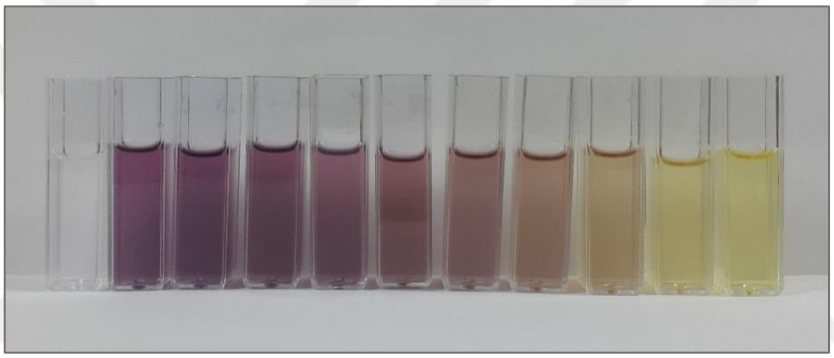
Çalışmada kullanılan makrofungus ekstraktlarının her biri için metanol kullanılarak 0,1-1 mg/ml konsantrasyon aralığında çözeltiler elde edilmiştir. Bu ekstrakt çözeltileri 4 farklı antioksidan aktivite tayin yöntemi ve toplam fenolik madde tayini amacı ile kullanılmıştır.

3.2.2.1. <u>DPPH radikal süpürücü aktivite tayini</u>

Deney tüplerine dağıtılan farklı derişimlerdeki ekstraktların üzerine 0,005'lik DPPH çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 517 nm dalga boyunda spektrofotometrede okutarak absorbans değerleri elde edilmiştir. Belirlenen absorbans değerleri ile lineer regresyon grafiği çizilmiştir ve grafikte oluşturulan formül ile DPPH derişimini yarıya düşüren örneğin konsantrasyonu bulunarak EC_{50} değeri hesaplanmıştır. Pozitif kontrol olarak askorbik asit ve BHT kullanılmıştır (Şekil 3.5 ve 3.6)



Şekil 3.5 BHT'nin farklı konsantrasyonlarının gösterdiği renk değişimi (sol başta kör olmak üzere, 0,1-0,2-0,3-0,4-0,5-0,6-0,7-0,8-0,9-1 mg/ml konsantrasyon aralığı)



Şekil 3.6 Askorbik asit'in farklı konsantrasyonlarının gösterdiği renk değişimi (sol başta kör olmak üzere, 0,095-0,100-0,120-0,140-0,160-0,180-0,200-0,225-0,250-0,275 mg/ml konsantrasyon aralığı)

3.2.4.2. <u>Redükleyici güç ölçümü ile antioksidan aktivite tayini</u>

Yöntemde antioksidan moleküllerin varlığında gerçekleşen reaksiyonda ferrik demir (Fe^{3+}) ve ferrisiyanid kompleksi ferro demir (Fe^{2+}) formuna indirgenmektedir (Ferreira vd., 2007). Yöntemin uygulanmasında ilk olarak farklı konsantrasyonlarda (0,1-1 mg/ml) hazırlanan ekstraktlar deney tüplerine aktarılmıştır ve üzerlerine %1'lik potasyum ferrisiyanid ($K_3[Fe(CN)_6]$) ile fosfat tamponu ilave edilmiştir. 50°C su banyosunda 20 dakika inkübasyonu sırasında ferrisiyanidin ferrosiyanide redüklenmesi sağlanmıştır. İnkübasyon sonrası karışımlara %10'luk trikloroasetik asit eklenmiş ve ardından 650 g' de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjün sonrasında karışımın üst tabakası toplanarak distile su ilavesi yapılmıştır. Yöntemin son aşaması olan $FeCl_3$'ün (%0,1) reaksiyon karışımına eklenmesi ile

ferrisiyanid ferik ferrosiyanidi oluşturmuştur. Deney karışımının sarı rengi, ekstraktların indirgeme gücüne bağlı olarak yeşil ve mavinin farklı tonlarına dönüşmüştür. Reaksiyon karışımının absorbansı 700 nm'de spektrofotometre ile ölçülmüştür ve 0.5 absorbans EC_{50} değeri olarak belirlenmiştir (Arora ve Chandra, 2011; Chang vd., 2002). Yöntemde pozitif kontrol olarak askorbik asit ve BHT kullanılmıştır.

3.2.4.3. Metal şelatlayıcı aktivite tayini

Yöntem fungus ekstraktlarında bulunan antioksidan moleküllerin ferrozin ile yarışarak çözeltide yer alan Fe^{2+} iyonlarına bağlanıp etkisiz hale getirmesini değerlendirmektedir. Ferrozin ve Fe^{2+} iyonları bir araya geldiğinde çözelti kırmızı renkli ferrozin kompleksi oluşturmaktadır. Metal şelatlama aktivitesi yüksek olan bir molekül ferrozinden daha hızlı olup devreye girdiği zaman Fe^{2+} iyonları ile bağlanmakta ve kırmızı renk oluşumu engellenmektedir. Şelatlanma aktivitesinin belirlenmesinde ki renk değişim absorbans değerleri 562 nm de spektrofotometre de okunarak elde edilmektedir (Sarıkürkçü, vd., 2015).

Makrofungus ekstraktlarının her biri için metanol kullanılarak 0,1-1 mg/ml konsantrasyon aralığında çözeltiler elde edilmiştir ve deney tüplerine dağıtılmıştır. Üzerlerine $FeCl_2$ ardından ferrozin eklenerek hacim metanol ile 5 ml' ye tamamlanmıştır. Karışım her aşamada iyice vortekslenerek 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Pozitif kontrol olarak metal şelatlama aktivitesi yüksek olduğu bilinen EDTA kullanılmıştır.

(3.1)

$$\% \text{ Metal Şelatlayıcı Aktivite} = [(A_{kontrol} - A_{örnek})]/A_{kontrol} x100$$

$A_{kontrol}$: Fe^{2+} Ferrozin kompleksinin absorbans değeri

$A_{örnek}$: Ekstraktlara ait absorbans değeri

3.2.4.4. Beta karoten–lineloik asit yöntemi

Yöntem linoleik asitin oksidasyonu sonucu ortaya çıkan konjüge dien hidroperoksitlerin inhibisyonunun ölçülmesi yolu ile belirlenmektedir (Dündar vd., 2012).

Çalışmada kullanılan distile su, oksijenlendirilmesi amacı ile bir gece boyunca hava pompasına bağlatılıp bekletilmiştir. Reaktiflerin bulunacağı emülsiyonun hazırlanması için ilk olarak beta-karoten kloroform ile çözülmüştür. Üzerine linoleik asit ve tween 80 ilave edilmiştir. Kloroformun uçurulması ardından oksijenlendirilmiş distile su ilave edilerek emülsiyon hazırlanmıştır. Emülsiyona 1 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan ekstraktlar eklenerek 50 °C su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır ve spektrofotometre kullanılarak 470 nm'de 20 dakika aralıklar ile 2 saat boyunca ölçümü yapılmıştır. Çalışmada BHT ve askorbik asit pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda rengin korunması yüzde olarak hesaplanmıştır.

3.2.4.5. Toplam fenolik madde miktarı tayini

Makrofungus ekstraktları tüplere dağıtılarak üzerlerine seyreltilmiş Folin–Ciocalteu reaktifi eklenmiştir. Vorteks ile karıştırma işleminin ardından 3 dakika bekletilen karışımlara Na_2CO_3 çözeltisi eklenmiştir. Oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 2 saat inkübasyon sonrasında spektrofotometre ile 750 nm'de de absorbansları ölçülmüştür.

Elde edilen absorbans değerleri bilinen bir fenolik madde olan gallik asit eşdeğeri hesaplanmasında kullanılmıştır. Gallik asit standart eğrisi ve farklı konsantrasyonlarda oluşan renk değişimi Çizelge 3.6 ve Şekil 3.2 'de verilmiştir.

3.2.3. Sitotoksisite Tayini

3.2.3.1. Hücrelerin kültür ortamında çoğaltılması

İnsan meme kanseri hücre hattı (MCF7) ve Fare embriyo fibroblast hücre hattı (NIH/3T3) %10'luk fetal sığır serumu, %1'lik penisilin ve promisin içeren Dulbecco's

Modified Eagle Medium (DMEM) besiyerine inoküle edilmiştir. Hücreler çoğaltılmak üzere %5 CO_2'li etüvde %95'lik bağıl nem'de 37 °C de inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.3.2. MTT yöntemi ile sitotoksik aktivite

Mitokondri ile tetrozolyum tuzu olan 3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2,4, difeniltetrazolium bromür (MTT) canlı hücreler varlığında mor renk almaktadır (Hu d., 2002). Oluşan rengin azalması ile aktivitenin varlığının belirlendiği kolorometrik bir yöntemdir (Benkli vd., 2009).

Sitotoksik aktivitenin araştırılacağı hücrelerin yeterli seviyede çoğaltılması ardından flasklardan alınarak hücre sayısı belirlenmiştir. Çoğalan hücrelerin flasklardan alınabilmesi için ilk olarak bulundukları besiyeri çekilip atılmıştır. Ardından her bir kuyucuğa PBS eklenerek hücreler kalan besiyerinden arındırılmıştır. Flasklara yapışan hücrelerin kaldırılması amacı ile 1 ml Tripsin EDTA çözeltisi eklenerek 3 dakika inkübatörde inkübe edilmiştir. Tripsinin etkisini nötralize edebilmek için flaska 5 ml besiyeri eklenmiş ve pipetajla kaldırılan hücreler santrifüj tüplerine alınarak hücre süspansiyonu 1200 rpm'de 5 dakika santrüfüjleme sonrasında süpernatantı atılarak üzerine 1 ml besiyeri eklenmiştir. Hücre sayısının belirlenmesi için 10 µl hücre süspansiyonu ve 10 µl tripan mavisi solüsyonu homojen bir şekilde karıştırılmıştır ve bu karışımdan tekrar 10 µl alınıp, hücre sayım cihazının özel slaytlarına pipetlenmiştir ve Cedex hücre sayım cihazında sayılmıştır. Hücreler her bir kuyucukta $1x10^5$ olacak şekilde besiyeriyle dilüye edilmiştir.

Hücreler 96 kuyucuklu plakaların her kuyucuğuna $1x10^5$ hücre olacak şekilde ekilip ve 24 saat inkübe edilmiştir. Ertesi gün DMSO ile konsantrasyonları ayarlanan (500-31.25 µg/mL) makrofungus ekstraktları eklenerek 24 saat boyunca 37 °C %5'lik CO_2'li %95'lik bağıl nemli etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacı ile her bir kuyucuğa 10 µl MTT solüsyonu (5 mg/ml) eklenerek 4 saat 37 °C etüvde bekletilmiştir. Ardından DMSO çözeltisi eklenerek formazon tuzunun çözünmesi sağlanmıştır ve 540 nm'de mikroplaka okuyucusu ile absorbasların ölçümü gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.3. Akış sitometride Annexin V-PI yöntemi ile apoptotik etkinin belirlenmesi

Fosfolipitlerin plazma membranından hücre yüzeyine translokasyonu hücrelerin erken apoptoz geçirdiğini göstermektedir (Liu vd., 2009). Yöntemde anneksin V hücrenin dış yüzeyine yerleşen fosfatidilserine bağlanabilen bir proteindir ve floresan bir madde ile işaretlendirilerek görünür hale getirilebilmektedir.

MTT yöntemi sonucu elde edilen veriler ile OBCC 3 ve OBCC 5109 kodlu izolatların Annexin V-PI ticari kiti kullanılarak apoptotik etkisi araştırılmıştır. Çalışmada ilk olarak MCF7 ve 3T3 hücreleri %10'luk fetal sığır serumu, %1'lik penisilin ve promisin içeren DMEM besiyerine ekilerek çoğaltılmışlardır. Yeterli düzeyde çoğalma gerçekleşince hücre sayımı yapılarak $1x10^5$ hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara aktarılarak 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Hazır olan hücrelere makrofungus izolatlarının MTT verilerine göre seçilen konsantrasyonları (500-250 µg/mL) eklenmiştir ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından hücrelerin kaldırılması sağlanarak 1200 rpm'de 5 dakika santrüfüj edilmiştir. Santrüfüj ardından süpernatant uzaklaştırılarak kalan hücre pelleti 2 kez PBS ile yıkanmıştır. Annexin tamponu eklenerek flow tüpüne aktarılan hücrelere 5 µ l Annexin V ve 5 µl promidyum iyodür (PI) eklenerek 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 250 µl 'Annexin V bağlama tamponu' eklenerek akış sitometri cihazında ölçümleri ve analizleri gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak ekstrakt eklenmemiş hücre kullanılmıştır.

3.2.4. Antimikrobiyal Aktivite Tayini

Yapılan tarama çalışması ile yüksek inhibisyon değeri veren OBCC 3, OBCC 5109 OBCC 6061 ve OBCC 6069 kodlu izolatların kültür sıvılarının etil asetat ile ekstraksiyonu sonrasında elde edilen ektraktlarının, belirlenen test mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Antimikrobiyal aktivitenin araştırılmasında ilk olarak kalitatif duyarlılık testi olan disk difüzyon yöntemi uygulanmıştır. Ardından minimal inhibitör konsantrasyon yöntemi (MİK) ve bu testin sonucu beraberinde minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) yöntemi uygulanarak değerlendirilmiştir.

3.2.4.1. Disk difüzyon yöntemi

Kullanılan yöntem, katı besiyerine ekimi yapılan test mikroorganizmasının üzerine ekstrakt emdirilen disklerin aktarılması ile difüze olması ve ardından zon oluşturması esasına dayanmaktadır (Tendencia vd., 2004).

Makrofungus izolat ekstraktları 6 mm çapında disklere 50 ve 100 µg ekstrakt olacak şekilde emdirilmiş ve steril ortamda kurutulmuştur. Antimikrobiyal aktivitesi araştırılacak test mikroorganizması olarak kullanılan bakteriler MHB, mayalar SDB ve küfler ise MEA besiyerinde 24 / 48 saat üretilmişlerdir. Sıvı besiyerinde üreyen bakteri ve maya kültürlerinin McFarland 0,5 standardına göre hücre yoğunlukları üretildikleri sıvı besiyeri yardımı ile ayarlanmıştır. Üretilen küflerin tween 80 çözeltisi ile spor süspansiyonu hazırlanıp Thoma lamında spor sayımı yapılarak spor sayısının 10^6 olacak şekilde seyreltilmiştir. Hücre yoğunlukları ayarlanan organizmalar uygun besiyerleri bulunan petri kaplarına 100 µl aktarılarak Drigalski spatülü ile yayılmıştır. Ardından test mikroorganizmalarının inoküle edildiği besiyeri üzerine ekstrakt emdirilip kurutulan diskler yerleştirilmiştir. Yöntemde pozitif kontrol olarak bakteriler için vankomisin, eritromisin ve kloramfenikol; maya ve küfler için ketokonazol ve flukonazol kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise ekstraktların hazırlanmasında kullanılan çözücü olan metanol emdirilmiş diskler kullanılmıştır.

İnkübasyon süreleri sonunda disklerin etrafında oluşan zonların çapları milimetrik olarak ölçülerek değerlendirilmiştir.

3.2.4.2. Minimal inhibitör konsantrasyon yöntemi (MİK)

Bu yöntem, antimikrobiyal etkinin varlığının disk dizfüzyon yöntemi ile belirlenmesi ardından etkili olan dozun belirlenmesi amacı ile uygulanmıştır. Yöntemde 4000 µg/ml konsantrasyonda hazırlanan ekstraktlardan 96 kuyucuklu plakanın ilk kuyucuğuna 100 µl olarak aktarılmıştır. Ardından steril ringer çözeltisi bulunan kuyucuklarda 1/2 oranında seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir. Böylece seyreltmenin ardından plakada 4000 ve 31,25 µg/ml konsantrasyon aralığında ekstrakt bulunduğu kuyucuklar hazırlanmıştır. MHB besiyerinde üretilen mikroorganizmaların hücre yoğunlukları McFarland no. 0.5 standardına göre ayarlanmıştır. Her kuyucuğa çift kuvvetli 100 µl MHB besiyeri eklenmiştir ve ardından

10 µl organizmaların inokülasyonu gerçekleştirilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun ardından mikrobiyal büyümeyi göstermek için plakalara tetrozolyum tuzu eklenmiştir ve 4 saat sonunda sonuçlar değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak kloramfenikol (2000 µg/ml) ve eritromisin (2000 µg/ml) kullanılmıştır. Ekstraktların çözücüsü olan metanol ise negatif kontrol olarak değerlendirilmiştir.

Elde edilen veriler ile plakalarda büyümenin gözlemlenmediği kuyucukların minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerinin belirlenmesi amacı ile MHA besiyerlerine ekimleri yapılarak üremeleri değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. DPPH yöntemi ile yüksek antioksidan aktiviteye sahip kültür sıvısının belirlenmesi

OBCC kültür koleksiyonundan seçilen 54 makrofungus izolatının sıvı besiyerinde üretilmeleri ardından kültür sıvıları kullanılarak DPPH radikali süpürücü aktivite ve toplam fenolik madde içerik tayinleri ile antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Yüksek aktivite gösteren izolatların seçilebilmesi amacı ile DPPH radikali süpürücü aktivite tayininden elde edilen % inhibisyon değerlerine göre izolatlar karşılaştırılmıştır. Üretilen izolatların kültür sıvıları ayırılırken elde edilen hücre kitleleri kurutulup tartılarak eşzamanlı olarak biyomas ağırlıkları elde edilmiştir.

Yöntem stabil özellikte bir serbest radikal olan DPPH kullanılarak antioksidan aktivitenin varlığının belirlenmesi için geliştirilmiş bir yöntemdir (Kedare ve Singh, 2011). Reaksiyon gerçekleşirken DPPH' ın elektron alması ile çözelti menekşe renginden sarı renge doğru açılma gösterir ki bu durum DPPH molekülünün indirgendiğini ifade etmektedir. Aynı zamanda karmaşık biyolojik sistemlerde antioksidanların radikal süpürücü aktivitesinin değerlendirilmesinde kolay ve ekonomik bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Kedare ve Singh, 2011). Makrofungus izolatlarının biyomas ağırlıkları, DPPH radikali süpürücü aktivite ve toplam fenolik madde içerik değerleri Çizelge 4.1'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1 Makrofungus izolatlarının DPPH radikal giderimi, toplam fenolik madde içerikleri ve biyomas ağırlıkları

OBCC Kodu	**DPPH (% Giderim)**	**Toplam Fenolik Madde Miktarı (mg GEA/ 100 ml Besiyeri)**	**Biyomas (mg / 100 ml Besiyeri)**
3	25,63	8,24	333,00
1004	13,68	5,41	409,33
1010	12,39	5,45	341,33

Çizelge 4.1 Makrofungus izolatlarının DPPH radikal giderimi, toplam fenolik madde içerikleri ve biyomas ağırlıkları (devam)

OBCC Kodu	**DPPH (% Giderim)**	**Toplam Fenolik Madde Miktarı (mg GEA/ 100 ml Besiyeri)**	**Biyomas (mg / 100 ml Besiyeri)**
1146	10,56	5,10	303,50
3012	12,94	5,73	391,33
3013	14,97	6,56	299,67
5008	13,55	5,95	408,00
5090	12,59	5,43	397,67
5091	16,88	5,55	416,00
5092	11,93	6,77	122,00
5093	9,84	6,07	191,00
5094	13,56	6,45	313,00
5095	12,94	6,29	211,00
5096	10,98	5,90	237,67
5098	14,65	5,97	356,00
5099	12,44	5,18	354,00
5100	12,80	6,10	199,00
5101	9,72	5,94	209,33
5102	13,23	5,57	437,00
5103	12,84	6,18	394,67
5106	18,22	7,03	323,33
5108	17,55	6,64	314,67

Çizelge 4.1 Makrofungus izolatlarının DPPH radikal giderimi, toplam fenolik madde içerikleri ve biyomas ağırlıkları (devam)

OBCC Kodu	**DPPH (% Giderim)**	**Toplam Fenolik Madde Miktarı (mg GEA/ 100 ml Besiyeri)**	**Biyomas (mg / 100 ml Besiyeri)**
5109	20,82	6,78	345,67
5110	1,21	6,28	452,67
5111	13,87	7,06	205,00
5116	10,31	5,40	359,33
6035	11,30	6,16	390,67
6050	14,69	6,37	368,00
6051	11,33	6,31	246,33
6052	14,79	6,48	352,67
6053	8,33	5,63	322,67
6054	14,96	7,75	373,67
6055	10,20	6,28	249,67
6056	10,59	7,22	413,00
6057	15,48	7,36	160,00
6058	15,74	6,64	334,33
6059	18,15	7,41	308,00
6060	10,81	4,97	316,00
6061	28,19	6,42	416,67
6062	16,94	6,28	434,00
6063	7,37	5,19	261,67

Çizelge 4.1 Makrofungus izolatlarının DPPH radikal giderimi, toplam fenolik madde içerikleri ve biyomas ağırlıkları (devam)

OBCC Kodu		**DPPH (% Giderim)**	**Toplam Fenolik Madde Miktarı (mg GEA/ 100 ml Besiyeri)**	**Biyomas (mg / 100 ml Besiyeri)**
6064		13,76	6,80	168,00
6065		12,20	6,08	207,00
6066		7,99	4,60	356,00
6067		8,31	4,74	443,00
6068		10,10	6,39	270,00
6069		33,16	9,27	379,00
6070		19,70	6,37	396,67
6071		14,00	7,08	445,67
6072		11,31	6,28	152,00
6073		21,65	7,11	157,33
6074		12,11	6,05	346,00
6076		12,61	4,16	511,00
AA (mg/ml)	0,1	36,98	-	-
	0,2	69,84		
	0,3	94,54		
BHT (mg/ml)	0,1	15,39	-	-
	0,2	24,62		
	0,3	32,54		
Besiyeri		19,75	7,60	-

Antioksidan aktivitelerine göre değerlendirilerek yapılan tarama çalışmasının sonucuna göre yüksek DPPH radikal süpürücü aktivite değerine sahip olan OBCC 3, OBCC 5109, OBCC 6061 ve OBCC 6069 kodlu izolatlar seçilerek diğer aktivite çalışmalarının yapılmasına karar verilmiştir.

4.2. Seçilen makrofungusların antioksidan aktivitesinin araştırılması

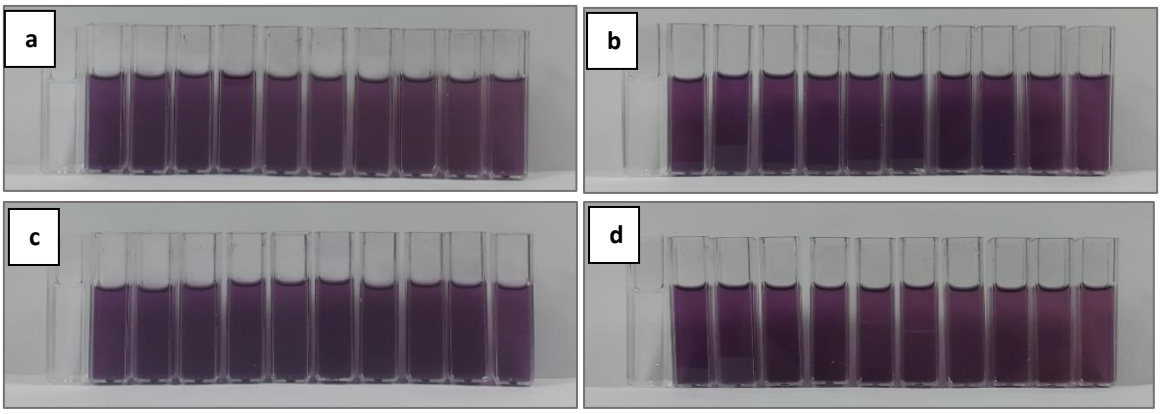
4.2.1. DPPH radikal süpürücü aktivite tayini

Yapılan tarama çalışması ile seçilen makrofungus ekstraktlarının her biri için 0,1-1 mg/ml aralığında ardışık 10 konsantrasyon hazırlanarak çalışılmıştır. OBCC 3, OBCC 5109, OBCC 6061 ve OBCC 6069 kodlu izolat ekstraktlarının her konsantrasyonu için DPPH radikal süpürücü antioksidan aktivite absorbans değerleri ölçülmüştür. Absorbans değerleri ile lineer regresyon grafiği çizilip elde edilen denklem ile DPPH derişimini yarıya düşüren ekstrakt miktarları belirlenmiştir.

Elde edilen veriler doğrultusunda izolat ekstraktlarının EC_{50} değerlerinin pozitif kontroller ile rekabet edebilecek seviyede bir aktiveye sahip olmadığı belirlenmiştir. EC_{50} değerleri açısından OBCC 6069 > OBCC 3 > OBCC 6061 > OBCC 5109 sırasında aktivite göstermektedirler. Ekstraktların EC_{50} değerleri ve Çizelge 4.2 ‘te sunulmuştur.

Çizelge 4.2 İzolatların ve bilinen antioksidanların DPPH radikal süpürücü antioksidan aktivite testi için EC_{50} değerleri

Fungus İzolat Kodu	**EC_{50} Değerleri (mg/ml)**
OBCC 3	2,303
OBCC 5109	4,145
OBCC 6061	2,877
OBCC 6069	1,934
Askorbik asit	0,137
BHT	0,505



Şekil 4.1 İzolatların DPPH radikal süpürücü aktivite tayini renk değişimleri (sol başta kör 0,1-0,2-0,3-0,4-0,5-0,6-0,7-0,8-0,9-1 mg/ml konsantrasyonları) a: OBCC 3, b: OBCC 5109, c: OBCC 6061, d: OBCC 6069

Antioksidan aktivitenin araştırıldığı hızlı sonuç alınan en yaygın yöntem olan DPPH radikali süpürücü aktivite tayini ile ilgili literatürde pek çok çalışmaya rastlanmaktadır.

Dulay vd. (2017) *Lentinus tigrinus* ve *Pleurotus djamour*'un hekzan ve asetonitril ekstraktları ile yaptıkları çalışmada DPPH radikal giderimlerinin EC_{50} değerlerini sırası ile 0,638 mg/ml ve 0,710 mg/ml olarak rapor etmişlerdir. Başka bir çalışmada Yalçın vd. (2020) *Ganoderma carnosum* Pat. ve *Ganoderma pfeifferi* Bres. türlerinin etil asetat, metanol ve su ile ekstraksiyonu sonrası yaptıkları DPPH radikal giderim tayini sonuçlarını troloks eşdeğeri olarak sunmuşlardır. Çalışmalarında *G. carnosum ve G. pfeifferi*'nin etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının EC_{50} değerleri sırası ile 41,63, 215,85, 125,28 ve 42,97 30,60, 103,02 mg TE/ g ekstrakt olarak rapor etmişlerdir. Charumathy vd. (2016) yaptıkları çalışmalarında ise *Hericium erinaceus*'un sıcak su ile ekstrakte edip farklı konsantrasyonlarının DPPH radikal giderimini araştırmışlardır. Elde ettikleri EC_{50} değerlerini 2,13 mg/ml olarak rapor etmişlerdir.

Çizelge 4.3 Makrofungus izolatlarının bazı diğer çalışmalarla kıyaslanması

Çalışılan Makrofungus	**EC_{50} Değerleri (mg/ml)**	**Referans**
Hericium erinaceus	2,13	Charumathy vd. (2016)
Lentinus tigrinus	0,638	Yalçın vd. (2019)
Pleurotus djamour	0,710	Yalçın vd. (2019)
A. auricula-judae (metanol)	0,855	Oke ve Aslim (2011)
A. auricula-judae (su)	0,309	Oke ve Aslim (2011)
P. eryngii (metanol)	0,909	Oke ve Aslim (2011)
P. eryngii (su)	0,545	Oke ve Aslim (2011)
Ganoderma lucidum	0,730	Taofiq vd. (2017)
OBCC 3	2,303	Bu çalışma
OBCC 5109	4,145	Bu çalışma
OBCC 6061	2,877	Bu çalışma
OBCC 6069	1,934	Bu çalışma

Çalışmada kullanılan izolatlar farklı çalışmalar ile karşılaştırıldığında OBCC 6069 kodlu izolatın yüksek aktiviteye sahip olduğu söylenebilmektedir (Çizelge 4.3). İzolatların kültür sıvısının ekstraksiyonu ile elde edilen sekonder metabolitlerin fruktifikasyon yapıları ile araştırılan DPPH radikal süpürücü aktiviteye oranla yüksek aktivite gösterebileceği yorumu yapılabilmektedir.

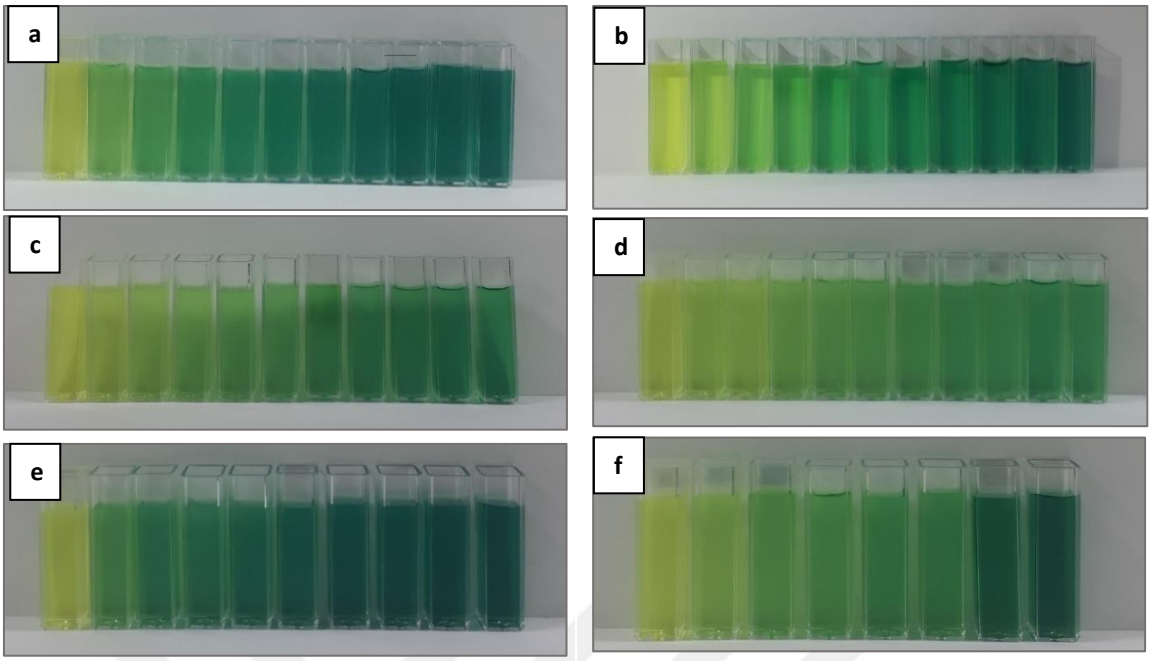
4.2.2. Redükleyici güç ölçümü ile antioksidan aktivite tayini

Redükleyici güç ölçümü ile antioksidan aktivite tayininde, antioksidanlar elektron bağışı yaparak Fe^{3+} iyonlarını Fe^{2+} iyonlarına dönüştürmektedir. Elektronların reaktif serbest radikal türlerine bu şekilde bağlanması ile serbest radikal zincir reaksiyonlarının sona ermesini desteklemektedir (Sudha vd., 2016).

Çalışmada kullanılan izolat ekstraktları ile hazırlanan 0,1-1 mg/ml aralığında ardışık konsantrasyonlar kullanılarak Fe^{3+} iyonlarının Fe^{2+} iyonlarına indirgemesi deney sonunda spektrofotmetrede ölçümü yapılarak elde edilen absorbanslar ile belirlenmiştir. Absorbanslardan çıkarılan grafik ile EC_{50} değerleri hesaplanan izolatlar değerlendirildiğinde OBCC 6069 kodlu izolatın diğer izolatlara oranla redükleme gücünün yüksek olduğu belirlenmiştir. Redükleme gücü araştırılan izolatlar ve pozitif kontrollerin EC_{50} değeri Çizelge 4.4 ve Şekil 4.2 sunulmuştur.

Çizelge 4. 4 İzolatların ve bilinen antioksidanların redükleyici güç testi için EC_{50} değerleri

Fungus İzolat Kodu	**EC 50 (mg/ml)**
OBCC 3	0,570
OBCC 5109	1,464
OBCC 6061	0,853
OBCC 6069	0,416
Askorbik Asit	0,043
BHT	0,110



Şekil 4.2 İzolatların redükleyici güç tayini renk değişimleri (sol başta kör 0,1-0,2-0,3-0,4-0,5-0,6-0,7-0,8-0,9-1 mg/ml konsantrasyonları) a: OBCC 3, b: OBCC 5109, c: OBCC 6061, d: OBCC 6069, e: Askorbik asit, f: BHT

Antioksidan aktivitenin araştırıldığı reaktiflerin indirgenmelerinin değerlendirilebildiği yöntemlerden biri olan redükleyici güç tayini ile ilgili olarak literatürde birçok araştırmacının çalışmaları mevcuttur.

Lee vd. (2007), *Hypsizigus marmoreus* (Peck) Bigelow' un etanol, soğuk ve sıcak su ektraksiyonu ile elde ettikleri ekstraktların redükleyici güç aktivitesini araştırmışlardır. EC_{50} değerlerini sırası ile 12,0, 2,24 ve 6,08 mg/ml olarak belirlenen değerlerin kullanılan farklı ekstraksiyon çözücülerinin elde ettikleri metabolitler ile aktivite arasındaki farkı sunmaktadır. Yapılan bir diğer çalışmada ise, Shon vd. (2003) redükleyici gücünü araştırdıkları *Phellinus baumii* makrofungusunun 1 mg/ml konsantrasyondaki metanol, etil asetat, butanol, su ve kloroform ekstraktlarının absorbans değerlerinin sırası ile 1,94, 3,00, 2,86, 1,99 ve 3,00 olduğunu rapor etmişlerdir.

Çizelge 4.5 Makrofungus izolatlarının redükleyici güç ile elde edilen EC_{50} değerlerinin bazı diğer çalışmalarla kıyaslanması

Çalışılan Makrofunguslar	**EC_{50} Değerleri (mg/ml)**	**Referanslar**
Hypsizigus marmoreus (etanol)	12,00	Lee vd. (2007)
Hypsizigus marmoreus (sıcak su)	2,24	Lee vd. (2007)
Hypsizigus marmoreus (soğuk su)	6,08	Lee vd. (2007)
Schizophyllum commune (etanol)	0,83	Devi vd. (2014)
Ganoderma lucidum	0,15	Taofiq vd. (2017)
Agaricus silvaticus Schaeff (su)	0,72	Garrab vd (2019)
Hydnum rufescens Pers (su)	0,37	Garrab vd (2019)
Meripilus giganteus (Pers.) Karst. (su)	0,55	Garrab vd (2019)
Agaricus silvaticus Schaeff (metanol)	0,49	Garrab vd (2019)
Hydnum rufescens Pers(metanol)	0,40	Garrab vd (2019)
Meripilus giganteus (Pers.) Karst. (metanol)	0,50	Garrab vd (2019)
OBCC 3	0,57	Bu çalışma
OBCC 5109	1,46	Bu çalışma
OBCC 6061	0,85	Bu çalışma
OBCC 6069	0,42	Bu çalışma

Literatür ile karşılaştırıldığında, çalışmada kullanılan makrofungus izolatlarının her birinin redükleyici güç aktivitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.5). OBCC 6069

kodlu izolatın ise genel alamda bakıldığında karşılaştırılan çalışmalar arasında düşük EC_{50} değeri ile yüksek bir aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

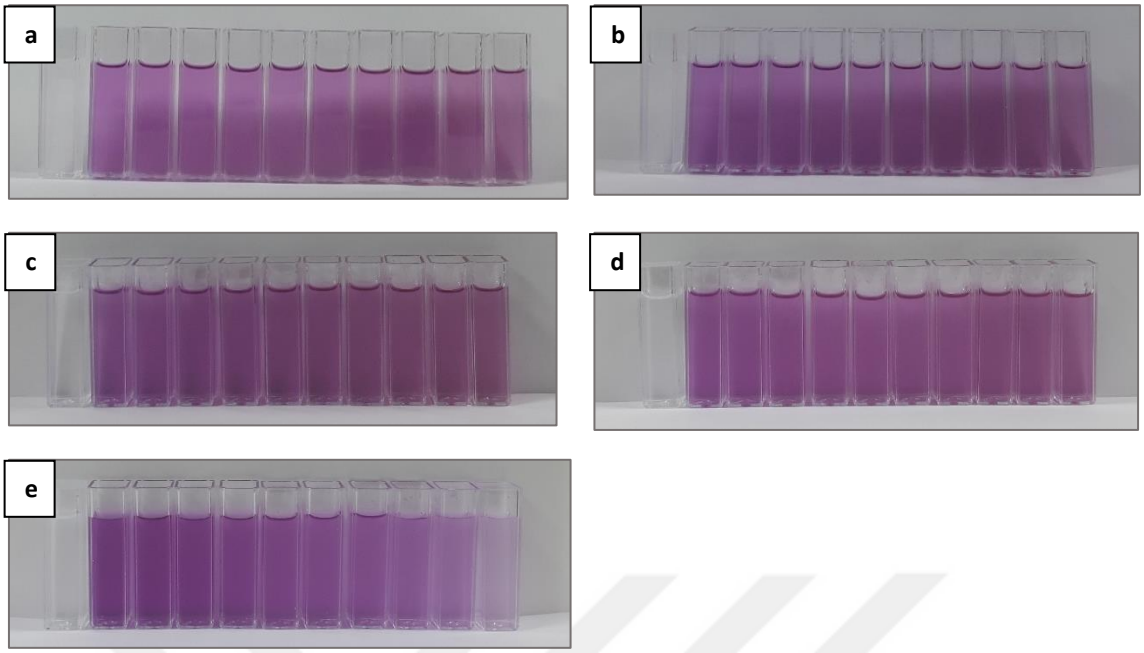
4.2.3. Metal şelatlayıcı aktivite tayini

Geçiş metallerinin Fenton ve Haber-Wess reaksiyonları ile hidroksil radikallerinin üretilmelerinde katalize edici bir rol oynadığı ve üretilen hidroksil radikallerinin lipidin perokside olmasına sebep olduğu belirtilmektedir. Bu nedenlerden dolayı antioksidan özelliklerin başında metalleri şelatlama yeteneğine sahip olması gelmektedir (Özparlak vd., 2016).

Çalışmada şelatlama yeteneğinin ölçülmesi, ekstraktların içinde yer alan antioksidan moleküllerin ferrozin ile yaptıkları şelatlama yarışı ile belirlenmiştir. İzolatların aktiviteleri pozitif kontrol ile yarışamayacak düzeydedir. Ancak kendi aralarında karşılaştırıldıklarında OBCC 6061 kodlu izolatın ön sırada yer aldığı, ardından OBCC 5109, OBCC 3 ve OBCC 6069 sırası ile yer aldıkları gözlemlenmektedir. İzolat ekstraktlarının metal şelatlama aktivitelerinin EC_{50} değerleri Çizelge 4.6 ve Şekil.4.3'de sunulmuştur.

Çizelge 4.6 İzolatların metal şelatlama aktivite tayini ile elde edilen EC_{50} değerleri

Fungus İzolat Kodu	**EC_{50} (mg/ml)**
OBCC 3	9,878
OBCC 5109	3,592
OBCC 6061	2,730
OBCC 6069	17,805
EDTA	0,013



Şekil 4.3 İzolatların metal şelatlama aktivite tayini ile elde edilen renk değişimleri (sol başta kör 0,1-0,2-0,3-0,4-0,5-0,6-0,7-0,8-0,9-1 mg/ml konsantrasyonları) a: OBCC 3, b: OBCC 5109, c: OBCC 6061, d: OBCC 6069, e: EDTA

Dündar vd. (2016) *A. arvensis, A. campestris, A. mellea, F. fomentarius, C. micaceus, C. versicolor* ve *L. deliciosus* makrofunguslarının metanol ile yapılan ekstraksiyonu sonrası 4 mg/ml konsantrasyonlarda metal şelatlama aktivite inhibisyonlarının sırası ile %78,12, %75,23, %68,41, %82,78, %55,17, %73,56 ve %88,68 olduğunu belirlemişlerdir.

Yapılan bir diğer çalışmada Bahadori vd (2019), *Melanoleuca cognata* (Fr.) Konrad ve *Melanoleuca stridula* (Fr.) Singer makrofungus örneklerinin etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. Metal şelatlama aktivitelerini araştırdıkları etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının EC_{50} değerlerini *M. cognata*'nın 0,93, 8,84 ve 21,7 µmol EDTA eş değeri/g kuru ağırlık, *M. stridula*'nın ise 0,54, 9,4 ve 18,9 µmol EDTA eş değeri/g kuru ağırlık olduğunu rapor etmişlerdir.

Öke ve Aslım (2011), *A. auricula-judae* ve. *P. eryngii'*nin su ve metanol ekstraktlarının şalatlama aktivitesini araştırmışlardır. Araştırmaları sonucuna göre *A. auricula-judae*'nın su ve metanol ekstraktlarının aktiviteleri sırası ile 3,08 ve 1,52 mg/ml iken *P. eryngii'*nin ise 5,23 ve 0,42 mg/ml olduğunu belirlemişlerdir.

Orhan ve Üstün (2011), çalışmalarında *Cantharellus cibarius, Polyporus gilvus, Polyporus sulphureus, Polyporus annosus, Polyporus pinicola, Polyporus volvatus, Polyporus fomentarius, Polyporus stevenii* ve *Trametes versicolor*'un etonal ekstraklarını 5 mg/ml konsantrasyonda kullandıkları metal şelatlayıcı aktivite tayininde aktiviteye sahip olmadıklarını belirlemişlerdir. Ancak *Polyporus radiatus*'un %18,05, *Lactarius deliciosus*'un %33,30 ve *Polyporus badius* izolatının ise %23,22 inhibisyon değeri verdiğini belirlemişlerdir.

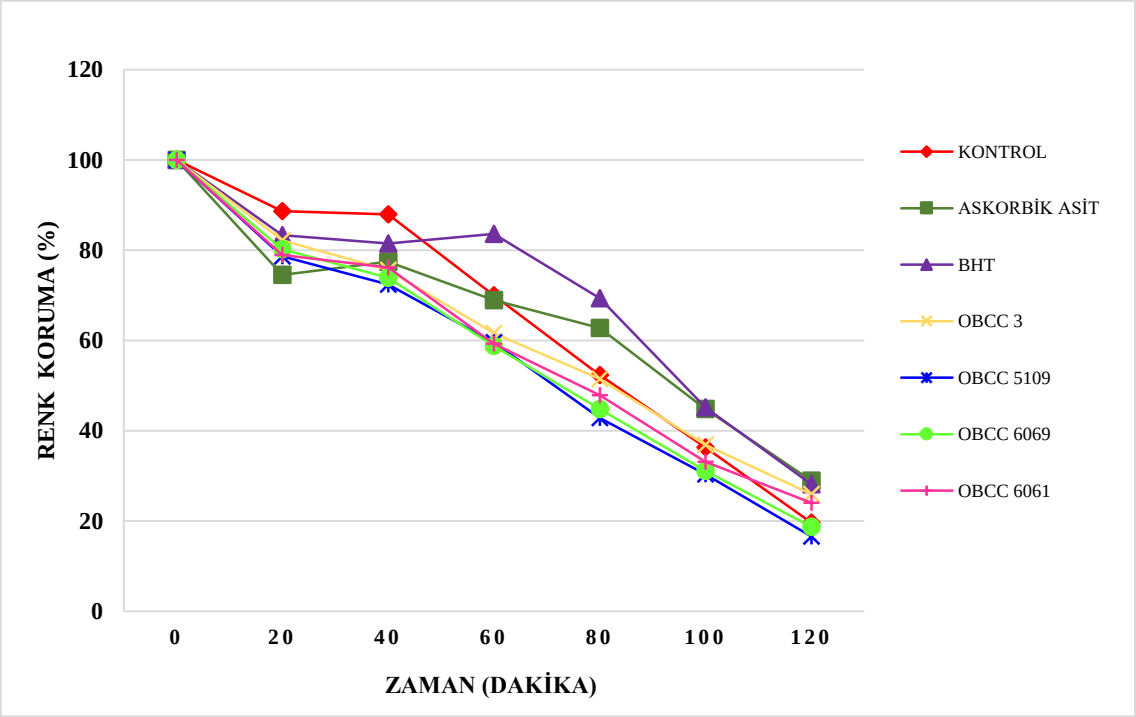
Literatürde araştırmacılar tarafından metal şelatlama aktivitesi araştırılan makrofunguslar ve çalışmamızda kullandığımız izolatlar karşılaştırıldığında OBCC 5109 ve OBCC 6061 kodlu izolatın EC_{50} değerleri ile öne geçtiği gözlemlenmektedir. OBCC 3 ve OBCC 6069 kodlu izolatların diğer yöntemlerde yüksek aktivite değerlerine sahip iken metal şelatlama aktivitelerinin çok düşük seviyelerde seyrettiği diğer çalışmalar ile karşılaştırmalar sonucunda belirlenmiştir.

4.2.4. Beta karoten – lineloik asit yöntemi

Beta karoten – lineloik asit yönteminde, serbest radikaller bir molekülü hedef aldığında antioksidanların o molekülü koruma yeteneği ve lipit oksidasyonunu önleme ya da geciktirme kapasitesini ölçmektedir (Olszowy ve Dawidowicz 2016). Model lipit substratı kullanıldığında yöntemde oluşturulan deney ortamı gıdalarda ve insanlarda meydana gelen gerçek lipit sistemine yakın olmaktadır (Koleva vd., 2002).

Sistemde oluşturulan peroksil radikallerinin beta-karotene bağlanması ile çözelti rengi açılmaktadır. Ekstraktlarda bulunan antioksidan moleküllerinin beta-karoteni koruyarak rengin açılmasını önlenmesi yüzde koruma olarak hesaplanmıştır. İzolat ekstraktlarının % renk koruma aktiviteleri incelendiğinde OBCC 3 > OBCC 6061 > OBCC 6069 > OBCC 5109 kodlu izolatların koruma aktiviteleri sırasında olduğu belirlenmiştir. İzolatların beta karoten – lineloik asit yönteminde elde edilen yüzde koruma değerleri Çizelge 4.7 'de sunulmuştur.

Çizelge 4.7 Beta karoten- linoleik asit yöntemi ile renk koruma yüzdeleri



Beta karotenin renginin korunması ile belirlenen antioksidan aktivite çalışmalarından biri olan beta karoten-linoleik asit yöntemi ile literatürde pek çok çalışmalar mevcuttur.

Li vd. (2012), *Ganoderma atrum*'mun etanol ekstraktını kullanarak yaptıkları çalışmalarında beta-karoten linoleik asit yöntemi ile ekstraktın EC_{50} değerinini 2301.08 µg/ml olarak rapor etmişlerdir.

Çelik vd. (2014) *Ganoderma lucidum* ile yaptıkları çalışmalarında ise etanol ve metanol ile elde ettikleri ekstraktlarının EC_{50} değerlerinini sırası ile 0,425 ve 0,224 mg/g olarak belirlemişlerdir.

Çalışmada kullanılan izolatların renk koruma yüzdeleri ve konsantrasyonlar değerlendirildiğinde diğer çalışmalarda kullanılan izolatların suş farkı ve ekstraksiyon çözeltilerinin farklılığı nedeni ile renk koruma gücünün değişebildiğini göstermektedir. Kıyaslama yapıldığında kullanılan izolatların aktivitesinin yarıştırılabilir düzeyde olduğu

kanaatine varılırken, bazı çalışmalar ile karşılaştırıldığında ise düşük aktivite gösterdiği gözlemlenmektedir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8 Makrofungus izolatlarının ve bazı diğer çalışmaların % renk korumalarının karşılaştırılması

Çalışılan Makrofunguslar	**Konsantrasyonlar (mg/ml)**	**% Renk Koruma**	**Referanslar**
Ganoderma lucidum (etanol)	0,425	50	Çelik vd. (2014)
Ganoderma lucidum (metanol)	0,224	50	Çelik vd. (2014)
Ganoderma atrum	2,301	50	Li vd. (2012),
Cantharellus cibarius	5	3,50	Orhan ve Üstün (2011)
Polyporus gilvus	5	2,21	Orhan ve Üstün (2011)
Polyporus annosus	5	3,50	Orhan ve Üstün (2011)
Lactarius deliciosus	5	17,46	Orhan ve Üstün (2011)
OBCC 3	1	25,95	Bu çalışma
OBCC 5109	1	16,63	Bu çalışma
OBCC 6061	1	24,04	Bu çalışma
OBCC 6069	1	18,72	Bu çalışma

4.2.5. Toplam fenolik madde miktarı tayini

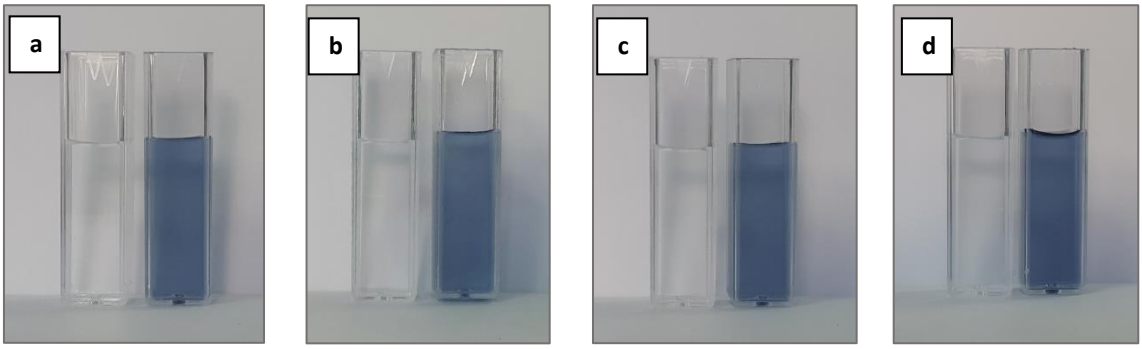
Makrofungus ekstraktların antioksidan gücünün fenolik maddelerden kaynaklı olduğu ve aralarında yüksek bir koralasyonun olduğu bilinmektedir (Kosanić vd., 2017). Fenolik bileşikler serbest radikallere hidrojen verebilen ve fenolik hidroksil gruplarının varlığından dolayı lipit oksidasyonunun başlangıç aşamasında durdurabilen potansiyele sahip antioksidanlardır (Kosanić vd., 2012).

Yöntemde Folin–Ciocalteu çözeltisi fenolik maddeler ile redoks tepkimesine girerek mavi renk vermektedir. Değişen rengin absorbans değerleri gallik asit standart eğrisinden çıkarılan denklem ile değerlendirilmiştir.

Çalışmada izolatların fenolik madde içerikleri değerlendirildiğine OBCC 6069 kodlu izolatın yüksek fenolik maddeye sahip olduğu, takibinde OBCC 3, OBCC 6061 ve OBCC 5109 kodlu izolatların izlediği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar gallik asit eşdeğeri olarak Çizelge 4.9 ve Şekil 4.4’ de sunulmuştur.

Çizelge 4.9 İzolatların gallik asit eşdeğeri cinsinden toplam fenolik madde miktarı değerleri

Fungus İzolat Kodu	**Toplam Fenolik Madde Miktarı (mg GEA/ g ekstrakt)**
OBCC 3	74,59
OBCC 5109	44,59
OBCC 6061	68,77
OBCC 6069	76,08



Şekil 4.4 İzolatların fenolik madde içeriklerine göre renk değişimleri (sol baştan kör-örnek 1 mg/ml) a: OBCC 3, b: OBCC 5109, c: OBCC 6061, d: OBCC 6069

Makrofungusların antioksidan aktivitelerinin araştırıldığı çalışmalarda fenolik maddelerin varlığı her defasında sorgulanmaktadır.

Ivone vd., (2016) yaptıkları çalışmalarında fruktifikasyon yapısını kullandıkları *Ganoderma curtisii*'nin etanol ve etanol:su (60:40, v/v) ile sırasıyla 78 °C ve 80 °C ile ısı kullanarak yaptıkları ekstraksiyonda elde ettikleri ekstraktlarının fenolik madde miktarlarını 49,15 ve 35,63 mg GAE / g ekstrakt olarak tespit etmişlerdir.

Modi vd., (2014) *Ganoderma lucidum* fruktifikasyon yapısının metanol, etil asetat, kloroform ve metanol: etil asetat (50:50, v/v) ile ekstrakte ederek farklı solvetler ile elde ettikleri ekstraktlarının total fenolik madde içeriklerini karşılaştırmak üzere araştırmışlardır. Çalışmaları sonucu metanol, etil asetat, kloroform ve metanol: etil asetat solvent ekstraktlarının fenolik madde içeriklerini sırası ile 83,67, 33,83, 41,81 ve 73,90 mg GEA/ g ekstrakt olarak tespit etmişlerdir.

Bir diğer çalışma Salamah vd., (2018) *Ganoderma amboinense* makrofungusunun maserasyon ve soxalet metodları ile metanol ekstraksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. Toplam fenolik maddelerini araştırdıkları çalışmalarında 26,72 ve 23,27 mg GEA/ g ekstrakt olduğunu belirlemişlerdir.

Çizelge 4.10 Makrofungus izolatlarının ve bazı diğer çalışmaların toplam fenolik madde miktarlarının karşılaştırılması

Çalışılan Makrofunguslar	**Toplam Fenolik Madde Miktarı (mg GEA/g ekstrakt)**	**Referanslar**
Ganoderma curtisii (etanol)	49,15	Ivone vd., (2016)
Ganoderma curtisii (etanol:su)	35,63	Ivone vd., (2016)
Ganoderma lucidum (metanol)	83,67	Modi vd., (2014)
Ganoderma lucidum (etil asetat)	33,83	Modi vd., (2014)
Ganoderma lucidum (kloroform)	41,81	Modi vd., (2014)
Ganoderma lucidum (metanol:etil asetat)	73,90	Modi vd., (2014)
Ganoderma amboinense	26,72 - 23,27	Salamah vd., (2018)
OBCC 3	74,60	Bu çalışma
OBCC 5109	44,60	Bu çalışma
OBCC 6061	68,80	Bu çalışma
OBCC 6069	76,10	Bu çalışma

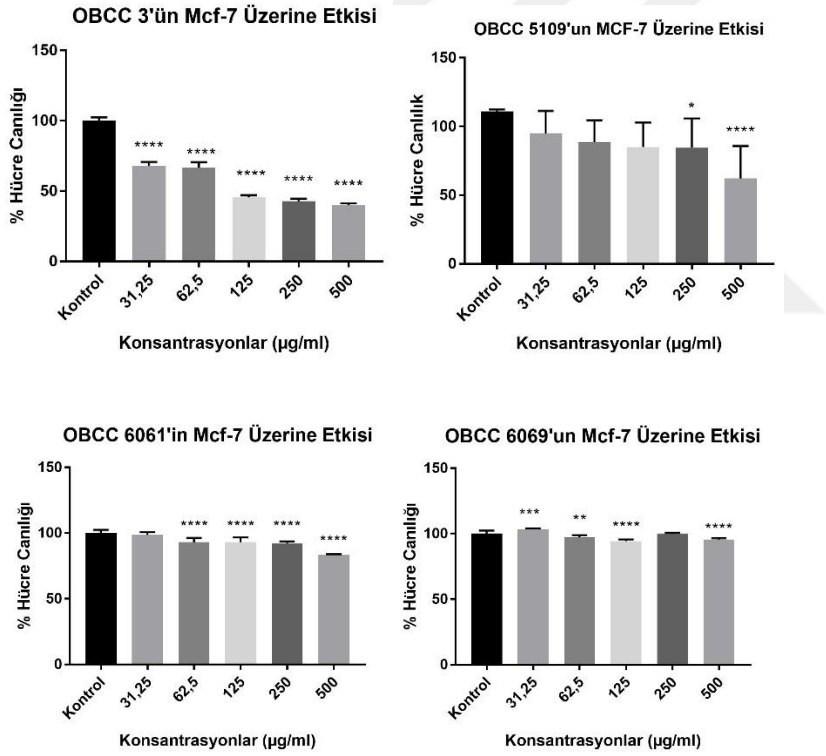
4.3. Sitotoksisite Tayini

4.3.1. MTT yöntemi ile sitotoksik aktivite

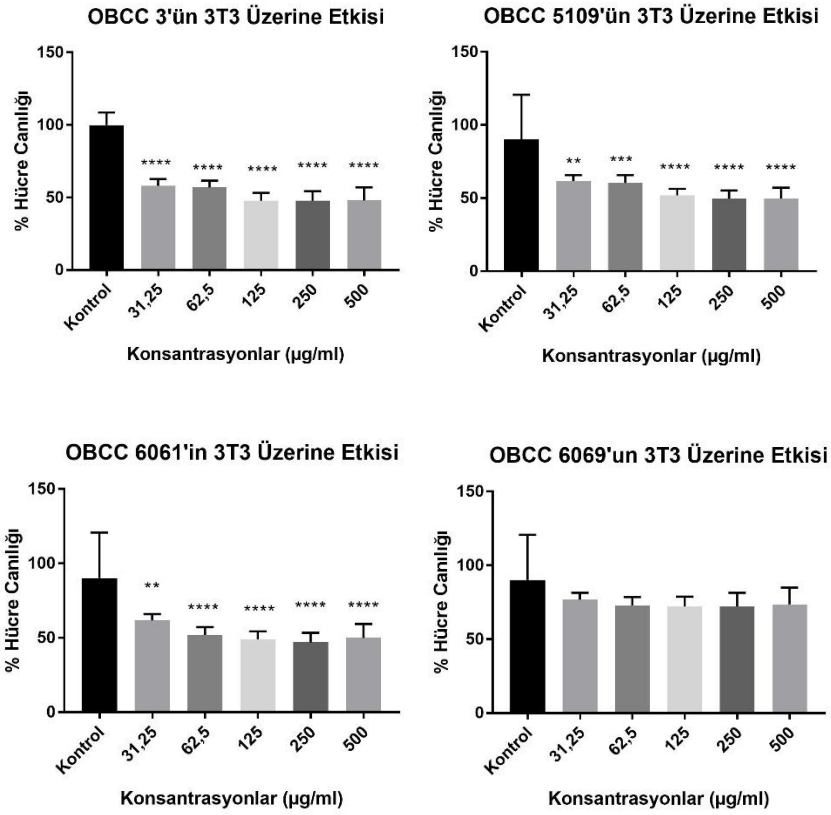
OBCC 3, OBCC 5109, OBCC 6061 ve OBCC 6069 kodlu makrofungus izolat ekstraktları ile yapılan MTT çalışması ile elde edilen sonuçları % canlı hücre ve inhibitör konsantrasyonu (IC_{50}) olarak hesaplanmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonuçları ve IC_{50} değerleri Çizelge 4.11, Şekil 4.5 ve Şkil 4.6'da sunulmuştur.

Çizelge 4.11 İzolat ekstraktlarının sitotoksik etki IC_{50} değerleri

Hücre Hatları / İzolat Kodları	3T3 (IC_{50} µg/ml)	MCF-7 (IC_{50} µg/ml)
OBCC 3	16.79	26,39
OBCC 5109	16.99	57,15
OBCC 6061	17.25	63,16
OBCC 6069	18.27	74,35



Şekil 4.5 İzolat ekstraktlarının MCF-7 hücre hattı üzerine olan sitotoksik etkisi (One-Way ANOVA * kontrole göre anlamlılığı)



Şekil 4.6 İzolat ekstraktlarının 3T3 hücre hattı üzerine olan sitotoksik etkisi (One-Way ANOVA * kontrole göre anlamlılığı)

OBCC 3 ve OBCC 5109 kodlu izolatların kanserli hücre hattı üzerinde daha düşük konsantrasyonda göstermiş oldukları sitotoksik etki varlığı dolayısıyla apoptotik aktivitesinin araştırılmasına karar verilmiştir.

4.3.2. Akış sitometride Annexin V-PI yöntemi ile apoptotik etkinin belirlenmesi

Makrofungus izolatlarının ekstraktları ile sitotoksik etkisinin MTT ile çalışılması sonrasında OBCC 3 ve OBCC 5109 kodlu izolatlarının apoptotik etkisin araştırılmasına karar verilmiştir. MTT ile elde edilen verilerde 500 ve 250 µg/ml konsantrasyonlarının anlamlı bir sitotoksik değer göstermesi ile apoptotik etkinin bu konsantrasyonlarda araştırılmasına karar verilmiştir. Akış sitometrisi ile yapılan Annexin V-PI boyaması sonrasında sonuçlar değerlendirilmiştir (Çizelge 4.12, Şekil 4.7, Şekil 4.8)

OBCC 3 ve OBCC 5109 kodlu izolatların 3T3 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisi araştırıldığında 250 µg/ml konsantrasyon varlığında canlı hücre değerlerinin %76 ve %89,4 oranlarında olduğu gözlenmektedir. OBCC 5109 kodlu izolatın 3T3 hücre hattı üzerindeki apoptotik ve nekrotik % değerleri OBCC3 izolatına göre daha düşüktür. Bu nedenle OBCC 5109 kodlu izolatın sağlıklı hücre hattı olan 3T3 de sitotoksik etkisinin daha az olduğu ortaya konmuştur.

OBCC 3 izolatının MCF-7 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkileri incelendiğinde ise kontrol grubuna göre nekrotik ve apoptotik hücre değerlerinin arttığı belirlenmiştir. Ancak 3T3 hücre hattına göre apoptotik etkisinin az olduğu gözlemlenmiştir.

OBCC 5109 kodlu izolatın ise MCF-7 hücre hattına karşı 250 µg/ml ekstrakt varlığında canlı hücre değerinin %77, nekrotik hücre değerinin %10,5, apoptotik hücre değerinin ise %12,2 olduğu gözlemlenmektedir. OBCC 5109 kodlu izolatın 500 µg ekstrakt varlığında ise nekrotik ve apoptotik hücre değerlerlerinde düşme, canlı hücre değerinde ise artış gözlemlenmektedir.

Elde edilen veriler doğrultusunda OBCC 5109 kodlu izolatın Mcf-7 hücre hattına karşı 250 µg/ml konsantrasyonunda anlamlı bir apoptotik ve nekrotik etkiye sahip olduğu, OBCC 3 kodlu izolatın ise MCF-7 hücre hattı üzerine nekrotik ve apoptotik etkisinin kontrol grubuna göre arttığı ancak 3T3 hücre hattına göre etkisinin düşük olduğu belirlenmiştir.

Baran vd. (2017) *Russula delica* Fr.'nın 5 ve 0,315 mg/ml konsantrasyonlarını kullanarak MCF-7 ve L929 fibroblast hücre hatlarında sitotoksisitesini, nekrotik ve apoptotik etkisini araştırmışlardır. Beklenilen etkinin bulunamadığı belirttikleri çalışmalarında MCF-7 hücre hattına karşı 5 mg/ml konsantrasyonda %27,55 canlılık oranı bulduklarını belirtmişlerdir. Bir diğer çalışmada Liu vd. (2009) *Suillus placidus'*den etil asetat ile ekstrakte ederek elde ettikleri sitotoksik bir bileşik olan suillini izole etmişlerdir ve HepG2 hücre hattına karşı apoptotik etkisini araştırmışlardır. Suillinin 2, 4, ve 6 M'lık konsantrasyonlarının apoptotik hücre yüzdelerini sırası %7,95, %11,62 ve %24,04 olarak saptamışlardır.

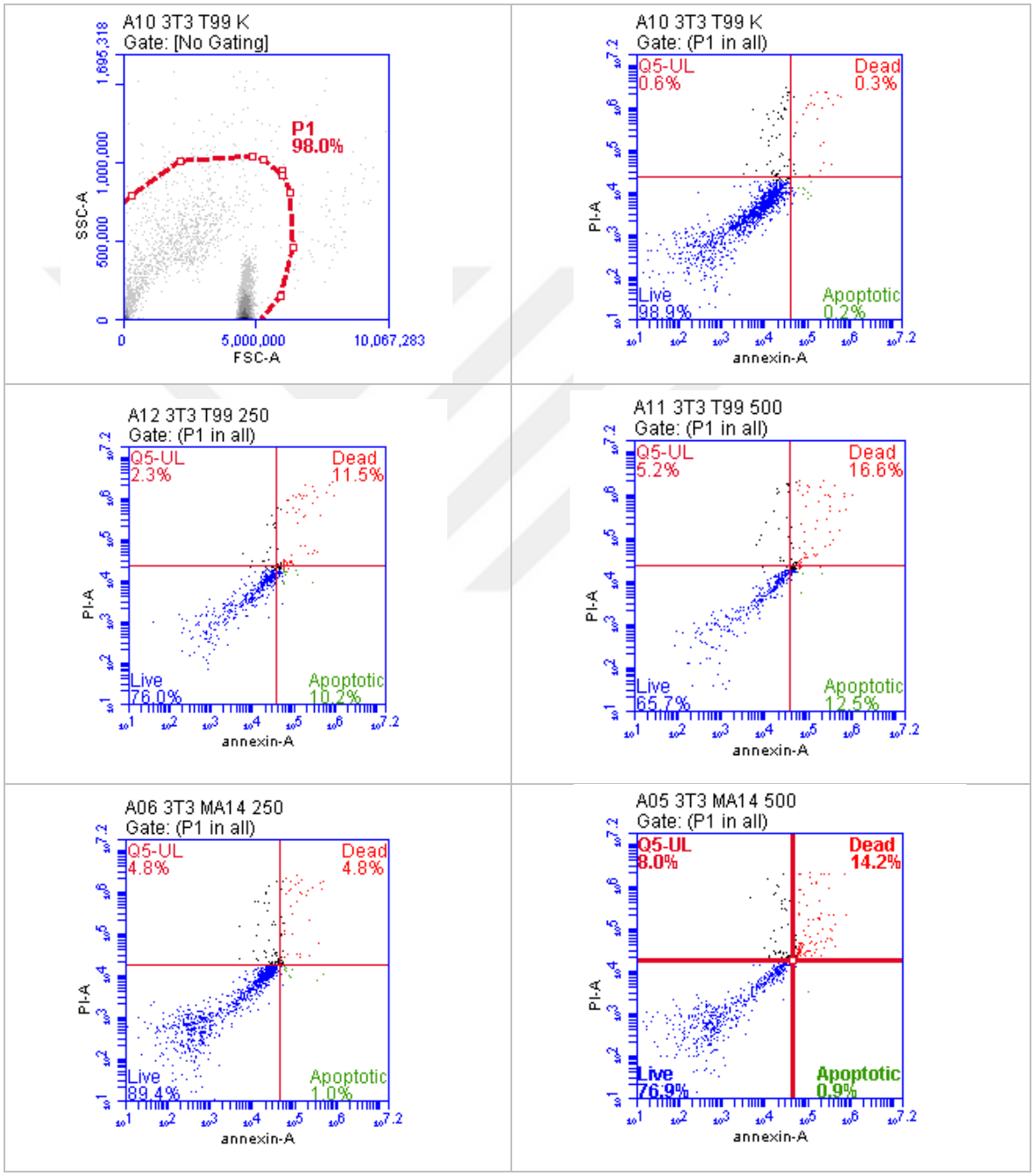
Çizelge 4.12 OBCC 3 ve OBCC 5109 kodlu izolatların 3T3 ve MCF-7 hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri

Deney Grupları				Nekrotik Hücre (%)	Canlı Hücre (%)	Apoptik Hücre (%)
3T3	Kontrol			0,3	98,9	0,2
	Hücrelere uygulanan Konsantrasyonlar (µg/ml)	OBCC 3	250	11,5	76	10,2
			500	16,6	65,7	12,5
		OBCC 5109	250	4,8	89,4	1
			500	14,2	76,9	0,9
MCF-7	Kontrol			0,3	98,9	0,1
	Hücrelere uygulanan Konsantrasyonlar (µg/ml)	OBCC 3	250	7	84,3	8,7
			500	7,4	83,2	9,3
		OBCC 5109	250	10,5	77	12,2
			500	8,8	81	10

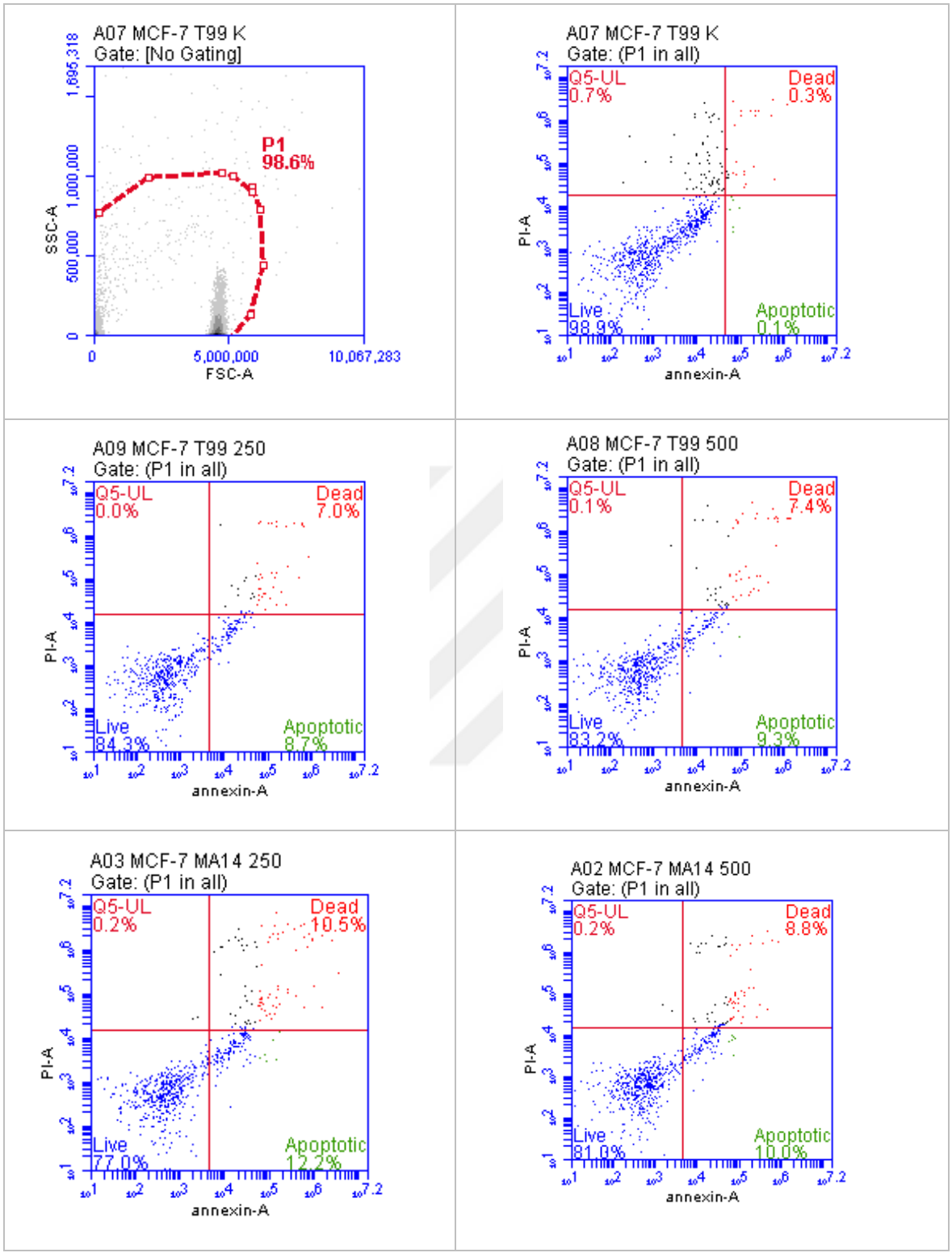
Literatür araştırmalarında mantar ekstraktları ile yapılan apoptotik etki çalışmalarında makrofungusların düşük konsantrasyonlarında yüksek aktivite varlığı gözlemlenmemiştir. Ancak spesifik bir metabolit ekstraksiyonu sonrası düşük konsantrasyonlar ile yapılan çalışmalarda etkinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu bağlamda izolatlarımızdan elde ettiğimiz ekstraktların birçok metaboliti barındırdığı düşünülürse, çalışılan konsantrasyonların apoptotik hücre değerlerinin düşük yüzdelerde görülmesinin sebebi olduğu düşünülebilmektedir. Aynı şekilde diğer aktivite yöntemlerinde de karşılaşılan durum olan ekstraksiyon çözücünün kimyasal yapısı kaynaklı olarak aktivite değişikliği görülmesine neden olabilmektedir.

Antioksidan ve antikanser aktivitenin birbirleri ile korelasyonlu olması muhtemeldir. Ancak bu durumun çalışmamızda yer alan izolatlardan bazılarında değiştiği gözlemlenmektedir. Sitotoksik etkilerinin araştırılmasında, farklı hücre hatları ile yapılacak çalışılmaların sonuçlarına göre kesin kanıya varılacağı düşünülmektedir. OBCC 5109 kodlu izolatın 3T3 hücre hattı üzerindeki apoptotik ve nekrotik % değerleri OBCC 3 izolatına göre

daha düşük, MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkisinin daha yüksek olması, OBCC 5109 nolu izolatın diğer izolatlara göre daha ayrıntılı araştırma potansiyeli taşıyan, aynı zamanda ileri ve moleküler çalışmalara aday olabilecek biyoaktif metabolitlere sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.7 OBCC 3 (T99) ve OBCC 5109 (MA14) kodlu izolatların 3T3 hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri



Şekil 4.8 OBCC 3 (T99) ve OBCC 5109 (MA14) kodlu izolatların MCF-7 hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri

4.4. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

4.4.1. Disk difüzyon yöntemi

Makrofunguslar pek çok sekonder metabolite sahiptirler ve bu biyoaktif metabolitlerin birçoğu bakteri, mantar ve virüslerle mücadele ettiği çok çeşitli doğal antibiyotikleri oluşturmaktadır (Akyüz vd., 2010).

Çalışmada OBCC 3, OBCC 5109, OBCC 6061 ve OBCC 6069 kodlu makrofungus izolatlarının antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılmasında ilk olarak disk difüzyon yöntemi uygulanmıştır. Ekstraktların emdirildiği diskler ekim yapılan petri kaplarına aktarılarak organizmaların üremeleri için inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonları sonrasında disklerin gram (-) bakteri olan *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) *ve Escherichia coli* (ATCC 25922) suşlarına karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları zon varlığı ile belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan maya ve küflere karşı antifungal aktivitelerinin olmadığı belirlenmiştir. Yöntemde kullanılan test mikroorganizmaları ve pozitif kontrol sonuçları Çizelge 4.13’ de sunulmuştur.

Çizelge 4.13 Disk difüzyon yönteminde kullanılan test organizmaları ve elde edilen zon çapları (mm)

Test Mikroorgaizmaları	**OBCC 5109**		**OBCC 6069**		**OBCC 3**		**OBCC 6061**		**Flukonazol**	**Ketokonazol**	**Kloramfenikol**	**Eritromisin**	**Vankomisin**
	50 µl	**100 µl**	**50 µl**	**100 µl**	**50 µl**	**100 µl**	**50 µl**	**100 µl**					
ATCC 27853 *P. aeruginosa*	6,327	7,067	6,773	6,960	6,880	7,085	6,750	7,148	-	-	22,968	23,957	-
ATCC 25922 *E. coli*	6,987	7,447	7,068	7,368	7,050	7,463	7,260	7,220	-	-	8,987	14,205	10,933
NRLL B-4420 *S. typhimurium*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25,628	13,207	11,140
NRLL B- 767 *S. aureus*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19,082	20,412	18,668
NRRL 1018 *M. luteus*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	38,975	39,947	28,610
NRRL B-744 *B. subtilis*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26,482	28,585	21,145
ATCC 13803 *C. tropicalis*	-	-	-	-	-	-	-	-	15,590	24,808	-	-	-
ATCC 60193 *C. albicans*	-	-	-	-	-	-	-	-	15,545	25,545	-	-	-
NRRL 1957 *A. flavus*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,220	-	-	-
NRRL 807 *P. chrysogenum*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10,100	-	-	-

Makrofungusların antimikrobiyal etkisi pek çok araştırmacının dikkatini çekmiştir. Literatürde karşılaşılan çalışmaların bazıları şunlardır.

Çelik vd. (2014) etanol ve metanol ile ekstrakte ettikleri *Ganoderma lucidum* izolatının 3 bakteri suşu ve 2 maya kullanarak disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesine araştırmışlardır. Uyguladıkları disk difüzyon metodundan elde edilen veriler doğrultusunda *G. lucidum* etanol ekstraktının *E.coli* ve *C. albicans*'a karşı aktivitesinin varlığı gözlemlenirken, metanol ekstraktının ise aktivite göstermediğini belirlemişlerdir. Aynı şekilde *C. glabrata'*ya karşı metanol ekstraktı aktivite zonu varlığı gözlemlenmiştir, ancak etanol ekstraktında aktivite zonuna rastlanmadığı belirtilmiştir (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14 *G. lucidum* ekstraktının disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesi (Çelik vd., 2014)

Test Patojenleri	**İnhibisyon Zonu (mm)**			
	Etanol	**Metanol**	**Eitromisin**	**Nistatin**
B. subtilis RSKK 244	13±1	10±0	20±0	-
E. coli ATCC 25222	16±0	-	9±0	-
S. enteritidis ATCC 13076	12±0	12±0	9±0	-
C. glabrata RSKK 044019	-	25±1	-	33±0
C. albicans ATCC 90028	10±1	-	-	22±0

On adet makrofungus izolatı ile antimikrobiyal aktivitenin araştırıldığı başka bir çalışmada Akyüz vd. (2010) yaptıkları disk difüzyon yönteminde 4 bakteri (*Bacillus megaterium* DSM 32, *Staphylococcus aureus* COWAN 1, *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Klebsiella pneumoniae* FMC 5), 2 maya (*Candida albicans* FMC 17 ve *Candida glabrata* ATCC 66032) ve 2 adet dermofit (*Trichophyton spp.* ve *Epidermophyton spp*.) kullanmışlardır. Yapılan çalışmada aynı tür olmalarına karşın test mikroorganizmalarına karşı olan aktivitelerinin farklılıklar belirlenmiştir (Şekil 4.8). Aynı tür olup yabani ve kültür

formlarının suş farklılığı dolayısı ile aktivitelerinin farklılık gösterebildiğini rapor etmişlerdir (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15 Farklı makrofungusların disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesi (Akyüz vd., 2010).

Test Suşları / Mantarlar	**İnhibisyon (mm)**							
	B. magaterium	*E. coli*	*K. pneumoniae*	*S. aureus*	*C. albicans*	*C. glabrata*	*Epidermophyto spp.*	*Trichophyton spp.*
T. boudieri	-	-	7,5±0,7	-	-	-	-	-
A. bisporus	-	7,5±0,7	-	8,5±0,7	-	9,5±2,1	-	10±1,4
P. ostreatus	-	9,5±0,7	-	-	-	8,0±0,0	-	8,5±0,7
P. ostreatus	-	-	8,5±0,7	-	-	15,5±2,1	8,0±0,0	8,0±0,0
P. ostreatus	-	-	-	-	-	-	8,5±0,7	9,0±1,4
P. ostreatus	8,5±0,7	9,5±0,7	-	9,0±1,4	-	8,0±0,0	-	8,5±0,7
P. ostreatus	7,5±0,7	7,5±0,7	8,0±0,0	10,5±0,7	-	-	-	11,5±2,1
P.sajor-caju	-	-	-	7,5±0,7	-	8,5±0,7	-	-
P.eryngii var. eryngii	9,0±1,4	8,5±0,7	-	12,0±1,4	7,5±0,7	11,5±2,1	10,0±1,4	9,5±2,1
P. eryngii var. ferulae	8,5±0,7	8,0±0,0	-	7,5±0,7	8,5±0,7	8,5±0,7	8,0±0,0	-
Kontrol grubu	17,0	13,0	16,0	17,0	18,0	14,0	-	-

Çalışmada elde edilen sonuçlar ve literatürden edinilen bilgiler doğrultusunda test mikroorganizmalarına karşı araştırılan antimikrobiyal etki suş ve ekstraksiyon çözücüsü kaynaklı farklılık gösterebilmektedir. Kültür sıvısı ekstraktlarının *E. coli* ve *P. aeruginosa* dışında bir organizmaya karşı aktivite göstermemesinin ekstrakta bulunan metabolitlerin antimikrobiyal etkiye sahip olmasından ya da suşların farklılığından kaynaklanabildiğini söylemek mümkündür.

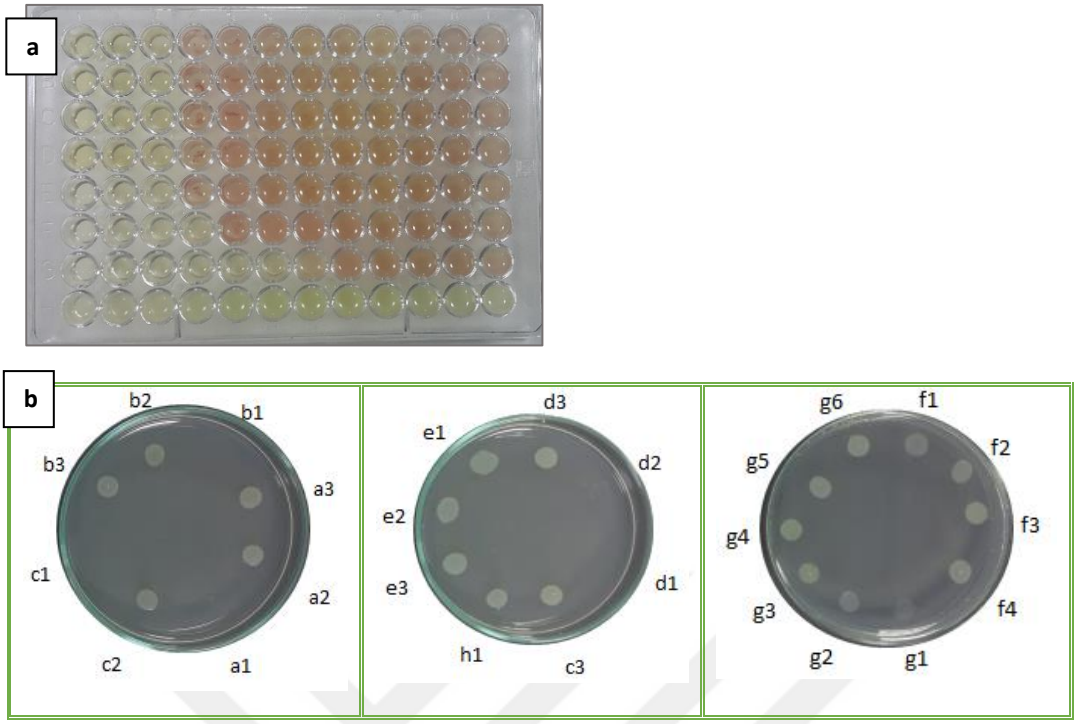
4.4.2. Minimal inhibitör konsantrasyon yöntemi (MİK)

Disk difüzyon yönteminde ekstraktlara duyarlı olan *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ve *Escherichia coli* (ATCC 25922) suşlarına MİK yöntemi uygulanmıştır. Kültür sıvılarının etil asetat ekstraktlarının *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* suşlarının MİK değerleri Çizelge 4.20'de sunulmuştur.

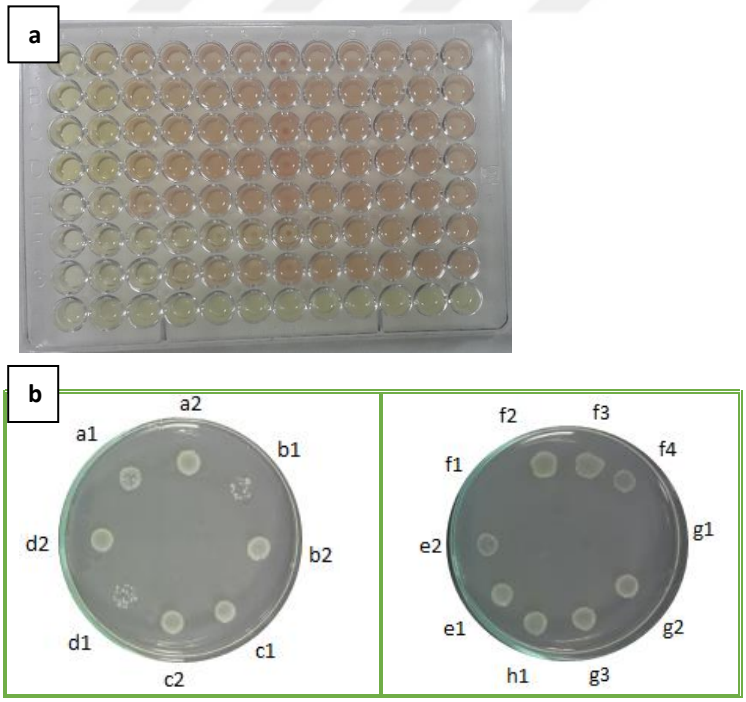
Tetrozolyum tuzu çözeltisieklenmesi ardından renk değişimi gözlemlenmeyen kuyucuklardan ekim yapılarak minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) varlığı ve elde edinilen değerler belirlenmiştir. Mikroorganizmaların bakterisidal konsantrasyon değerleri Şekil 4.5 ve 4.6' da sunulmuştur.

Çizelge 4.16 Makrofungus izolatlarının MİK ve MBK değerleri

Etki Tipi / Deney Grubu	ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*		ATCC 25922 *Escherichia coli*	
	MİK (µg/ml)	MBK (µg/ml)	MİK (µg/ml)	MBK (µg/ml)
OBCC 3	1000	4000	2000	-
OBCC 5109	1000	4000	2000	-
OBCC 6061	1000	2000	2000	-
OBCC 6069	1000	4000	2000	-
Metanol (%40'lık)	%10	-	%20	-
Eritromisin	250	2000	250	2000
Kloramfenikol	62,5	-	500	2000



Şekil 4.9 *P. aeruginosa* a: MİK plaka görüntüsü b: MBK petri görüntüsü



Şekil 4.10 *E.coli* a: MİK plaka görüntüsü b: MBK petri görüntüsü

Genel olarak makrofungusların antimikrobiyal aktiviteleri hakkında yapılan çalışmalar ile ilgili araştırmacılar farklı sonuçlara varmışlardır (Migahed vd., 2018). Makrofungusların farklı bölgelerinin çeşitli çözücü ekstraktlarının aynı makrofungus olsa dahi sonuçların farklı dğerlerde olduğunu bildirmektedir. Antimikrobiyal aktivite varlığının makrofungus türlerinin genetik yapısı, biyokimyasal, fiziksel bileşenlerinden, çözücülerin kimyasal farklılıklarından, ekstraktlardan ve hatta mikroorganizmalardan kaynaklanabileceğini bildirmektedirler (Migahed vd., 2018; Iwalokun vd., 2007; Wang vd., 2004).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada 54 adet *Ganoderma* izolatı kültür sıvıları kullanılarak DPPH radikal süpürücü aktivite yöntemi ile taranmıştır. Yüksek inhibisyon değeri veren OBCC 3, OBCC 5109, OBCC 6061 ve OBCC 6069 kodlu izolatlar sonraki çalışmalar için seçilmiştir. Seçilen izolatların sonraki aktivite çalışmalarında kültür sıvısının etil asetat ile ekstraksiyonundan elde edilen ekstraktları kullanılmıştır. İzolat ekstraktlarının antioksidan, antimikrobiyal aktiviteleri ve sitotoksik etkileri *in vitro* olarak değerlendirilmiştir.

İzolatların ekstraktları ile ilk olarak antioksidan aktivite çalışmaları yapılmıştır. Çalışmalarda DPPH süpürücü aktivite, redükleyici güç ve metal şelatlayıcı aktivite yöntemlerinde OBCC 6069 kodlu izolatın yüksek aktiviteye sahip olan izolat olduğu belirlenmiştir (sırası ile EC_{50} 1,934 mg/ml, 0,416 mg/ml, 2,730 mg/ml). Yapılan beta-karoten linoleik asit yönteminde ise rengin korunması OBCC 3 > OBCC 6061 > OBCC 6069 > OBCC 5109 sıralarında olduğu belirlenmiştir.

Makrofungusların biyoaktif metabolitlerinin aktivitelerden sorumlu oldukları bilinmektedir. En önemlilerinden birinin fenolik maddeler olduğu birçok çalışmada vurgulanmaktadır. Aktiviteleri göz önüne alınarak çalışmamızda izolat ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları araştırılmıştır. En yüksek fenolik madde miktarına OBCC 6069 kodlu izolatın (76,08 mg GAE/g ekstrakt) sahip olduğu belirlenmiştir. Total fenolik madde miktarları açısından OBCC 6069 kodlu izolatı OBCC 3, OBCC 6061 ve OBCC 5109 kodlu izolat takip etmektedir.

Antimikrobiyal etkinin araştırılmasında ilk olarak disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. İzolatların *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ve *Escherichia coli* (ATCC 25922) suşlarına karşı antimikrobiyal etkisinin olduğu belirlenmiştir. Ardından MİK testi uygulanarak etkin konsatrasyon değerinin *E. coli* suşuna karşı 2000 µg/ml iken *P. aeruginosa* suşuna karşı ise 1000 µg/ml konsantrasyonlarda olduğu belirlenmiştir. MİK testi ile beraber MBK değerleri belirlenen izolatların yanlızca *P. aeruginosa* suşuna karşı etkisi gözlemlenmiştir.

İzolat ekstraktları ile yapılan bir başka çalışmada MTT yöntemi ile sitotoksik etkinin araştırılmasıdır. Elde edilen verilerde OBCC 3 ve OBCC 5109 kodlu izolatların değerleri incelendiğide anlamlı bir sitotoksisite varlığı gözlemlenmiştir. Bir sonraki aşamada kullanılmak üzere belirlenmiş olan izolatların apoptoik ve nekrotik hücre canlılıkları üzerine olan etkileri araştırılmıştır. OBCC 5109 kodlu izolatın 250 µg/ml konsantrasyonunda MCF-7 hücre hattına karşı apoptotik ve nekrotik etkilerinin bulunduğu belirlenmiştir.

Yapılan çalışma sonuçlarına göre aynı tür makrofungusların kullanılmış olmasına karşın suş farklılığının aktiviteler üzerine olan etkileri görülmektedir. Yapılan antioksidan ve antimikrobiyal aktivite çalışmalarında literatürde de karşılaşıldığı gibi ekstraksiyon sıvısı farkı nedeni ile elde edilen metabolitlerin aktivitesinin değiştiği düşünülmektedir. Antioksidan aktivitenin tam olarak varlığının farklı yöntemler kullanılarak tanımlanmasının önemli olduğunun çalışmada elde edilen sonuçlar ile bu durum açık olarak farkedilmiştir.

Makrofungusların tür içi farklılıkları dolayısıyla ürettikleri biyoaktif metabolitlerin çeşitlilik göstermesi araştırma yelpazesinin genişlemesini sağlayacaktır. Aynı zamanda makrofungusların direkt olarak fruktifikasyon yapılarından elde edilen biyoaktif metabolitleri yanı sıra kültür sıvılarının da önemli hatta keşfedilmemiş biyoaktif metabolitlere sahip oldukları gün geçtikçe yapılan araştırmalar ile ortaya çıkarılacağını göstermektedir. Kültür sıvısının ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktın antioksidan ve antikanser aktivite potansiyelinin belirlendiği bu çalışma gösteriyor ki farklı kanserli hücre hatlarının da çalışmalara dahil edilerek araştırılmasının olumlu sonuçlar doğurabileceğini göz önüne sermektedir. Aynı zamanda çalışmada kullanılan ham etil esetat eksraktı olması daha yüksek aktivite göstermesini etkilemiş olabileceği de göz önüne alınmalıdır. Bir sonraki adımda elde edilen ekstraktın saflaştırılması ve metabolitlerin tanımlanması ile aktivite varlığının araştırılması önerilmektedir. Farklı makrofungus türleri ile yapılacak çalışmalarda kültür sıvılarının sahip olduğu yüksek potansiyelin dikkate alınarak çalışmaların tasarlanması gerektiği, elde edilecek sonuçların ise umut vaad edici olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Agrawal, D.C., Dhanasekaran, M., 2019, Medicinal Mushrooms: Recent Progress in Research and Development, e-kitap, 4-9. https://www.springer.com/gp/book/9789811363818 erişim tarihi: 10.01.2020

Akyüz, M., Onganer, A., Erecevit, P., Kirbağ, S., 2010, Antimicrobial activity of some edible mushrooms in the eastern and southeast Anatolia region of Turkey. Gazi University Journal of Science, 23(2): 125-130.

Arora, D. S., Chandra, P., 2011, Antioxidant activity of *Aspergillus fumigatus*. ISRN Pharmacology, 2011: 11

Aydemir, B., Sarı, E. K., 2009, Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi. Kocatepe Veteriner Dergisi, 2(2): 56-60.

Bahadori, M. B., Sarıkürkçü, C., Yalçın, O. U., Cengiz, M., Güngör, H., 2019, Metal concentration, phenolics profiling, and antioxidant activity of two wild edible *Melanoleuca* mushrooms (*M. cognata* and *M. stridula*). Microchemical Journal, 150: 104172.

Balouiri, M., Sadiki, M., Ibnsouda, S. K., 2016, Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis, 6(2): 71-79.

Baran, H., Güler, P., Türk, M., 2017, *Russula delıca* Fr.'nin Sitotoksite, Apoptik ve Nekrotik Etkileri. Life Sciences, 12(4): 48-55.

Baskar, R., Lavanya, R., Mayilvizhi, S., Rajasekaran, P., 2008, Free radical scavenging activity of antitumour polysaccharide fractions isolated from *Ganoderma lucidum* (Fr.) P. karst. Nature Product Radiance, 7(4): 320-325.

Benkli, K., Tunalı, Y., Cantürk, Z., Artagan, Ö., Alanyalı, F., 2009, Cytotoxic and genotoxic effects of $[Ru(phi)_3]^{2+}$ evaluated by Ames/*Salmonella* and MTT methods. European Journal of Medicinal Chemistry, 44(6): 2601-2605.

Çelik, G. Y., Onbaşlı, D., Altınsoy, B., Allı, H., 2014, In vitro antimicrobial and antioxidant properties of *Ganoderma lucidum* extracts grown in Turkey. European Journal of Medicinal Plants, 4(6): 709-722.

Chang, L. W., Yen, W. J., Huang, S. C., Duh, P. D., 2002, Antioxidant activity of sesame coat. Food Chemistry, 78(3): 347-354.

Charumathy, M., Sudha, G., Balakrishnan, P., 2016, Detection of antioxidant activity and bioactive constituents in the fruiting bodies of *Hericium erinaceus* pers-an edible mushroom. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 8(3): 152-156.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Chu, K. K., Ho, S. S., Chow, A. H., 2002, *Coriolus versicolor*: a medicinal mushroom with promising immunotherapeutic values. The Journal of Clinical Pharmacology, 42(9): 976-984.

Devi, L. S., Dasgupta, A., Chakraborty, M., Borthakur, S. K., Singh, N. I., 2014, Chemical composition and antioxidant activity of *Schizophyllum commune.* International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research 27(7): 173-178.

Dulay, R. M. R., Miranda, L. A., Malasaga, J. S., Kalaw, S. P., Reyes, R. G., Hou, C. T., 2017, Antioxidant and antibacterial activities of acetonitrile and hexane extracts of *Lentinus tigrinus* and *Pleurotus djamour*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 9: 141-144.

Dündar, A., Okumuş, V., Özdemir, S., Çelik, K. S., Boğa, M., Özçağlı, E., 2016, muskuof some wild mushroom species. Cogent Food & Agriculture, 2(1): 1178060.

Dündar, A., Yeşil, O. F., Acay, H., Okumuş, V., Ozdemir, S., Yıldız, A. 2012, Antioxidant properties, chemical composition and nutritional value of *Terfezia boudieri* (Chatin) from Turkey. Food Science and Technology International, 18(4): 317-328.

Ferreira, I. C., Baptista, P., Vilas-Boas, M., Barros, L., 2007, Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. Food Chemistry, 100(4): 1511-1516.

Freedman, M. L., Penney, K. L., Stram, D. O., Le Marchand, L., Hirschhorn, J. N., Kolonel, L. N., Haiman, C. A., 2004, Common variation in BRCA2 and breast cancer risk: a haplotype-based analysis in the Multiethnic Cohort. Human Molecular Genetics, 13(20): 2431-2441.

Garrab, M., Edziri, H., El Mokni, R., Mastouri, M., Mabrouk, H., Douki, W., 2019, Phenolic composition, antioxidant and anticholinesterase properties of the three mushrooms *Agaricus silvaticus* Schaeff., *Hydnum rufescens* Pers. and *Meripilus giganteus* (Pers.) Karst.in Tunisia. South African Journal of Botany, 124: 359-363.

Granato, D., Shahidi, F., Wrolstad, R., Kilmartin, P., Melton, L. D., Hidalgo, F. J., Elmore, S., 2018, Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods?. Food chemistry, 264: 471-475.

Grzesik, M., Naparło, K., Bartosz, G., Sadowska-Bartosz, I., 2018, Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. Food Chemistry, 241: 480-492.

Hu, H., Ahn, N. S., Yang, X., Lee, Y. S., Kang, K. S., 2002, *Ganoderma lucidum* extract induces cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell. International Journal of Cancer, 102(3), 250-253.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Ighodaro, O. M., Akinloye, O. A., 2018, First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. Alexandria Journal of Medicine, 54(4): 287-293.

Ivone, H. A., Jorge, M. T., Guadalupe, G. R. M., Berenice, Y. J., 2016. Total polyphenols and antioxidant activity of *Ganoderma curtisii* extracts. J of Med Plants Studies, 4(4): 136-141.

Iwalokun, B. A., Usen, U. A., Otunba, A. A., Olukoya, D. K., 2007, Comparative phytochemical evaluation, antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus*. African Journal of Biotechnology, 6(15): 1732-1739.

Karabulut, H., Gülay, M. Ş., 2016, Serbest radikaller. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 4(1): 50-59.

Kedare, S. B., Singh, R. P., 2011, Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. Journal of Food Science and Technology, 48(4): 412-422.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R., 1972, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. British Journal of Cancer, 26(4): 239-257.

Koleva, I. I., Van Beek, T. A., Linssen, J. P., Groot, A. D., Evstatieva, L. N., 2002, Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques, 13(1): 8-17.

Kamble, R., Venkata, S., Gupte, A. M., 2011, Antimicrobial activity of *Ganoderma lucidum* mycelia. Journal of Pure and Applied Microbiology, 5(2): 983-986.

Kosanić, M., Ranković, B., Dašić, M., 2012, Mushrooms as possible antioxidant and antimicrobial agents. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 11(4): 1095.

Kosanić, M., Ranković, B., Rančić, A., Stanojković, T., 2017, Evaluation of metal contents and bioactivity of two edible mushrooms *Agaricus campestris* and *Boletus edulis*. Emirates Journal of Food and Agriculture, 29(2): 98-103.

Kozarski, M., Klaus, A., Nikšić, M., Vrvić, M. M., Todorović, N., Jakovljević, D., Van Griensven, L. J., 2012, Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum, Ganoderma lucidum, Lentinus edodes and Trametes versicolor*. Journal of food composition and analysis, 26(1-2): 144-153.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Lee, Y. L., Yen, M. T., Mau, J. L., 2007, Antioxidant properties of various extracts from *Hypsizigus marmoreus*. Food Chemistry, 104(1): 1-9.

Li, W. J., Nie, S. P., Liu, X. Z., Zhang, H., Yang, Y., Yu, Q., Xie, M. Y., 2012, Antimicrobial properties, antioxidant activity and cytotoxicity of ethanol-soluble acidic components from *Ganoderma atrum*. Food and Chemical Toxicology, 50(3-4): 689-694.

Liu, F. Y., Luo, K. W., Yu, Z. M., Co, N. N., Wu, S. H., Wu, P., Kwok, T. T., 2009, Suillin from the mushroom *Suillus placidus* as potent apoptosis inducer in human hepatoma HepG2 cells. Chemico-Biological İnteractions, 181(2): 168-174.

Menikpurage, I., Soysa, S. S. S. B. D. P., Abeytunga, D. T. U., 2012, Antioxidant activity and cytotoxicity of the edible mushroom, *Pleurotus cystidiosus* against Hep-2 carcinoma cells. Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka, 40(2): 107-114.

Migahed, F. F., El-Fallal, A. A., Elshobaky, S. S., 2018, Evaluation of Antimicrobial Activities of Mycelia and Crude Extracts of some Egyptian Wild Mushrooms, *Agaricu*s and *Ganoderma* Species. Journal of Plant Production, 9(4): 387-395.

Modi, H. A., Shah, P., Shukla, M. D., Lahiri, S. K., 2014, Determination of total phenolic content and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* collected from Dang district of Gujarat, India. Natural products: An Indian Journal, 10(3): 75-83.

Okcu, Z., Keleş, F., 2009, Kalp-damar hastalıkları ve antioksidanlar. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 40(1): 153-160.

Oke, F., Aslim, B., 2011, Protective effect of two edible mushrooms against oxidative cell damage and their phenolic composition. Food Chemistry, 128(3): 613-619.

Olszowy, M., Dawidowicz, A. L., 2016, Essential oils as antioxidants: their evaluation by DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC, and β-carotene bleaching methods. Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly, 147(12): 2083-2091.

Orhan, I., Üstün, O. 2011, Determination of total phenol content, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition in selected mushrooms from Turkey. Journal of Food Composition and Analysis, 24(3): 386-390.

Özparlak, H., Zengin, G., Kaşık, G., 2016, Türkiye'den yabani ve kültüre alınmış *Ganoderma lucidum*'un sulu ekstraktlarının antioksidan özelliklerinin karşılaştırılması. Mantar Dergisi, 7(2), 102-109.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Palacios, I., Lozano, M., Moro, C., D'arrigo, M., Rostagno, M. A., Martínez, J. A., Villares, A., 2011, Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. Food Chemistry, 128(3): 674-678.

Paliya, B. S., Chaudhary, H. S., Verma, S., Prasad, S., 2014, Optimization of fermentation media composition of ganoderma lucidum for improved production of antioxidant and antimicrobial compounds. Pharmacognosy Communications, 4(1).

Ponder, B. A., 2001, Cancer genetics. Nature, 411(6835): 336.

Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K., 2005, Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(10): 4290-4302.

Reller, L. B., Weinstein, M., Jorgensen, J. H., Ferraro, M. J., 2009, Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. Clinical İnfectious Diseases, 49(11): 1749-1755.

Salamah, N., Ahda, M., Bimantara, S., Hanar, R., 2018, Total phenolic content and in vitro evaluation of antioxidant activity of ethanol extract of *Ganoderma amboinense*. National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology, 8(1): 97-101.

Sarıkürkçü, C., Zengin, G., Aktümsek, A., Ceylan, O., Şanda, M. A., 2015, *Onopordum anatolıcum* Tohumlarının Antioksidan Aktiviteleri. Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi, (41): 89-96.

Sen, S., Chakraborty, R., 2011, The role of antioxidants in human health. In Oxidative stress: diagnostics, prevention, and therapy. American Chemical Society. p. 1-37

Sevim, D., 2011, Antioksidanlar ve zeytinyağı. Zeytin Bilimi, 2(1): 43-47.

Shon, M. Y., Kim, T. H., Sung, N. J., 2003, Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of *Hymenochaetaceae*) extracts. Food Chemistry, 82(4): 593-597.

Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M., 1999, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In Methods in Enzymology, 299:152-178.

Sudha, G., Janardhanan, A., Moorthy, A., Chinnasamy, M., Gunasekaran, S., Thimmaraju, A., Gopalan, J., 2016, Comparative study on the antioxidant activity of methanolic and aqueous extracts from the fruiting bodies of an edible mushroom *Pleurotus djamor*. Food Science and Biotechnology, 25(2): 371-377.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Syal, K., Mo, M., Yu, H., Iriya, R., Jing, W., Guodong, S., Tao, N., 2017, Current and emerging techniques for antibiotic susceptibility tests. Theranostics, 7(7): 1795.

Taofiq, O., Heleno, S. A., Calhelha, R. C., Alves, M. J., Barros, L., González-Paramás, A. M., Ferreira, I. C., 2017, The potential of *Ganoderma lucidum* extracts as bioactive ingredients in topical formulations, beyond its nutritional benefits. Food and Chemical Toxicology, 108, 139-147.

Tendencia, E. A., dela Peña, M. R., Fermin, A. C., Lio-Po, G., Choresca Jr, C. H., Inui, Y., 2004, Antibacterial activity of tilapia *Tilapia hornorum* against *Vibrio harveyi*. Aquaculture, 232(1-4): 145-152.

Wang, H., Ng, T. B., 2004, Eryngin, a novel antifungal peptide from fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii.* Peptides, 25(1): 1-5.

Wasser, S. P., 2002, Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Applied Microbiology and Biotechnology, 60(3): 258-274.

Xu, R., Wang, Q., 2015, Large-scale automatic extraction of side effects associated with targeted anticancer drugs from full-text oncological articles. Journal of Biomedical İnformatics, 55: 64-72.

Yalçın, O.U., Sarıkürkçü, C., Cengiz, M., Güngör, H., Ćavar Zeljković, S., 2020, *Ganoderma carnosum* and *Ganoderma pfeifferi*: Metal concentration, phenolic content, and biological activity. Mycologia, 112(1): 1-8.