Seçilen Bir *Epicoccum nigrum* İzolatına ait Kültür Sıvısının Antioksidan Özelliğinin Farklı Yöntemlerle Değerlendirilmesi

Melike Çetin

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Mayıs 2018

Evaluation of Antioxidant Properties of a Selected *Epicoccum nigrum* Isolate Culture Liquid by Different Methods

Melike Çetin

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

May 2018

Seçilen Bir *Epicoccum nigrum* İzolatına Ait Kültür Sıvısının Antioksidan Özelliğinin Farklı Yöntemlerle Değerlendirilmesi

Melike Çetin

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

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Yamaç

"Bu tez TÜBİTAK tarafından "113Z746" no'lu proje çerçevesinde desteklenmiştir."

Mayıs 2018

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Melike Çetin'in YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Seçilen Bir *Epicoccum nigrum* İzolatına Ait Kültür Sıvısının Antioksidan Özelliğinin Farklı Yöntemlerle Değerlendirilmesi " başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Mustafa Yamaç

İkinci Danışman : —

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Prof. Dr. Mustafa Yamaç

Üye : Prof. Dr. Aysun Topaktaş Ergene

Üye : Prof. Dr. Semra İlhan

Üye : Doç. Dr. Mustafa Uyanoğlu

Üye : Doç. Dr. Zerrin Cantürk

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

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Mustafa YAMAÇ danışmanlığında hazırlamış olduğum "Seçilen bir Epicoccum nigrum İzolatına Ait Kültür Sıvısının Antioksidan Özelliğinin Farklı Yöntemlerle Değerlendirilmesi" başlıklı Seçiniz 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. 21/05/2018

Melike ÇETİN

İmza



ÖZET

Mantarların güçlü antioksidan aktiviteye sahip biyoaktif bileşenlere sahip oldukları bilinmektedir. Bu çalışmanın ilk aşamasında 132 fungal izolatın kültür sıvıları ve hücre kitlelerinin DPPH radikal süpürücü antioksidan aktivite yöntemi ile antioksidan aktiviteleri ve toplam fenolik madde içerikleri değerlendirilmiştir. Yapılan tarama çalışması sonucunda kültür sıvılarının antioksidan aktivite değerlerinin hücre kitlelerine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Çalışmanın ikinci aşaması için OBCC 1047 kodlu izolatın antioksidan aktivitesi β- Karoten- Linoleik Asit Yöntemi, ABTS Radikal Katyon Giderici Aktivite, Redükleyici Güç, Metal Şelatlayıcı Aktivite, Ferrik Tiosiyanat Yöntemi, Tiyobarbiturik Asit Yöntemi gibi diğer antioksidan aktivite yöntemleri ile araştırılmıştır. Bu yöntemlerin sonuçları sırası ile % 83,37, % 98,44, 1,34 mg/ml EC50 değeri, % 83,5, % 90,78 ve % 60,41 olarak belirlenmiştir. Ayrıca antioksidan aktiviteye neden olan total fenolik madde ve total flavonoid bileşenlerin miktarları sırası ile 1,97 mg GAE/g ekstrakt ve 0,97 mg RE/g ekstrakt olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Makrofungus, antioksidan aktivite, *Epicocum nigrum*

SUMMARY

It is known that fungi have successful bioactive components in terms of antioxidant activity. Antioxidant activities and total phenolic content of 132 fungal isolates and cell masses were evaluated by DPPH radical scavenging antioxidant activity method at the initial stage of this study. As a result of the screening, it was determined that the antioxidant activity values of culture fluids were higher than those of cell mass. In the second step of the study,other antioxidant activity methods such as β-Carotene-Linoleic Acid method, ABTS radical cation reducing activity, reducing power, metal chelating activity ferric thiocyanate method, thiobarbutiric acid method were investigated for a selected fungus isolate1047. The results of these methods were 83.37%, 98.44%, 1.34 mg / ml EC50 value, 83.5%, 90.78% and 60.41%, respectively. The amounth of total phenolic compounds and total flavonoids were determined as 1.97 mg GAE / g extract and 0.97 mg RE / g extract, respectively.

Keywords: Macrofungus, antioxidant activity, *Epicocum nigrum*

TEŞEKKÜR

Tez danışmanlığımı üstlenerek çalışmalarımın planlanmasında ve yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen ve bana her zaman destek olan sayın hocam Prof. Dr. Mustafa Yamaç'a sonsuz teşekkür ederim. Tez süresince değerli bilgileriyle destek olan Doç. Dr Zerrin Cantürk' çok teşekkür ederim.

Laboratuvarda gösterdikleri yardımlaşma ve dayanışmadan dolayı tüm Fungikültür laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim. Desteklerini ve yardımlarını asla esirgemeyen, laboratuvar ortamında değerli bilgileriyle yolumu aydınlatan arkadasım Dr. Ayşe Betül Karaduman ve tezime yaptığı değerli katkıları ile bu yolda benim ile birlikte yürüyen Göksu Ceylan'a çok teşekkür ederim.

Bu süreçte benden desteğini asla esirgemeyen ve bana her zaman güvenerek pes ettiğim zamanlarda bile elimi tutup ayağa kaldıran canım annem Sevgi Börühan ve kıymetli eşim İbrahim Çetin' e çok teşekkür ederim.

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından, 1001 – Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı kapsamında desteklenen 113Z746 no'lu "Makrofungus Hücre ve Sekonder Metabolitlerinin Antioksidan ve Antikanser Aktiviteleri" konulu araştırma projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET ..... **vi**

SUMMARY ..... **vii**

TEŞEKKÜR ..... **viii**

İÇİNDEKİLER DİZİNİ ..... **ix**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xii**

ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xiv**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xv**

1. GİRİŞ VE AMAÇ 1

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI 3

2.1. Antioksidanlar 3

2.2. Antioksidanların sınıflandırılması 4

2.2.1. Doğal antioksidanlar 5

2.2.1.1. Enzimatik antioksidanlar 5

2.2.1.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar 6

2.2.2. Senetik antioksidanlar 12

2.3. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri 13

2.3.1. Hidrojen atomu transfer (HAT) reaksiyonlarına dayanan yöntemler 14

2.3.2. Elektron transfer (ET) yöntemleri 16

2.4. Mantarların Antioksidan Özellikleri 24

3. MATERYAL VE YÖNTEM 26

3.1. Materyal 26

3.1.1. Makrofungus izolatları 26

3.1.2. Besiyerleri 28

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

3.1.3. Kimyasal maddeler, çözeltiler ve cihazlar 30

3.2. Yöntem 31

3.2.1. DPPH yöntemi ile yüksek antioksidan aktiviteye sahip makrofungus izolatı ve yaşam formunun seçilmesi 31

3.2.1.1. DPPH radikali süpürücü aktivite tayini yöntemi optimizasyonu 32

3.2.1.2. Makrofungus izolatlarının üretileceği kültür tipi ve besiyerinin seçilmesi 33

3.2.1.3. Makrofungus hücre kitlesinin ekstraksiyon yönteminin seçilmesi..... 34

3.2.2. DPPH yöntemi ile yüksek antioksidan aktiviteye sahip fungus izolatı ve yaşam formunun seçilmesi 35

3.2.3. Seçilen kültür sıvısı ekstraktının zamana bağlı antioksidan aktivitesi..... 36

3.2.4. Seçilen makrofungus izolatının antioksidan aktivite potansiyelinin sorgulanması 36

3.2.4.1. DPPH radikal süpürücü antioksidan aktivite yöntemi..... 36

3.2.4.2. Beta karoten – linoleik asit yöntemi ile toplam antioksidan aktivite tayini ..

..... 36

3.2.4.3. ABTS radikal katyon renksizleştirme yöntemi..... 37

3.2.4.4. Metal şelatlayıcı aktivite..... 38

3.2.4.5. Redükleyici güç 38

3.2.4.6. Ferrik tiyosiyanat yöntemi ile lipit peroksidasyonu (FTC) 39

3.2.4.7. Tiyobarbutirik asit yöntemi ile lipit peroksidasyonu..... 39

3.2.4.8. Total fenolik içerik tayini 40

3.2.4.9. Total flavanoid içerik tayini..... 40

3.2.4.10 Makrofungus izolatlarının moleküler yöntemlerle tanılanması……40

4. BULGULAR VE TARTIŞMA..... 42

4.1. Tarama Çalışmasında Kullanılacak Koşulların Optimizasyonu..... 42

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

4.1.1. DPPH radikali süpürücü aktivite tayini yöntemi optimizasyonu 42

4.1.2. Makrofungus izolatlarının üretileceği kültür tipi ve besiyerinin seçilmesi 45

4.1.3. Makrofungus hücre kitlesinin ekstaksiyon yönteminin seçilmesi 47

4.1.4. DPPH yöntemi ile yüksek antioksidan aktiviteye sahip fungus izolatı ve yaşam formunun seçilmesi 48

4.1.4.1. Yüksek antioksidan aktiviteye sahip hücre kitlesinin belirlenmesi 49

4.1.4.2. Yüksek antioksidan aktiviteye sahip kültür sıvısının belirlenmesi 54

4.2. Seçilen Kültür Sıvısı Ekstraktının Zamana Bağlı Antioksidan Aktivitesi 61

4.3.Seçilen Makrofungus İzolatının Antioksidan Aktivite Potansiyelinin Sorgulanması 62

4.3.1.Difenil-1-pikrihidrazil (DPPH) radikal süpürücü antioksidan aktivite yöntemi 62

4.3.2. Beta karoten – linoleik asit yöntemi ile toplam antioksidan aktivite tayini 64

4.3.3. ABTS radikal katyon renksizleştirme yöntemi 66

4.3.4. Metal şelatlayıcı aktivite 67

4.3.5. Redükleyici güç 70

4.3.6. Ferriktiyosiyanat yöntemi ile lipit peroksidasyonu (FTC) 71

4.3.7. Tiyobarbutirik asit yöntemi ile lipit peroksidasyonu 73

4.3.8. Fenolik Madde İçerik Tayini 75

4.3.9. Flavonoid Madde İçerik tayini 76

4.3.10 Makrofungus izolatlarının moleküler yöntemlerle tanılanması……..…….78

5. SONUÇ VE ÖNERİLER 80

KAYNAKLAR DİZİNİ……81

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil **Sayfa**

2.1. C vitamini Askorbik asit moleküler yapısı 8
2.2. Askorbik asit etki mekanizması 8
2.3. Alfa tokoferol moleküler yapısı 9
2.4. β- karotenin moleküler yapısı 10
2.5. Fenolik asitler 11
2.6. Flavonoidlerin genel yapısı 12
2.7. Sentetik antioksidanların moleküler yapısı 13
2.8. Analizlerde kullanılan temel kromojenik reaktifler 17
2.9. DPPH reaktifi ve serbest formu 18
2.10. ABTS.+ radikal katyonu moleküler şeması 19
2.11. CUPRAC reaksiyonu şeması 20
2.12. Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan güç 21
4.1. Üç fungus örneğinde toplam reaksiyon karışımındaki kültür sıvısı miktarının DPPH radikal süpürücü aktiviteye (%) etkisi 44
4.2. Fungus hücre ekstraksiyon yönteminin DPPH radikalinin % giderimine etkisi 48
4.3. Seçilmiş OBCC izolatlarının hücre kitlesi ekstraktlarına ait antioksidan aktivite ve total fenolik içerik 54
4.4. Seçilmiş OBCC izolatlarının kültür sıvısı ekstraktlarına ait antioksidan aktivite ve total fenolik içerik 60
4.5. Güne bağlı değişen DPPH radikali süpürücü antioksidan aktivite miktarı 61
4.6. OBCC 1047 kültür sıvısı ekstraktının DPPH radikal süpürücü antioksidan aktivite konsantrasyon - absorbans grafiği 63
4.7. OBCC 1047 DPPH radikal süpürücü antioksidan aktivite 63
4.8. Kontroller ve OBCC 1047 kodlu izolata ait antioksidan aktivite değerleri 65
4.9. Sentetik antioksidanlar ve OBCC 1047 kodlu izolata ait % ABTS radikal katyon renksizleştirme yöntemi grafiği 66
4.10. % ABTS radikal katyon renksizleştirme yöntemi 66
4.11. Tokoferol lineer regresyon grafiği 67
4.12. OBCC 1047 ve sentetik antioksidanlara ait % metal şelatlayıcı aktivite 68

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil **Sayfa**

4.13. EDTA lineer regresyon grafiği 68
4.14. Deney ve kontrol gruplarının % metal şelatlayıcı aktiviteleri 69
4.15. OBCC 1047 ve sentetik antioksidanlara ait redükleyici güç absorbans değerleri 70
4.16. Redükleyici güç testi 71
4.17. 0-120 saatleri arasında Kontrol, OBCC 1047, BHT ve Askorbik asit absorbansları . 71
4.18. Ferriktiyosiyanat yöntemi ile % lipit peroksidasyonu 72
4.19. Ferriktiyosiyanat yöntemi ile % lipit peroksidasyonu 73
4.20. Tiyobarbutirik asit yöntemi ile /zamana bağlı absorbans değerleri 74
4.21. Tiyobarbutirik asit yöntemi ile % antioksidan aktivite 74
4.22. Total fenolik asit içerik tayini 76
4.23. Gallik asit lineer regresyon grafiği 75
4.24. Rutin lineer regresyon grafiği 77
4.25. Total flavonoid içerik tayini 77

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge **Sayfa**

2.1. Antioksidanların sınıflandırılması 4

3.1. Tarama çalışmasında kullanılan fungus izolatları 26

3.2. Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve kullanım alanları 30

3.3. Kültür sıvısı miktarının DPPH radikal süpürücü madde miktarına oranı 33

4.1. Üç fungus örneğinde toplam reaksiyon karışımındaki kültür sıvısı miktarının DPPH radikal süpürücü aktiviteye (%) etkisi. 43

4.2. Kültür tipi, besiyeri ve izolat değişiminin antioksidan aktivite üzerin etkisine ait varyans analiz çizelgesi 46

4.3. Farklı besiyerleri ve kültür tiplerinde elde edilen DPPH radikal giderimi (%) ve toplam fenolik madde (gallik asit eşdeğeri mg/ml) değerleri. 46

4.4. Fungus hücre ekstraksiyon yönteminin DPPH radikalinin % giderimine etkisi. 47

4.5. Fungal hücre kitlelerinin DPPH radikal giderimi ve toplam fenolik madde içerikleri 49

4.6. Fungal kültür sıvılarının DPPH radikal giderimi ve toplam fenolik madde içerikleri. 55

4.7. OBCC 1047 ve sentetik antioksidanların DPPH radikal süpürücü antioksidan aktivite testi için EC 50 değerleri 64

4.8. OBCC 1047 ve sentetik antioksidanların redükleyici güç testi için EC 50 değerleri ... 70

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	**Açıklama**
CO_2	Karbondioksit
O_2	Oksijen
H_2O	Su
Cu	Bakır
Zn	Çinko
Mn	Mangan
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
DHLA	Dihidrolipofilik asit
TPTZ	2,4,6-tri (2-piridil) -1,3,5-triazin
$K_2S_2O_8$	Potasyum Persülfat
NADP	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
LOO	Lipit peroksil radikalleri
GR	Glutatyon Redüktaz
GSH	Glutatyon
GS·	Tiyil radikali
$O_2^{\cdot -}$	Süperoksit radikali
H_2O_2	Hidrojen peroksit
$OH^{\cdot}$	Hidroksil radikali
$^1O_2$	Singlet oksijen
Fe(III)	Ferrik demir
Fe(II)	Ferrus demir
SCN^-	Tiyosiyanat
$AlCl_3$	Alüminyum klorür
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
ArO	Aril oksit
AAPH	2,2-azobis (2- aminopropan) diklorit
Cu(II)	Kuprik asetat

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Simgeler	**Açıklama**
Cu(I)	Bakır iyodid
NO	Nitrik oksit
SOD	Süperoksit dismutaz
$ROO^{\cdot}$	Peroksil radikalleri
CAT	Katalaz
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit
sAMP	Siklik adenozin monofosfat
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
GSSG	Oksitlenmiş glutatyon
LOOH	Lipid peroksitleri

Kısaltmalar	**Açıklama**
ROT	Reaktif oksijen türleri
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
ABTS	2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)]
FTC	Ferrik tiyosiyanat
TBA	Tiyobarbiturik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
MDA	Malondialdehit
HAT	Hidrojen atom transferi
ET	Elektron transferi
RNS	Reaktif azot türleri
EC50	Etkin konsantrasyon 50

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mantarlar geçmişten günümüze gıda ya da ilaç olarak kullanılmakta, yüksek protein içerikleri ve kolesterol içermemeleri sebebiyle diyette sıklıkla tercih edilmektedirler. Bu özellikleriyle mantarlar araştırıcıların dikkatini çekmiş ve birçok bilimsel araştırmaya konu olmuşlardır. Günümüzde sağlıksız beslenmenin artması, hava kirliliği, radyasyon ve stres gibi çevresel ajanların etkisiyle insan vücudu sürekli bir saldırı altındadır. Organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında ve/veya çeşitli dış faktörlerin etkisiyle serbest radikaller meydana gelmektedir. Serbest radikaller dış orbitalinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron taşıyan, yüksek enerjili atom veya moleküller olarak tanımlanmaktadır (Bast vd., 1991). Bu nedenle diğer maddelerle reaksiyona girerek kararlı duruma geçme eğilimindedirler. Serbest radikaller oksijen ve nitrojen kaynaklı olabilirler. Canlı hücreler için zararları bilinen en önemlileri; süperoksit radikali, hidroksil radikali, singlet oksijen olup "reaktif oksijen türleri (ROT)" olarak bilinirler. ROT'lar organizmada lipidler, nükleik asitler, proteinler ve karbonhidratlar gibi biyolojik moleküllerle kolayca reaksiyona girebilirler.

Serbest radikallerin özellikle lipitlerle reaksiyona girmesi gıda teknolojisi ve endüstri açısından da çok önemlidir. Yağ bakımından zengin ürünlerin saklanması ve raf ömrünün arttırılması ancak lipitlerin serbest radikallerden korunmasıyla olmaktadır. Bu nedenle gıdaların korunması amacıyla sentetik antioksidanlar gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadırlar.

Antioksidanlar ise serbest radikallerin oluşturduğu hasarı engellemeye ve önlemeye yardımcı maddelerdir. Antioksidanların serbest radikallerin oluşturduğu çeşitli hastalıkları önlemedeki rolü deneysel, klinik ve epidemiyolojik çalışmalar ile ortaya konmaya başlandıkça antioksidanlar gittikçe daha çok önem kazanmaya başlamıştır (Ames vd., 1993). Vücutta serbest radikallerin oluşturduğu hasarı önlemek için endojenik sistemler bulunduğu gibi dışarıdan diyetle ve ilaçlar ya da takviye edici gıda olarak da alınmaktadır. Bunlar da ekzojen kaynaklı sistemlerdir. Endojenik kaynaklar serbest radikallerle baş etmekte yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle gerek diyetle gerekse takviye edici destekler gibi ekzojen kaynaklarla sistemin desteklenmesi gerekmektedir.

Ayrıca endüstriyel sistemler de lipitlerin korunması amacıyla kullanılan gıda katkı maddeleri ya da sentetik antioksidanlar, bilimsel gelişmelerle paralel olarak yapılan çalışmalarla toksik ve karsinojen olabilecekleri ortaya konmuştur. Bu nedenle hazır gıda endüstrisinde sağlıklı, doğal, ucuz maliyetli koruyucu ürün arayışı başlamıştır. Mantarların antioksidan aktivitesindeki önemi burada devreye girmektedir. Bilindiği üzere mantarlar fenolik bileşen bakımından zengin organizmalardır ve fenolik maddeler yüksek antioksidan aktiviteleriyle tanınırlar (Madhavi, 1996). Bu nedenle mantarlar antioksidan aktivite çalışmaları için tercih sebebi olmuştur.

Çalışmamızda bu veriler göz önünde bulundurularak 132 fungal izolatın antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Aralarında yenilebilir mantarların da bulunduğu bu geniş yelpaze içerisinde, en aktif bulunan bir izolat seçilmiş ve antioksidan aktivitesi β-Karoten- Linoleik Asit Yöntemi, ABTS Radikal Katyon Giderici Antioksidan Aktivite, Redükleyici Güç, Metal Şelatlayıcı Aktivite, Ferrik Tiosiyanat Yöntemi İle Lipit Peroksidasyonu, Tiyobarbiturik Asit Yöntemi İle Lipit Peroksidasyonu gibi yöntemlerle değerlendirilmiştir. Ayrıca antioksidan aktiviteye neden olan biyoaktif bileşenlerin varlığı total Fenolik Asit ve total Flavonoid yöntemleriyle sorgulanmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Antioksidanlar

Antioksidanlar genel olarak oksidasyonu engelleyen maddeler olarak bilinmektedirler ve radikallerle oldukça hızlı bir şekilde reaksiyona girerek otooksidasyon/peroksidasyonun mekanizmasının ilerlemesini önleyici etki yapmaktadırlar. (Dündar vd., 1999).

Antioksidanların kullanımı ilk olarak 19. yy dayanmaktadır. 19.yy sonlarına 20.yy başlarına doğru sanayileşmenin artmasıyla mühendisler metallerin korozyonunu ve oksidasyonunu önleyecek bir arayış içerisine girmişlerdir. Yapılan çalışmalarla ilk olarak kauçuk endüstrisinde kauçuğun bozunmasını yavaşlatan ve vulkanizasyona olanak sağlayan bir ampirik madde kullanılmıştır. Bu maddeler antioksidanlar olarak adlandırılmıştır ve hala günümüzde kauçuk endüstrisinde kullanılmaya devam etmektedirler (Kumar. 2014).

Antioksidanların gıda endüstrisine girmesi 20.yy ortalarında olmuştur. Hazır yiyecek ve paketli gıda tüketiminin artmasıyla gelişen gıda sanayinde raf ömrü ve dayanıklılık önemli bir sorun haline gelmiştir. Çeşitli çalışmalarla doymamış yağlardaki bozunmayı engellediğini öğrendikleri antioksidanları, gıda endüstrisinde kullanmaya başlamışlardır.

Antioksidanlar endüstride kullanımının yanında insan sağlığı için çok önemli maddelerdir. Bu maddeler vücuttaki kimyasal reaksiyonları destekleyen protein yapısındaki enzimler ile vitamin ve mineral gibi besin öğeleridir. Antioksidanların kalp hastalıkları, kanser, diyabet, inme, Alzheimer hastalığı, romatoid artrit, katarakt ve kronik hastalıkların gelişmesinde koruyucu bir rol oynadığına inanılmaktadır (Karadağ vd., 2009).

2.2. Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidanlar kaynaklarına göre; endojenik ve ekzojenik, yapılarına göre; enzimatik, non-enzimatik, yapıtaşlarına göre doğal ve sentetik olarak sınıflandırılırlar. Antioksidanların sınıflandırılması Çizelge 2.1. de sunulmuştur.

Çizelge 2.1. Antioksidanların sınıflandırılması

Endojen Antioksidanlar		
Enzimatik Antioksidanlar	Nonenzimatik Antioksidanlar	
Süperoksit Dismutaz (SOD)	Glutatyon	Koenzim Q 10
Katalaz (CAT)	Melatonin	Selenyum
Glutatyon Peroksidaz (Gpx)	Ürik Asit	A-Lipoik Asit
Glutatyon Redüktaz (GR)	Bilirubin Albümin	Transferrin Seruloplazmin
Ekzojen Antioksidanlar		
Vitamin Ekzojen Antioksidanlar	İlaç Olarak Kullanılan Ekzojen Antioksidanlar	
A-Tokoferol (Vitamin E)	Ksantin oksidaz inhibitörleri (Allopürinol, Oksipürinol, Pterin Aldehit, Tungsten)	
B-Karoten (Vitamin A)	NADPH oksidaz inhibitörleri	
Askorbik Asit (Vitamin C)	Rekombinant süperoksit dismutaz	
Folik Asit (Vitamin B9)	Trolox-c (Vitamin E Analoğu)	
	Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GPX aktivitesini artıran Ebselen ve Asetilsistein)	
	Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (Mannitol, Albümin)	
	Demir redoks döngüsü inhibitörleri (Desferroksamin)	
	Sitokinler (TNF ve IL-1)	
	Barbitüratlar	
	Demir şelatörleri	

2.2.1. Doğal antioksidanlar

Doğal antioksidanlar; canlı vücudunda oksidatif strese karşı koymak amacıyla hücre içerisinde bulunan enzim sistemleri ya da doğal kaynaklardan elde edilen gıdalardan vücuda alınan vitaminler, fenolik bileşikler, karotenoidler ve çeşitli metal bağlayıcı proteinlerdir. Doğal antioksidanlar endojen ve ekzojen olarak iki gruba ayrılırlar; canlı vücudunda bulunan doğal savunma sistemleri endojen, vücuda dışarıdan gıda, ilaç vb. yollarla alınan antioksidanlar ise ekzojen olarak adlandırılır (Çizelge 2.1.).

2.2.1.1. Enzimatik antioksidanlar

Enzimatik antioksidanlar hücre içerisinde gerçekleşen çeşitli metabolik olaylar sonucu oluşan serbest radikallerin ortamdan uzaklaştırılması ve /veya inhibe edilmesinden sorumlu proteinlerdir. Süperoksid dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz bilinen enzimatik antioksidanlardır.

Hidrojen peroksit, süperoksit anyonu ve hidroksil radikali; O_2 molekülünün hücre içerisinde kullanılmasıyla ortaya çıkan ürünlerdir. Denklem 2.1. de görüldüğü üzere süperoksid dismutaz, (SOD) reaktif oksijen türlerine karşı hücre içerisindeki ilk savunma hattını oluşturarak süperoksit anyonunu, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene parçalar. Böylece süperoksit serbest radikalinin hücre yapısına zararı engellenmiş olur.

$$2O_2^{\cdot -} + 2H \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2 \qquad (2.1.)$$

SOD'ın insanlarda iki tipi bulunmaktadır. Bunlar, sitozolde bulunan dimerik, Cu ve Zn ihtiva eden izomer (Cu-Zn SOD) ile mitokondride bulunan tetramerik Mn ihtiva eden izomerlerdir (Mn SOD) (Helle vd., 1997).

SOD aktivitesi sonucu oluşan H_2O_2 bir serbest radikal değildir ancak aktif bir $OH^{\cdot}$ radikali öncüsü olduğundan oksidadif hasara neden olma ihtimali yüksektir. Katalaz H_2O_2'i su ve oksijene parçalayarak ve hücreyi hidroksil radikalinin zararlarından korur (Denklem 2.2.).

$$2H_2O_2 \xrightarrow[CAT]{} 2H_2O + O_2 \quad (2.2.)$$

Hücrelerde oluşan hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasından sorumlu diğer bir antioksidan enzim glutatyon peroksidazdır. Glutatyon peroksidazın yapısında bir atom selenyum içerir. Bu nedenle enzimin görevini iyi yapabilmesi için diyetle selenyum alınması önemlidir. Glutatyon peroksidazın katalize ettiği reaksiyonlarda hidrojen peroksit parçalanırken glutatyon ise (GSH) okside glutatyona (GSSG) yükseltgenir (Denklem 2.3.).

$$H_2O_2 + {}_2GSH \longrightarrow GSSG + 2H_2O \quad (2.3.)$$

Hidrojen peroksit dışında, singlet oksijen, süper oksit anyonu ve hidroksil radikalleri gibi birçok zararlı oksidanla enzim katalizi olmaksızında reaksiyona girmektedir (Koca ve Karadeniz, 2013)

Glutatyon redüktaz ise elektron transferini katalizler. Hidrojen peroksit parçalanması sırasıda okside olan glutatyonun tekrar kullanılabilmesi için redükte GSH dönüşmesi gerekmektedir. Glutatyon redüktaz NADPH varlığında glutatyon disülfiti tekrar redükte glutatyona (GSH) çevirir (Denklem 2.4). GR enziminin katalizlediği reaksiyonun bilinen en önemli hedeflerinden biri hücre ortamındaki indirgenmiş glutatyon/yükseltgenmiş glutatyon oranını korumaktır. Bu oran eritrosit hücrelerinde yaklaşık 500/1'dir. Bu oranın düşmesi halinde eritrosit hücreleri hemolize uğramaktadır. Bu oranın düşmesi halinde eritrosit hücreleri hemolize uğramaktadır (Temel vd., 2017).

$$GSSG + NADPH + H^+ \longrightarrow GSH + NADP^+ \quad (2.4.)$$

2.2.1.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar

Enzimatik olmayan doğal antioksidanlar canlı dokularında ya da çeşitli bitki mantar metabolitlerinde veya onların ekstraktlarında bulunan maddelerdir.

Bunlardan ilki olan Glutatyon; primer hücresel antioksidandır. Glutamik asit, sistein ve glisinden meydana gelir ve düşük molekül ağırlıklı bir tripeptiddir. İndirgenmiş durumdaki sisteinin tiyol grupları elektron vererek serbest radikalleri indirgeyebilir.

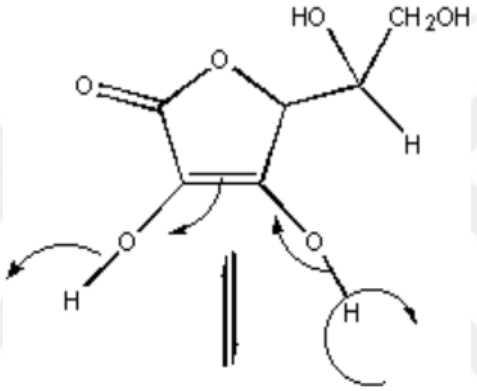
Böylece aerobik metabolizmada, hücrelerimiz tarafından oksijen kullanımı sırasında oluşan çeşitli reaktif oksijen türlerinin (ROT) giderilmesini sağlar. Glutatyon hücrede antioksidan aktivitesinin dışında hücrenin redoks durumunu korumada, detoksifikasyon sisteminin çalışmasında, hücre sinyal mekanizmasının düzenlenmesinde, gen ekspresyonunda ve apoptozisde de faaliyet gösterir (Townsend vd., 2003).

Melatonin, ürik asit, bilrübin ve albumin insan vucudunda sentezlenen diğer enzimatik olmayan antioksidanlardır. Doğrudan serbest radikal süpürücüsü ya da antioksidan etki göstermeseler de canlı organizma için geniş çaplı bir koruma sağlarlar.

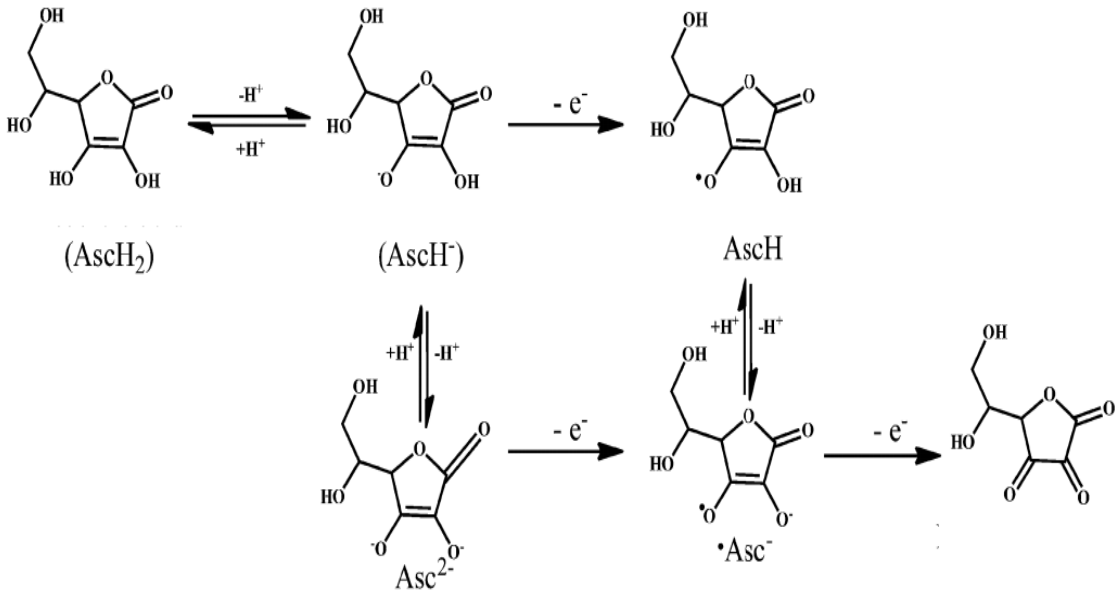
Bir diğer antioksidanlar olan α-Lipoik asit ve Koenzim Q10 insanlarda az miktarda sentezlenen antioksidanlardır. α-Lipoik asit; diğer adıyla tioktik asit güçlü bir antioksidandır ve mitokondriyal enzim komplekslerine spesifik proteinlerle bağlı durumdadır. Lipoik ve dihidrolipofilik asit (DHLA) olmak üzere iki izomeri bulunmaktadır. DHLA, α-Lipoik asitin indirgenmiş formudur ve her ikiside serbest radikal süpürücü antioksidan aktivite, metallerle şelat yapma yeteneği, oksidatif hasarı onarma yeteneği gibi antioksidan özellik gösterirler (Tetikçok vd., 2015). Koenzim Q10 ise mikrozom, mitokondri gibi çeşitli organelleri ve hücreleri çevreleyen lipid membranların bileşeni olan lipofilik bir antioksidandır. Canlı hücrelerde üretilir ancak yaşlanma ve yanlış beslenme gibi nedenlerle vücutta seviyesi azdır. Koenzim Q10, iyi bir antioksidan olarak mitokondriyal iç membranındaki solunum zincirinin elektron ve proton transportuna katılır ve oksidatif stresi azaltarak, hücre ve dokularda serbest radikal oksidasyonunu önler (Gürkan ve Dündar, 2005).

Vitamin C, diğer adıyla askorbik asit; birçok memeli metabolizması tarafından sentezlenebilen ancak insanlar, primatlar ve gine domuzları için ekzojen olan bir antioksidan maddedir. Bu üç tür, hücrelerinde glikozdan C vitamini sentezini yapacak olan enzimi bulundurmazlar. Bu nedenle endojen olarak C vitamini üretemezler. Ancak dışarıdan diyet ile yeterince vitamin almazlarsa geniş bir spektrumda klinik bulgularda problem açığa çıkar ve bu durum ölümcül olabilir. C vitamini, bir elektron donörü ve bu nedenle bir indirgeyici maddedir ve bilinen tüm fizyolojik ve biyokimyasal etkileri, bir elektron donörü olmasına bağlıdır.

Askorbik asit kimyasal yapısı Şekil 2.1. de verilmiştir (Padayatty vd., 2002). 6-karbon molekülünün ikinci ve üçüncü karbonları arasındaki bir çift bağdan iki elektron vererek antioksidan aktivitesini göstermektedir. Vitamin C, lipit peroksidasyon zinciri reaksiyonunu sonlandırmak için lipit radikaline bir elektron vererek askorbat radikaline dönüşür. Askorbat radikal çiftleri, bir moleküllü askorbat ve bir dehidroaskorbat molekülü üretmek üzere hızla reaksiyona girerler. Dehidroaskorbatın antioksidan kapasitesi yoktur. Bu nedenle dehidroaskorbat, iki elektronun eklenmesiyle askorbat haline geri dönüştürülür. İki elektronun dehidroaskorbata eklenmesinin son aşamasının, oksidoredüktaz enzimi katalize eder (Şekil 2.2.) (Nimse ve Pal, 2015).

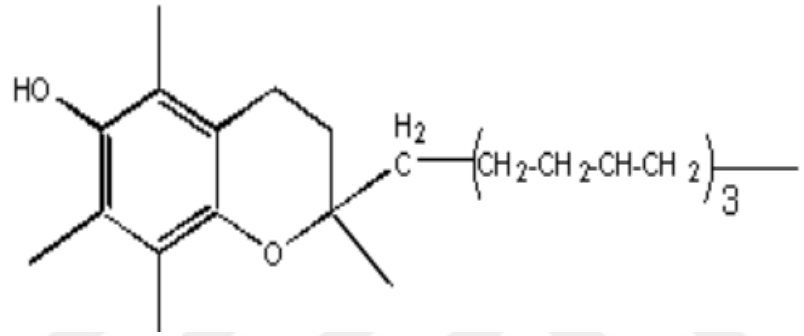


Şekil 2.1. Askorbik asit kimyasal yapısı



Şekil 2.2. Askorbik asit etki mekanizması

Vitamin E diğer adıyla α-tokoferol diğer bir ekzojen kaynaklı doğal antioksidan moleküldür (Şekil 2.3). Askorbik asitte olduğu gibi sentetik olarak da elde edilir. E vitamini hücre membranlarını serbest radikal aracılı peroksidatif hasardan koruyarak doğanın en etkin lipitte-çözünen, zincir-kırıcı antioksidani olarak kabul edilmiştir. E vitamini yalnızca bitkilerde homojenik asitten sentezlenen tokoferoller ve tokotrienollerin karışımından oluşmaktadır. Sekiz farklı formu vardır. Bunlar -α-, β-, γ- ve δ-tokoferol ve γ-, β-, α- ve δ tokotrienoldur ve bu moleküllerin hepsi bitkilerden sentezlenir. İnsan diyetinde bu moleküllerin hepsinin içerisinde en aktif formu α-tokoferoldür. Tokaferoller antioksidan aktivitesini indirgeme özelliği gösteren fenolik hidroksil gruplarına ile gerçekleştirirler.

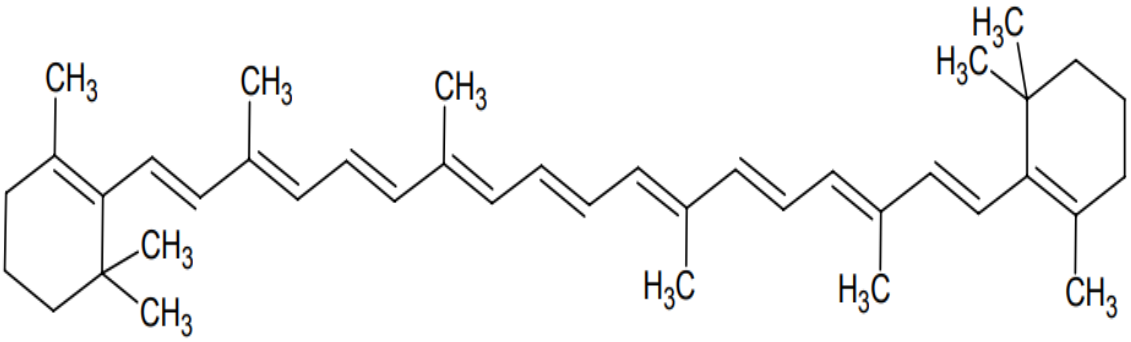


Şekil 2.3. Alfa tokoferol kimyasal yapısı

Vitamin E (α-tokoferol), hücre membranlarında ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) dâhil olmak üzere çeşitli lipit partiküllerinde, lipit peroksidasyonu sırasında bir "zincir kırıcı" olarak işlev gören etkili bir lipit çözünebilir antioksidandır. Denklem2.5 de verildiği üzere lipit peroksil radikallerini (LOO˙) kesmeye ve lipid peroksidasyon zinciri reaksiyonlarını sonlandırmaya çalışır (Nimse ve Pal, 2015).

$$LOO^{\cdot} + \alpha\text{-okoferol–OH} \rightarrow LOOH + \alpha\text{-tokoferol–O}^{\cdot} \qquad (2.5.)$$

Karotenoidler; yağda çözünebilen renk maddeleridir. Bitkiler, mantarlar ve bazı fotosentetik organizmlalarda bulunurlar. Karotenoidleri renk özellikleri yapılarındaki konjuge çift bağlardan kaynaklanmaktadır. Tekli oksijen yakalayıcı ve antioksidan olarak oldukça etkilidir. En bilineni A vitamini öncüsü olan β- karotendir (Şekil 2.4.).

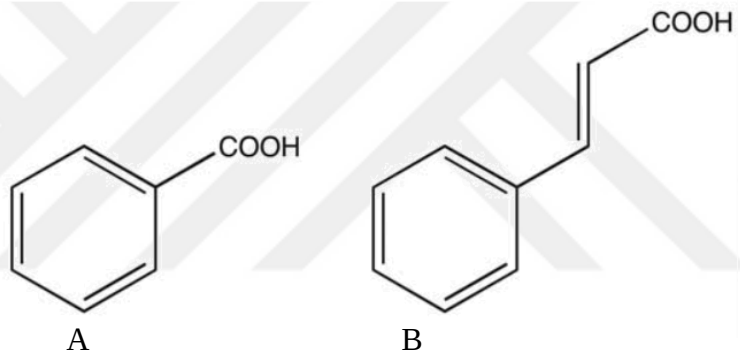


Şekil 2.4. β- karotenin kimyasal yapısı

Karotenoidlerin, peroksil radikallerini diğer herhangi bir ROS'a kıyasla daha verimli bir şekilde süpürdükleri bilinmektedir. Lipit peroksidasyonu prosesinde üretilen peroksil radikalleri, hücre duvarındaki lipitlere zarar verebilir. Peroksil radikallerinin uzaklaştırılması reaksiyon dizisini bozabilir ve hücresel lipitlerin zarar görmesini önleyebilir (Nimse ve Pal, 2015). Karotenoidler serbest oksijen radikallerini baskılayıcı etkisini hem fiziksel hem de kimyasal anlamda gerçekleşmektedir. Fiziksel baskılama esnasında karotenoid yapısı bozulmadan kalırken, kimyasal baskılamada karotenoid yapısı dekompoze olmaktadır. Fiziksel baskılamada eksitasyon enerjisi oksijenden karotenoide geçmekte, topraklanmış oksijen ve triplet halde uyarılmış karotenoid oluşmaktadır. Oluşan fazla enerji ortamdaki çözücü ya da yapılarla rotasyonal ve vibrasyonal etkileşime girerek ısı şeklinde yok olmaktadır. Topraklanan karotenoid yeniden oksijen yakalamak üzere hazır hale gelmektedir. Bu şekilde hücre içinde bulunan singlet oksijen ya da peroksil radikalleri ortamdan uzaklaştırılmış olmaktadır (Gökbulut ve Şarer, 2008).

Fenolik bileşikler bitkilerde ve mantarlarda bulunduğu bilinen sekonder metabolitlerdir. Böcek ve hayvan zararlılarına karşı organizmayı korurlar (Nizamoğlu ve Nas, 2010). Aynı zamanda, serbest süperoksit radikallerini temizleyebilen, anti-aging ve kanser riskini azaltan bir tür doğal ürün ve antioksidan maddelerdir. Fenolik maddeler aromatik halkasında bir veya daha fazla hidroksil grubu içerirler. Bu bakımdan en basit fenolik maddenin bir tane hidroksil grubu içeren benzen yani fenol olduğu ve diğer fenolik maddelerin bundan türediği bilinmektedir (Cemeroğlu ve Acar, 1986). Fenolik bileşikler fenolik asitler ve flavonoidler olarak iki gruba ayrılırlar.

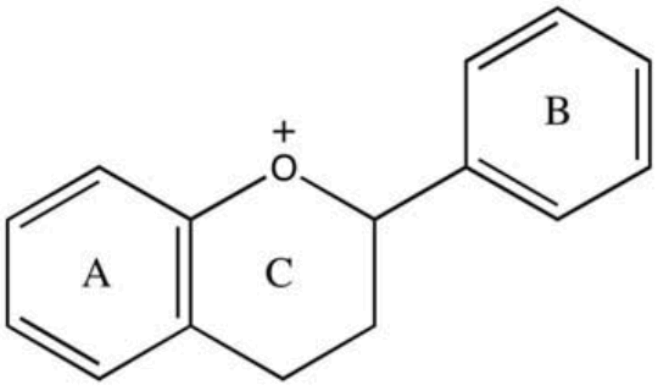
Fenolik asitler, geniş farmakolojik aktiviteleri olan meşhur sekonder metabolit grubudur. Fenolik asitlerin çeşitli biyolojik aktiviteleri bildirilmiştir. Safra sekresyonunu arttırması, kan kolesterolü ve lipit seviyelerini düşürmesi ve *Stafilococus aureus* gibi bazı bakteri suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitesi fenolik asidin biyolojik aktivitelerinden bazılarıdır (Ghasemzadeh ve Ghasemzadeh, 2011). Hidroksi benzoik ve hidroksisinamik asitler olarak iki gruba ayrılırlar (Şekil 2.5). Hidroksibenzoik asitler C6-C1 fenilmetan yapısında olup, bitkisel gıdalarda genelde iz miktarda bulunurlar. Bunlar salisilik asit, hidroksibenzoik asit, gallik asit, vanilik asitler gibi asitlerdir. Hidroksisinamik asitler ise C6-C3 fenilpropan yapısındadırlar. Fenilpropan halkasına bağlanan OH grubunun konumu ve yapısına göre farklı özellik gösterirler. Çok yaygın bulunanları; kafeik asit, ferulik asit, p-kumarik asit ve o-kumarik asitlerdir (Nizamoğlu ve Nas, 2010).



Şekil 2.5. Fenolik asitler A) Hidroksi benzoik asit B) Hidroksisinamik asitler

Flavonoidler ise; karbon iskeletinin, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren, difenilpropan (C6-C3-C6) yapısında düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir (Şekil 2.6). Değişik flavonoidler arasındaki farklar bağlanan hidroksil gruplarının sayısından, doymamışlık derecesinden ve üçlü karbon segmentinin oksidasyon düzeyinden kaynaklanmaktadır. Günümüze kadar tanımlanan 8000'den fazla fenolik bileşenin 4000'den fazlası flavonoiddir (Kolaç vd., 2017).

Flavonoidler, biyolojik sistemlerin, karbonhidratlar, proteinler, lipitler ve DNA gibi makromoleküller üzerindeki oksidatif stresin zararlı etkilerinden korunmasında önemli rol oynayan maddelerdir.

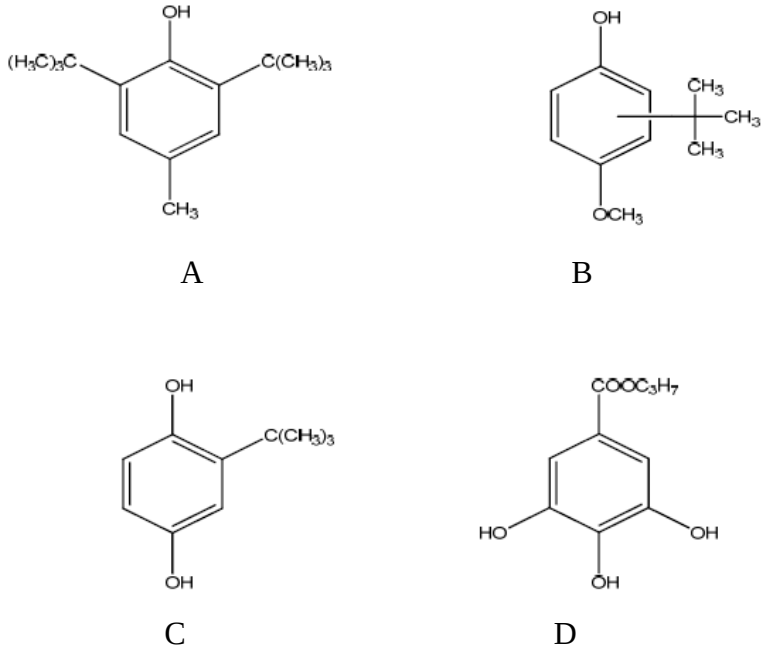


Şekil 2.6. Flavonoidlerin genel yapısı

Antosiyanidinler; flavonlar ve flavonollar, flavanonlar, kateşinler ve lökoantosiyanidinler, proantosiyanidinler olmak üzere 5 alt gruba ayrılırlar. Serbest radikal gidericisi, peroksit parçalayıcısı, enzim inhibitörleri ve sinerjistler olarak fonksiyon göstermektedir. Antioksidanlar serbest radikallerin neden olduğu zararlı etkileri, düşük yoğunluklu lipoproteinleri (LDL) ve lipoprotein oksidasyonunu önleyerek sağlık üzerinde olumlu etkiler yapmaktadırlar. Fenolik bileşikler antialerjik, antienflamatuar, antidiyabetik, antimikrobiyal, antipatojenik, antiviral ve antitrombotik etkiye sahip olduğu yapılan pek çok araştırma ile tespit edilmiştir. Antioksidan olarak fenolik bileşikler kanser, kalp hastalıkları, katarakt, göz hastalıkları ve Alzheimer gibi hastalıkları engellemektedirler (Nizamoğlu ve Nas, 2010).

2.2.2. Sentetik antioksidanlar

Sentetik antioksidanlar, herhangi bir canlı türünde bulunmayıp laboratuar ortamında kimyasal tepkimeler ile elde edilmiş maddelerdir. Sıklıkla endüstriyel proseslerde kullanılırlar. Sentetik antioksidanlar petrol bazlı ürünlerden elde edilir. Genellikle TBHQ (tersiyer-bütilhidrokinon), BHA (bütillenmiş hidroksianisol), BHT (bütillenmiş hidroksitolüen) ve propil gallat sentetik antioksidan olarak kullanılır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Sentetik antioksidanların kimyasal yapısı A) BHT B)BHA C)TBHQ D)Propil gallat

Sentetik antioksidanlar günümüzde hala gıda katkı maddeleri olarak kullanılmaktadır. Gıdaların saklanması ve depolanması işlemlerinde en sıklıkla karşılaşılan bozulma problemlerinin başında lipit oksidasyonu gelir. Sentetik antioksidanlar lipit peroksidasyonunu inhibe ederek, bozulmayı - acılaşmayı engellerler ve raf ömrünün uzaltırlar. Ancak yapılan birçok çalışma ile insan sağlığı açısından zararlı oldukları ve bir çok kanser türüyle ilişkili oldukları birçok bilimsel araştırmayla ortaya konulmustur (Thorat vd.,2013). Bu nedenle sentetik antioksidanların yerini alacak doğal antioksidan arayışı hız kazanmıştır.

2.3. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

Literatür incemelerinde antioksidan kapasiteyi ölçmek için bu güne kadar çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Yöntemler genellike serbest radikallerin kararlı hale getirilmesi ve sonuçların değerlendirilmesi şeklindedir. Hidrojen atomu transfer (HAT) reaksiyonlarına dayanan yöntemler ve elektron transferine (ET) dayanan yöntemler olmak üzere ikiye ayrılırlar.

HAT temelli yöntemlerin birçoğu peroksil radikalleri için antioksidan ve substratın rekabetine dayalı reaksiyonları kullanmaktadır. Bu yöntemler oksijen radikal absorbans kapasite (ORAC), toplam radikal yakalayıcı antioksidan parametre (TRAP) ve karotenoid beyazlatma yöntemlerini içermektedir. ET temelli yöntemler antioksidanın oksidanı indirgeme yeteneğini renk değişimi ile ölçen yöntemlerdir. ET temelli yöntemler toplam Folin- Ciocalteu ayıracı ile toplam Fenolik yöntemi (FCR), Troloks eşiti antioksidan kapasite (TEAC), demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP), oksidan olarak bakır (II) kullanan toplam antioksidan potansiyel yöntemi (CUPRAC) ve DPPH (2,2-difenil- 1-pikrilhidrazil) serbest radikal süpürücü antioksidan aktivite yöntemini içermektedir.

2.3.1. Hidrojen atomu transfer (HAT) reaksiyonlarına dayanan yöntemler

HAT bazlı analizler, bir antioksidanın serbest radikallerine (genellikle biyolojik olarak daha alakalı olduğu düşünülen peroksil radikalleri) H-atom verilmesi ile indirgenme kapasitesini ölçmektedirler. Bir fenolün (Ar-OH) hidrojen atomunun (H) bir $ROO^{\bullet}$ radikaline transfer edildiği antioksidan etkisi, HAT mekanizmaları reaksiyonlarıyla özetlenebilir (Denklem 2.6.) (Apak vd., 2013).

$$ROO\bullet + AH/ArOH \rightarrow ROOH + A\bullet /ArO\bullet \qquad (2.6)$$

2.3.1.1. <u>Oksijen radikali absorbans kapasitesi (ORAC) yöntemi</u>

Oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC) birçok bilimsel çalışmada antioksidan kapasitesinin ölçülmesinde geniş bir şekilde kullanılmaktadır. ORAC analizi ilk olarak Cao, Alessio, ve Cutler tarafından hedef molekül olarak fikoeritrin üzerinde kullanılmış olmasına rağmen günümüzde daha çok fluoresein üzerinde kullanılmaktadır. Bu yöntem ORAC analizinde okside edilebilir protein maddesi olarak beta-fikoeritrin ve peroksi radikal üreticisi olarak 2,2-azobis (2- aminopropan) diklorit (AAPH) veya Cu^{2+}- H_2O_2 hidroksi radikal sağlayıcısı olarak kullanılır. Bu yöntem temel olarak 37 ºC'de bulunan AAPH'ın uyarılarak peroksi radikallerine karşı antioksidan temizleme fonksiyonunun ölçümüne dayanmaktadır. Yöntemde ışıma (florosan) probu olarak fluoresein kullanılmakta olup bu ışımadaki azalma peroksi radikalleri ile reaksiyona giren fluoreseinin bozulma derecesi hakkında bilgi vermektedir (Ciz vd., 2010).

2.3.1.2. Toplam radikal yakalayıcı parametre (trap) yöntemi

Toplam radikal yakalayıcı parametre (TRAP) yöntemi ilk defa Wayner vd. tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem bir azo bileşiğin sıcaklıkla bozulması ile oluşturulan kontrollü lipit peroksidasyonu boyunca oksijen tüketiminin ölçülmesini temel almaktadır. Bu yöntemde serbest radikal üretimini başlatıcı olarak AAPH tarafından üretilen peroksil radikalleri kullanılmaktadır. Plazmaya AAPH eklendikten sonra okside olabilen materyalin oksidasyonu, reaksiyon süresince tüketilen oksijen yoluyla izlenir. Bu oksidasyon plazmada bulunan antioksidan tarafından engellenir. Sonuçlar troloks C (6- hidroksil–2,5,7,8,-tetramethylchroman–2-carboxylic acid)'nin sonuçları ile kıyaslanır (Albayrak vd., 2010).

2.3.1.3. Karotenoid beyazlatma yöntemi

Karotenoid beyazlatma deneyi (CBA), hidrofilik örneklerin antioksidan aktivitesini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Düşük tekrarlanabilirliği, sonuçlarda ortaya çıkan farklılıklar, reaktif hazırlığındaki farklılıklar ve sıcaklık, pH, solventler ve metaller gibi faktörlere duyarlılığı nedeniyle eleştirilmektedir. Bu yöntemde azo başlatıcının sıcaklıkla bozulması sonucu oluşan peroksil radikalleri tarafından beyazlama derecesi ölçülmektedir (Denklem 2.7.) (Prieto vd., 2015). Yöntemde karotenoid olarak genellikle β-karoten ya da krosin tercih edilir. β-karoten' in 470 nm'de rengini kaybetmesi, birkaç farklı girişim ile olabildiğinden sonuçların yorumlanması zordur. Buna karşılık, krosinin yalnızca radikal oksidasyonu yoluyla rengi açılır. Bu nedenle β-karoten yerine tercih edilir (Büyüktuncel, 2013).

$$RN = NR \longrightarrow 2R^{\bullet} + N2 \qquad (2.7.)$$

$$R^{\bullet} + O2 \longleftrightarrow R00^{\bullet}$$

$$\text{Krosin - H (portakal rengi)} + R00^{\bullet} \longrightarrow \text{Krosin}^{\bullet}\text{ (rengi açılmış)} + R00$$

$$\text{krosin - H (portakal rengi)} + R00^{\bullet} + AH \longrightarrow \text{Krosin}\bullet + R00H + A^{\bullet}$$

2.3.2. Elektron transfer (ET) yöntemleri

Elektron transferine dayalı yöntemler serbest radikal ve antioksidan arasındaki elektron alışverişini renk değişimi ile ölçen yöntemlerdir. Antioksidan serbest radikale verdiği elektron sonrası serbest radikalde bir renk değişimi meydana gelir. Bu renk değişiminin spektrofotometrik olarak değerlendirilmesiyle antioksidan aktivite belirlenmektedir (Albayrak vd., 2010). ET dayalı antioksidan aktiviye yöntemlerinde denklem 2.8. de verildiği gibi gerçekleşmektedir (Apak vd., 2007).

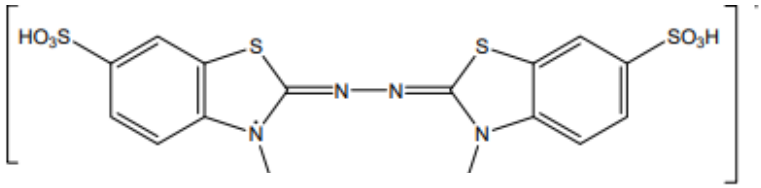
$$ROO. + AH/ArOH \rightarrow ROO^- + AH.^+/ArOH.^+ \quad (2.8)$$

$$AH^{\cdot}+ / ArOH^{\cdot}+ + H_2O \leftrightarrow A^{\cdot} / ArO^{\cdot} + H3O+$$

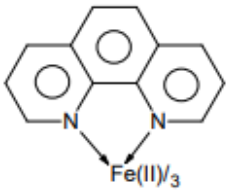
$$ROO^- + H_3O+ \leftrightarrow ROOH + H2O$$

Bu yöntemlerde meydana gelen reakiyonlar sonucu renk değişiminin derecesi (verilen dalga boyunda absorbansın artması veya azalması), numunedeki antioksidanların konsantrasyonu ile ilişkilidir ve bu durum reaksiyondaki kromojenik reaktife bağlıdır. Şöyle ki; DPPH radikal süpürücü aktivite yönteminde ve ABTS radikal katyonu giderici antioksidan aktivite yöntemlerinde kromojenik reaktifin rengi antioksidanlar taafından giderildiğinden absorbans ve renk giderek azalır ve antioksidan madde konsantrasyonu artar. Ancak redükleyici güç ve CUPRAC (Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi) de ise antioksidan kromojenik reaktif ile reaksiyona girdiğinde önceden belirlenmiş bir dalga boyunda absorbansta bir artış olur. Konsantrasyon bu durumlar göz önünde bulunarak değerlendilmektedir. Ayrıca ET temelli yöntemlerde reaksiyon hızı ortamın pH'ına ve çözücü gibi etkenlere bağlı olmadığından HT dayalı yöntemlere göre reaksiyon daha kısa sürer (Apak vd., 2007). Analizlerde kullanılan temel kromojenik reaktifler Şekil 2.8. de verilmiştir.

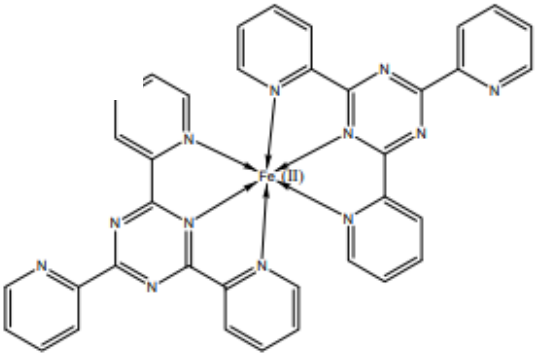
ET temelli yöntemler, Folin-Ciocalteu Ayıracı (FCR) ile Toplam Fenolik Yöntemi, Troloks Eşiti Antioksidan Kapasite (TEAC) Yöntemi ya da ABTS Radikal Katyon Giderimi Yöntemi, Demir İyon İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Yöntemi, Metal şeltlayıcı Antioksidan Kapasite Yöntemi, Oksidan Olarak Cu (II) Kullanılan Toplam Antioksidan Kapasite Yöntemi (CUPRAC), 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürücü Kapasite Yöntemidir.



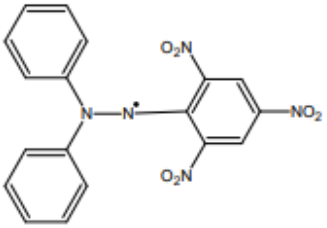
ABTS^{+} Radikal katyonu



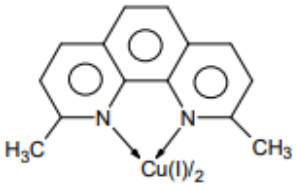
Tris-demir II



Demir tripyridyltriazine katyonu



DPPH radikali



Bis(neokuprin)bakır(I) şelat katyonu

$3H_2O\text{-}P_2O_5\text{-}13WO_3\text{-}5MoO_3\text{-}10H_2O$ Folin Ayıracı

$KFe[Fe(CN)_6]$ Prusya Mavisi

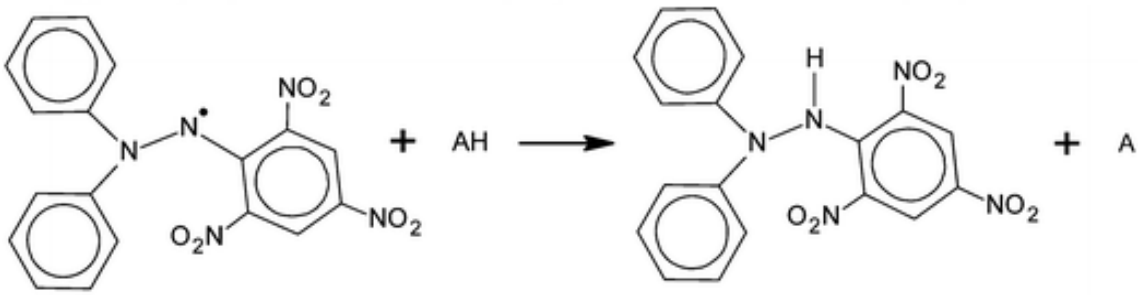
Şekil 2.8. Analizlerde kullanılan temel kromojenik reaktifler

2.3.2.1. 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürücü kapasite yöntemi

Bu yöntem, Blois (1958) tarafından, stabil bir serbest radikal DPPH; a-difenil-P-pikrilhidrazil kullanılarak, antioksidan aktivitenin belirlenmesi amacıyla geliştirilmiştir (DPPH; C18H12N5O6, M = 394.33). DPPH radikali süpürücü antioksidan kapasite yöntemi diğer antioksidan aktivite yöntemleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Yöntem ucuz olması, kolay uygulanması ve hızlı sonuç alınması nedeniyle tercih edilmektedir. Genel olarak yöntem stabil bir serbest radikal olan DPPH'ın indirgenmesine dayanmaktadır.

Serbest DPPH karakteristik olarak mor renktedir ve 517 nm'de en maksimum absorbansı vermektedir (Shekhar ve Anju, 2014). Denklem 2.9 da gösterildiği üzere (Kedare ve Singh, 2011) antioksidanlar (AH), DPPH ile reaksiyona girdiğinde, antioksidanlar serbest radikal DPPH'e (Z) bir elektron vererek DPPH-H ye indirgerler (Şekil 2.9). Ortamda bulunan serbest radikal formunda DPPH ın azalmasıyla renkte açılma ve absorbansda düşme meydana gelmektedir. Renkteki açılmanın fazlalığı antioksidan aktivitenin gücüne işaret eder. (Shekhar ve Anju, 2014)

$$Z^* + AH = ZH + A^* \qquad (2.9)$$



Şekil 2.9. DPPH reaktifi ve serbest formu

DPPH elektron aldığında stabil hale geçer ve tekrar radikal haline dönmesi zordur. 517 nm de güçlü bir absorbsiyon bandı oluşturur ve elektronlar çiftleştikçe mor renk kaybolur. Elde edilen verileri yorumlamanın en basit yolu substrat konsantrasyonuna karşı absorbans grafiği çizmektir. Yaygın olarak kullanılan diğer bir yöntem ise inhibisyon ya da süpürücü aktivitenin yüzde değerinin hesaplanmasıdır (Denklem 2.10.; Molyneux, 2003)

$$Q = 100\ (A_0 - Ac\ )/A_0 \qquad (2.10)$$

A_0 : DPPH'ın ilk absorbansı

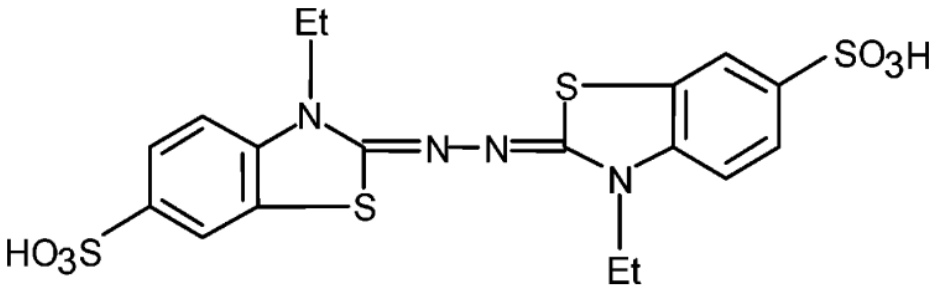
Ac: Örnek eklendikten sonraki absorbans

Ac değeri denklemde yerine yazılırken DPPH eklendikten sonraki antioksidan seyrelme oranı hesaplanmalıdır. Sonuçların sunumunda tercih edilen diğer bir yöntem ise EC50 değeri hesaplanmasıdır. EC 50 değeri konsantrasyonlarına karşın alınan absorbans değerleri ile lineer regresyon grafiğinden hesaplanır.

Grafikten elde edilen y=ax+b denkleminde absorbans ve inhibisyon değerleri yerlerine koyularak DPPH derişimini yarıya düşüren konsantrasyon belirlenir (Brand-Williams vd., 1995). EC 50 değeri ne kadar düşük ise antioksidan aktivite o kadar yüsektir.

2.3.2.2. ABTS radikal katyon giderimi yöntemi

ABTS radikal katyon giderimi yöntemi ya da troloks/tokoferol eşiti antioksidan kapasite yöntemi; uzun ömürlü bir radikal katyon olan $ABTS^{\cdot+}$ radikalinin oksidanlar tarafından süpürülmesi şeklinde Miller vd. tarafından bildirilmiştir. Hem lipofilik hemde hidrofilik antioksidanların tayini için kullanılan renk giderimine dayalı bir yöntemdir. ABTS ve potasyum persülfatın biraraya gelmesiyle oluşan 2,29-azinobis- (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) $ABTS^{\cdot+}$ radikalinin rengi, hidrojen verme kabiliyetindeki antioksianların oksidasyonuyla azalır (Re vd., 1999) (Şekil 2.10.).



Şekil 2.10. ABTS.+ radikal katyonu moleküler şeması

Testin orjinalinde $ABTS^{\cdot+}$ oluşturmak için hidrojen peroksit varlığında metmiyoglobinin peroksidaz kullanılmıştır (Rice-Evans ve Miller, 1984). Daha sonra Re vd. tarafından yöntem geliştirilerek $ABTS^{\cdot+}$ eldesi için ABTS ve potasyumpersülfat kullanılmıştır. Böylece tayin yöntemi hem lipofilik hemde hidrofilik antioksidanlara uygulanmıştır. Denklem 2.11 de gerçekleşen reaksiyonlarla $ABTS^{\cdot+}$ elde edilir ve radikalin kendine has rengi ortamda bulunan antioksidanların radikali indirgemesiyle azalır. Renk gideriminin fazla olması andioksidan aktivitenin çokluğu ile eşdeğerdir. Sonuçlar renk açılımı yüzdesi olarak ya da tokaferol/ trolox eşdeğeri olarak verilir (Apak vd., 2007)

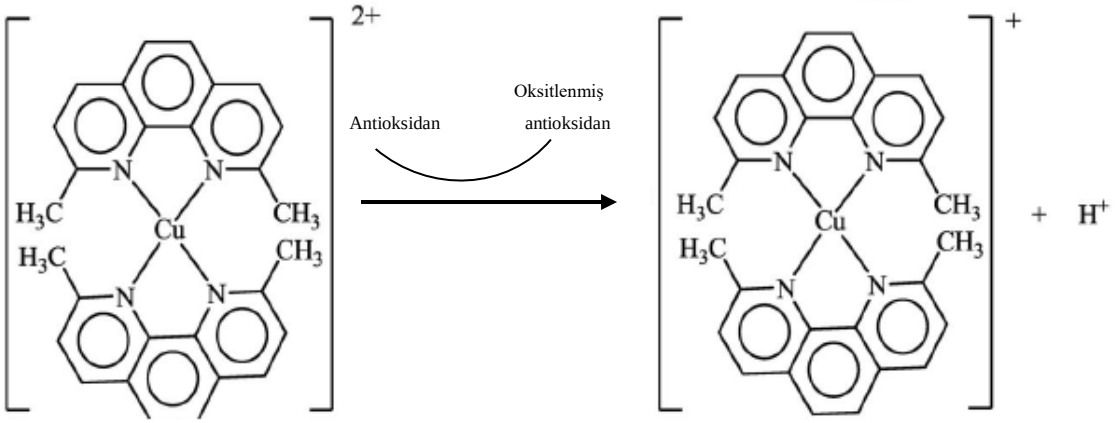
$$ABTS + K_2S_2O_8 \rightarrow K_2S_2O_8 + ABTS^{\cdot} \quad (2.11)$$

$$ABTS^{\cdot}+ + ArOH \rightarrow ABTS + ArO^{\cdot} + H+$$

ABTS yöntemi kolay uygulanması nedeniyle tercih sebebidir. Geniş bir ph aralığında reaksiyonun gerçekleşmesi, $ABTS^{\cdot+}$ hem suda hemde organik çözücülerde çözünebilir olması, iyonik güçten etkilenmemesi ve reaskiyonun kısa bir sürede sonlanması yöntemin avantajlarıdır. Düşük redoks potansiyeline sahip birçok fenolik bileşik $ABTS^{\cdot+}$ ile reaksiyona girebilir. Bu nedenle antioksidan aktivite çalışmalarında sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir (Prior vd., 2005).

2.3.2.3. Cu (II) kullanılan toplam antioksidan kapasite yöntemi (CUPRAC)

CUPRAC yöntemi, antioksidanlar tarafından Cu(II)'nin Cu(I)'e indirgenmesi temeline dayanır (Şekil 2.11.). Cu(II) klorür çözeltisi, neokuproin çözeltisi ve amonyum asetat (pH= 7 tamponu) çözeltileri karıştırıldıktan sonra, ortamda bulunan antioksidan Cu(II)'nin Cu(I) e indirgenir ve 450 nm'de absorbanslar değerlendirilir (Apak vd., 2013)

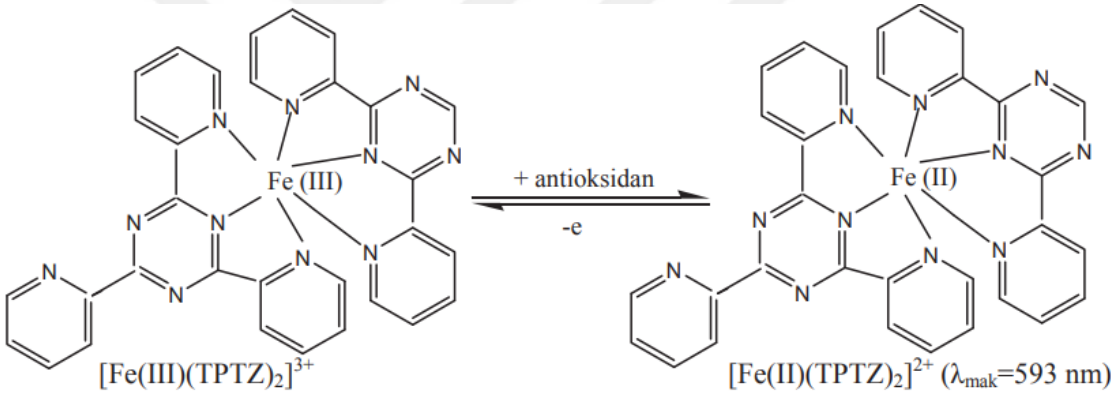


Şekil 2.11. CUPRAC reaksiyonu şeması

Cu(II)- reaktifi kullanılarak plazma antioksidanları, flavonoidler, gıda polifenolleri, C vitamini ve E vitamini için amtioksidan aktivite tayini yapılabilir. Kararlı, ucuz, kolay ulaşılabilen bir rektiftir. Hidrofilik ve lipofilik antioksidanların tayininde kullanılır (Apak vd., 2013) .

2.3.2.4. Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan güç yöntemi (FRAP)

Yöntem temel olarak demirin indirgeme gücüne dayanmaktadır. Burada Fe(III) tuzu, Fe(III)(TPTZ)2Cl3 (TPTZ=2,4,6- tripiridil s-triazin), oksidan olarak kullanılır. Düşük pH da ferrik-tripiridiltriazin (Fe^{III}-TPTZ) komplexindeki demir antioksidanlar tarafından ferrus demire (Fe^{II}) indirgendiğinde 593 nm'de maksimum bir absorpsiyona sahip yoğun bir mavi renk gelişmektedir (Şekil 2.12.). Renk ne kadar çok ise antioksidan aktivite de o kadar yüksektir. Hidrofilik ve lipofilik antioksidanların tayini için uygun bir yöntemdir. Basitliği ve ucuzluğu sebebiyle tercih edilebilir. Ancak reaksiyon spesifik değildir ve Fe^{III} / Fe^{II}-TPTZ yarım reaksiyonundan daha düşük pozitif redoks potansiyeline sahip herhangi bir tepkime reaksiyonu Fe ^{III}-TPTZ indirgenmesini etkilemektedir (Benzie ve Strain, 1996).



Şekil 2.12. Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan güç

2.3.2.5. Redükleyici güç

Redükleyici güç deneyi 1986 yılında Oyaizu tarafından tasarlanmıştır ve antioksidan maddenin elektron donörü olarak hareket etme yeteğini ölçmektedir (Berker vd., 2010). Enzimatik ve şelatlayıcı olmayan antioksidanların toplam antioksidan kapasitesi Fe (III)'ün Fe (II) e indirgenmesiyle, indirgenme bileşiği olan ferrik ferrosiyanidinin prussian mavisi renginin spektrofotometrik tayini ile gerçekleşir. Yüksek absorbans yüksek antioksidan aktivite anlamına gelmektedir (Zohri ve El Ghani, 2017).

2.3.2.6. Metal şelatlayıcı antioksidan aktivite

Geçiş metalleri arasında demir, yüksek reaktivitesi nedeniyle en önemli lipit oksidasyonu prooksidanıdır. Demirin ferrus formu, hidrojen peroksiti ve lipit peroksitleri fenton reaksiyonu (Denklem 2.12) yoluyla reaktif serbest radikallere ayırarak lipit oksidasyonunu hızlandırır (Gülçin, 2005).

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet} \qquad (2.12)$$

Bu nedenle ferrus iyonunun ortamdan uzaklaştırılması önemlidir. Metal şelatlayıcı antioksidan aktivite yöntemi ferrus iyonu ile ferrozin maddesinin oluşturduğu kompleksin kırmızı renginin giderimine bağlıdır. Ortamda antioksidan maddeler varlığında antioksidanlar ile ferrozin, ferrus iyonu bağlamak için yarışırlar. Antioksidan madde miktarı ile orantılı olarak ferrus/ferrozin komplexi rengi oluşmaz. 700 nm'de kırmızı rengin absorbansı ne kadar düşük ise antioksidan aktivite o kadar fazladır. Metal iyonu şelatlama kapasitesi, lipitleri katalize eden geçiş metali konsantrasyonunu azalttığı için önemlidir. Sonuçlar şelatlama kapasitesi yüksekliği ile bilinen EDTA ile karşılaştırılır ve kırmızı renkte meydana gelen değişim % giderim olarak hesaplanır. (Mohan vd., 2012)

2.3.2.7. Lipid peroksidasyon ürünlerinin ölçülmesi

Liptitler serbest radikaller tarafından en çok zarar verilen yapılardır. Hücre içerisinde meydana gelen radikaller ilk olarak hücre ve organel zar yapılarına zarar verirler ve bu durum hücre için ölümcül olabilir. Ayrıca endüstriyel proseslerde yağların veya gıdaların uzun süre korunması, raf ömrünün artması yine içerdikleri yağların korunması ile olur. Bu nedenle antioksidan maddelerin lipit peroksidasyonunu önleme kabiliyetlerini ölçmek oldukça önemlidir. Lipit peroksidasyon ürünlerini ölçen iki farklı yöntem bulunmaktadır. Bunlardan ilki Ferriktiyosiyanat yöntemi (FTC) ile lipit peroksidasyonu inhibisyonu, diğeri Tiyobarbiturik asit yöntem (TBA) ile lipit peroksidasyonudur. Lipit peroksidasyonu kendi kendini besleyen ve birden fazla reaskiyondan oluşan bir sistemdir. Bu nedenle reaksiyon süresince birden fazla ürün ya da substrat oluşup yıkılmaktadır. FTC yöntemi bu reaksiyonların erken aşamalarındaki antioksidan aktiviteyi ölçerken, TBA reaksiyonun son aşamalarında oluşan maddeleri ölçmektedir.

Ferrik tiyosiyanat yönteminde lipit peroksidasyonu süresince Fe^{2+} - $Fe^{3'}$ e oksitlenmektedir. Oluşan Fe^{3} SCN^{-} ile ferriktiyosiyanat kompleksi oluşturur. Oluşan kompleksin kırmızı rengi 500 nmde okunur. Düşük absorbans düşük peroksidasyon ve yüksek antioksidan aktivite demektir (Dimitrova vd., 2010)

TBA yöntemi, daha sonraki bir aşamada peroksitlerden ayrıştırılan karbonil bileşiklerinin üretiminin inhibisyonunu ya da aldehit ve keton gibi peroksit oksidasyonunun ikinci ürününü ölçmek amacıyla kullanılmaktadır.

2.3.2.8. Toplam fenolik madde tayin yöntemi

Bu yöntem; Singleton ve arkadaşları tarafından antioksidanların toplam fenol miktarını ölçmek için geliştirilmiştir (Lussignoli vd., 1999). Folin ayıracı kullanılarak yapılan yöntemin temeli kısaca fenolik bileşikler ve diğer indirgeyici bileşiklerden molibdenyum'a elektron transfer edilmesine dayanmaktadır. Başlangıçta sarı olan reaktif ortama antioksidan madde gelmesiyle indirgenerek mavi renge donuşur (Denklem 2.13). 750-765 nm'de absorbans ne kadar yüksek ise fenolik içerik o kadar fazladır. Sonuçlar genellikle gallik asit eşdeğeri olrak verilmektedir.

$$Mo(VI)\ (sarı) + e^{-}\ (antioksidan\ maddeden) \rightarrow Mo(V)\ (mavi) \qquad (2.13)$$

2.3.2.9. Toplam flavonoid içerik

Total flavonoid içerik tayini alümiyum klorür içeren kalorimetrik method ile yapılmaktadır. $AlCl_3$'ün C-4 keto grupları ve C-3 veya C-5 hidroksil grubu flavonlar ve flavonoller ile asit stabil kompleksleri oluşturmaktadır. Ayrıca flavonoidlerin A veya B halkasında ortodihidroksil gruplarıyla asit kararsız kompleksler oluştururlar. Oluşan stabil komplexler 415 nm de spektrofotometrik olrak değerlendirilmektedir. Yüksek absorbans yüksek flavonoid içerik anlamına gelir ve elde edilen değerler kuersetin ya da rutin eş değeri olarak sunulmaktadır. (Bag vd., 2015)

2.4. Mantarların Antioksidan Özellikleri

Dengesiz bir metabolizmanın ve aşırı reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu oksidatif stres, metabolik hastalık, kalp hastalığı, Alzheimer ve Parkinson gibi ciddi nöral bozukluklar, erken yaşlanma ve bazı kanserler gibi bir dizi rahatsızlığa yol açar. ROS sadece organizma içinde değil, aynı zamanda ultraviyole ışık, iyonlaştırıcı radyasyon, kemoterapötikler, inflamatuar sitokinler ve çevresel toksinler gibi çeşitli dış kaynaklardan da üretilir. Modern uygarlıkta çevreye toksik kimyasalların solunması kaçınılmaz hale gelmiştir. Bu nedenle organizmanın kendi savunma sisemleri yetersiz kalmaya ve dışarıdan gerek diyet ile gerekse takviye edici terapötikler olarak antioksidanların alınması öne çıkmışır.

Hemen hemen tüm organizmalar oksidatif hasara karşı koruma ve tamir sistemine sahiptir. Ancak, serbest radikal kökenli oksidatif hasarın önlenmesinde vücudun antioksidan savunma sistemi tek başına yeterli olamamaktadır (Simic, 1988; Reis ve ark., 2012). Günümüzde bu amaçla en yaygın kullanılan sentetik bileşikler bütillenmiş hidroksianizol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), propil gallat ve tert-bütilhidrokinon (TBHQ)' dur (Jayakumar ve ark., 2011). Ancak sentetik antioksidanların besinlerde kullanımı, yıkımları sırasında olası toksik, karsinojenik ve karaciğer hasarına neden olan bileşenlerin oluşumu nedeni ile kısıtlanmış durumdadır (Sherwin ve ark., 1990; Arora ve Chandra, 2010). Son yıllarda yenilebilir mantarlar ticari bir antioksidan kaynağı olarak dikkat çekmiştir ve oksidatif stres düzeyini azaltmak için besin takviyesi yoluyla antioksidan savunmaların geliştirilmesinde doğrudan kullanılabililecekleri öne sürülmektedir (Kozarski vd., 2015). Ayrıca birçok yenilemeyen ektomikorizal ya da kültüre alınmış mantarlarında antioksidan aktiviteleri ve aktiviteye neden olan metabolitleri belirlenmeye başlamıştır. Ancak tür sayısının çok olması bilinmeyen ve keşfedilmeye hazır çok fazla potansiyel mantar türü gizlemektedir.

Yapılan çalışmalarda genellikle yenilebilir mantar türleri seçilmiş olması, günlük diyetimizde mantaların önemine dikkat çekmiştir. Kimatu vd., 2017 yılında yaptıkları çalışmada kültür mantarı olarak bilinen *Agaricus bisporus* ekstraktı ile çalışmış ve DPPH radikal süpürücü aktivitesi EC_{50} 0.25 mg/ml bulmuştur. Diğer bir yenilebilir mantar türü *Pleurotus citrinopileatus* Yıldız vd. (2017) tarafından çalışılmış ve EC_{50} 6,48 mg/ml dir.

Ancak doğrudan mantarın kendisiyle çalışmak herzaman aynı sonucu vemeyebilir. Çünkü çevresel etkiler sekonder metabolit mekanizmasını etkilediğinden elde edilen sonuçlar farklılık gösterecektir. Günlük diyette tüketim için antioksidan aktivite değerlerinin farklılığı pek önemli olmasada endüstiriyel prosesler için önem arz etmektedir. Mantarlar kültür koşulları iyi optimize edildiğinde endüstriyel proseslere uygun organizmalardır. Düşük maliyetler ile organizmadan yüksek verim almak mümkün olabilmektedir.

Doğal antioksidan kaynağı olarak makrofungusların antioksidan aktivitelerinden asıl olarak fenolik bileşikler, tokoferol, askorbik asit, karotenoidler sorumludur (Ferreira ve ark., 2009). Ancak son zamanlarda yapılan bazı çalışmlarla ergosterolünde antioksidan aktivite kaynağı olabileceği düşünülmektedir Bunların dışında mantarlar selenyum gibi diğer antioksidan kaynaklarınıda içerirdikleri bilinmektedir.(Ruiz Rodriguez vd., 2009).

Mantar ekstrelerinin antioksidan aktivitesinin muhtemel mekanizması hidrojen bağlama kapasitesi ve peroksidaz radikallerinin oksidasyonu yoluyla meydana gelmektedir (Eroğan vd., 2017).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Makrofungus izolatları

Çalışmada ülkemizin farklı illerinden toplanan makrofungus örneklerinden izole edilen ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Basidiomycetes Kültür Koleksiyonu (OBCC)'bünyesinde korunan makrofungus izolatlarından bir kısmı kullanılmıştır. Stok kültürlerin devamlılığı Potato Dekstroz Agar (PDA) ortamında +4 ºC' de saklanarak sağlanmıştır. Yüksek antioksidan aktivite gösteren izolatların belirlenmesi amacıyla çizelge 3.1 de belirtilen izolatlar kulanılmıştır. Çalışmanın her aşamasından önce stok kültürler katı ortamda PDA besiyerinde 27 ºC de inkübe edilerek aktiflenmiştir.

Çizelge 3.1. Tarama çalışmasında kullanılan fungus izolatları

OBCC Kodu	Takson adı	OBCC Kodu	Takson adı
2	*Ganoderma sp.*	30	*Polyporus arcularius*
3	*Suillus bovinus*	31	*Polyporus arcularius*
4	*Tricholoma equestre*	32	*Polyporus arcularius*
5	*Tanımlanmamış izolat*	33	*Polyporus arcularius*
9	*Polyporus arcularius*	34	*Polyporus arcularius*
17	Tanımlanmamış izolat	36	*Hypholoma fasciculare*
19	*Gloeophyllum sepiarium*	37	Tanımlanmamış izolat
21	Tanımlanmamış izolat	38	Tanımlanmamış izolat
23	*Pycnoporus cinnabarius*	39	Tanımlanmamış izolat
24	*Macrolepiota procera*	40	Tanımlanmamış izolat
25	*Trametes versicolor*	51	Tanımlanmamış izolat
26	Tanımlanmamış izolat	1002	*Leucoagaricus pudicus*
27	Tanımlanmamış izolat	1004	*Ganoderma carnosum*
28	*Macrolepiota procera*	1005	*Suillus collitinus*

Çizelge 3.1. Tarama çalışmasında kullanılan fungus izolatları (devam).

OBCC Kodu	Takson adı	OBCC Kodu	Takson adı
1006	*Trametes versicolor*	1078	Tanımlanmamış izolat
1008	*Antrodia serialis*	1079	Tanımlanmamış izolat
1010	*Ganoderma applanatum*	1080	Tanımlanmamış izolat
1014	*Coprinus comatus*	1084	Tanımlanmamış izolat
1015	*Pleurotus ostreatus*	1085	Tanımlanmamış izolat
1021	*Pleurotus ostreatus*	1086	Tanımlanmamış izolat
1023	*Schizophyllum commune*	1087	Tanımlanmamış izolat
1025	*Schizophyllum commune*	1088	Tanımlanmamış izolat
1026	*Inonotus hispidus*	1089	Tanımlanmamış izolat
1031	*Pleurotus ostreatus*	1092	Tanımlanmamış izolat
1033	Tanımlanmamış izolat	1095	Tanımlanmamış izolat
1035	*Fistulina hepatica*	1097	Tanımlanmamış izolat
1038	Tanımlanmamış izolat	1098	Tanımlanmamış izolat
1040	*Laetiporus sulphureus*	1099	Tanımlanmamış izolat
1043	Tanımlanmamış izolat	1110	Tanımlanmamış izolat
1046	Tanımlanmamış izolat	1120	Tanımlanmamış izolat
1047	Tanımlanmamış izolat	1121	Tanımlanmamış izolat
1048	Tanımlanmamış izolat	1128	Tanımlanmamış izolat
1049	Tanımlanmamış izolat	1136	Tanımlanmamış izolat
1050	Tanımlanmamış izolat	1137	Tanımlanmamış izolat
1056	Tanımlanmamış izolat	1506	Tanımlanmamış izolat
1057	Tanımlanmamış izolat	1508	Tanımlanmamış izolat
1058	Tanımlanmamış izolat	1509	Tanımlanmamış izolat
1059	Tanımlanmamış izolat	2001	*Lenzites betulina*
1060	Tanımlanmamış izolat	2002	Omphalotus olearius
1067	Tanımlanmamış izolat	2003	Tanımlanmamış izolat
1070	Tanımlanmamış izolat	2004	Tanımlanmamış izolat
1071	Tanımlanmamış izolat	2503	*Omphalatus illudens*
1072	Tanımlanmamış izolat	2517	*Daedalea quercina*

Çizelge 3.1. Tarama çalışmasında kullanılan fungus izolatları (devam).

OBCC Kodu	Takson adı	OBCC Kodu	Takson adı
1075	Tanımlanmamış izolat	2523	Tanımlanmamış izolat
2524	Tanımlanmamış izolat	5016	*Tanımlanmamış izolat*
2525	Tanımlanmamış izolat	5022	*Trametes versicolor*
3001	*Trametes versicolor*	5028	Tanımlanmamış izolat
3003	Tanımlanmamış izolat	5040	Tanımlanmamış izolat
3008	Tanımlanmamış izolat	5041	Tanımlanmamış izolat
3009	Tanımlanmamış izolat	5046	Tanımlanmamış izolat
3504	Tanımlanmamış izolat	5049	Tanımlanmamış izolat
3505	Tanımlanmamış izolat	5050	Tanımlanmamış izolat
5002	*Trametes versicolor*	5051	Tanımlanmamış izolat
5004	*Lentinus strigosus*	5052	Tanımlanmamış izolat
5006	*Trametes pubescens*	5054	Tanımlanmamış izolat
5507	Tanımlanmamış izolat	5058	Tanımlanmamış izolat
5008	*Ganoderma lucidum*	5059	Tanımlanmamış izolat
5009	*Inonotus hispidus*	5060	Tanımlanmamış izolat
5010	*Schizophyllum commune*	5063	Tanımlanmamış izolat
5011	Tanımlanmamış izolat	5066	Tanımlanmamış izolat
5014	*Trametes hirsuta*	5501	Tanımlanmamış izolat
5015	*Paxillus involutus*	6008	Tanımlanmamış izolat

3.1.2. Besiyerleri

Çalışma boyunca kullanılan tüm besiyerleri; besiyeri içeriğinin distile suda çözülüp otoklavda 1.2 atm basınç altında 121 ^{o}C sıcaklıkta ve 15 dakika steril edilerek hazırlanmıştır. Patates Dekstroz Agar (PDA) besi yeri stok kültür halinde korunan fungus izolatların üretilmesinde, Czapek Dox's Broth-1, Czapek Dox's Broth-2 Hagem Patates Malt Pepton Ortamı (PMP) makrofungus kültür sıvılarından antioksidan aktivite belirlenme aşamasında besiyeri optimizasyon çalışması için kullanılmıştır.

Besiyeri 1: Patates Dekstroz Agar (PDA)

Ticari hazır besiyerinden (Merck) 39 g/l oranında tartılarak hazırlanmıştır.

Besiyeri 2: Czapek Dox's Broth-1

Sukroz	30,00 g
$NaNO_3$	0,50 g
KH_2PO_4	0,50 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,50 g
KCl	0,50 g
$FeSO_4$	0,10 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri 3: Czapek Dox's Broth-2 (g/L)

Sukroz	30,00 g
Yeast ekstrakt	1,00 g
Polipepton	1,00 g
KH_2PO_4	1,00 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,50 g
KCl	0,50 g
$FeSO_47\ H_20$	0,01 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri 4: HAGEM (g/L)

Malt ekstrakt	4,00 g
Yeast ekstrakt	1,00 g
Glukoz	5,00 g
KH_2PO_4	0,50 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,50 g
NH_4Cl	0,50 g
$FeCl_3$ (1% sulu solüsyon)	0,50 g
Tiamin (1 mg/ml sulu solüsyon)	100 µl
Distile su	1000 ml

Besiyeri 5: Patates Malt Pepton Ortamı (PMP) (g/L)

Malt Ekstrakt	10,00 g
Pepton	1,00 g
Patates Dekstroz Broth	24,00 g

3.1.3. Kimyasal maddeler, çözeltiler ve cihazlar

Çalışmada, başlıca vortex (Velp Scientifica $2x^3$), spektrofotometre (Shimadzu UV-2450 UV-VIS Spectrophotometer), çalkamalı inkübatör (Invova 44 New Brunswick Scientific), pH-metre (Eutech Instruments Ion 510), analitik terazi (Ohaus corp), santrifüj (Hettich Zentrifugen UNIVESAL 320), liyofilizatör (Christ ALPHA 2-4 LD plus Velp Scienstifica), Steril kabin (Thermo Electron Corporation Hera Safe), ısıtıcı ve manyetik karıştırıcı (Heidolph MR Hei-Tec D-91126 Schwabach), dağıtıcı ve mikro pipetler (Eppendorf Multipette Plus, Eppendorf Research Pl) gibi ekipmanlar kullanılmıştır. Çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve kullanım alanları Çizelge 3.2' te belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve kullanım alanları

Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	Kullanım Amacı
%0,005 DPPH çözeltisi Metanol	Radikal süpürücü antioksidan aktivite tayini
Folin-Ciocalteu Reaktifi % 2'lik Na_2CO_3 çözeltisi	Total fenolik içeriğin belirlenmesi
ABTS $K_2S_2O_8$ % 1'lik $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisi % 10'luk TCA çözeltisi	ABTS radikal katyonu giderici aktivite
% 0.1'lik $FeCl_3$ çözeltisi 2 mM $FeCl_2$ çözeltisi 5 mM Ferrozin çözeltisi	Demir (II) iyonlarını şelatlama aktivitesinin tayini

Çizelge 3.3 Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve kullanım alanları (devam).

Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	Kullanım Amacı
$AlCl_3$ Rutin	Total Flavonoid Tayini
H_2O_2	Hidrojen peroksit radikali giderici aktivite tayini
0.4 M Fosfat tamponu 0.2 M fosfat tamponu (pH=6.6)	pH tamponu
Linoleik asit emülsiyonu Tiyobarbiturik asit çözeltisi % 30'luk NH_4SCN çözeltisi	Lipit peroksidasyonu

3.2. Yöntem

3.2.1. DPPH yöntemi ile yüksek antioksidan aktiviteye sahip makrofungus izolatı ve yaşam formunun seçilmesi

Yüksek antioksidan aktiviteye sahip izolatların seçimi amacıyla kültür koleksiyonumuzda bulunan 132 fungus izolatı antioksidan aktivite bakımından karşılaştırılmıştır. Bu amaçla öncelikle kullanılacak koşul ve yöntemlerin standardize ve optimize edilmesinin alınacak sonucun güvenilirliğini arttıracağı varsayımı ile;

a. Difenil-1-pikrihidrazil (DPPH) radikali süpürücü aktivite tayini yöntemi
b. Makrofungus izolatlarının üretileceği kültür tipi ve besiyeri
c. Makrofungus hücre kitlesinin ekstraksiyon yöntemi optimize edilmiştir.

3.2.1.1. DPPH radikali süpürücü aktivite tayini yöntemi optimizasyonu

İzolat sayısının fazla olması nedeniyle antioksidan aktivite yöntemleri arasında hem hızlı hem de kolay sonuç alınabilecek bir yöntem olan DPPH radikali süpürücü aktivite yöntemi tercih edilmiştir. DPPH radikal süpürücü aktivite tayini spektrofotometrik olarak Zhao vd. (2006) tarafından önerilen yönteme göre gerçekleştirilmiştir.

İlk olarak DPPH metanol de çözülerek mor renkli çözelti hazırlamıştır. Toplam reaksiyon hacmi 3 ml olacak şekilde DPPH serbest radikali ile kültür sıvısı/hücre kitlesi ekstraktı belli oranda karıştırıldıktan sonra şiddetlice karıştırılmıştır. Ardından karanlık, ışık almayan bir ortamda 30 dakika inkübe edilmiştir. Methanol-kültür sıvısı/ methanol-çözücüden oluşan köre karşı 517 nm de spektrofotometrik olarak okunmuştur.
Pozitif kontrol olarak BHT (Butylated hydroxytoluene) ve askorbik asit kullanımı ile makrofungusların radikal süpürücü aktiviteleri Denklem 3.1. aracılığı ile hesaplanmıştır:

$$\text{Süpürücü Aktivite (\%)} = \{ (A_{KÖR} - A_{ÖRNEK}) / A_{KÖR} \} \times 100 \qquad (3.1)$$

$A_{KÖR}$: DPPH serbest radikalinin metanol körüne karşı okunmasıyla elde edilen absorbans.
$A_{ÖRNEK}$: Kültür sıvısı/hücre kitlesi ekstraktı 'nın metanol-kültür sıvısı/ metanol -çözücü körüne karşı okunmasıyla elde edilen absorbans

Literatür incelemelerinde DPPH radikali süpürücü aktivite tayini yapılırken farklı reaksiyon karışımındaki bileşenlerin farklı oranda kullanıldığı belirlenmiştir. Reaksiyon karışımında kültür sıvısının miktarı değiştikçe antioksidan aktivite de değişmiştir. Bu nedenle seçilecek organizmaların antioksidan aktivitesinin gerçek anlamda yüksek olduğundan emin olmak amacıyla tarama çalışmasından önce bir yöntem optimizasyonu gerçekleştirmiştir. Bu amaçla öncelikle rastgele 3 fungus örneği seçilerek PDA ortamında 30 ^{o}C'de 7 gün inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Fungal koloninin aktif büyüyen dış sınırlarından elde edilen 5 mm çapındaki misel diskleri, PMP besiyerine inoküle edilmiştir. 10 gün sonunda hücre kitlesi kültür sıvısından ayrılıp kültür sıvısı daha sonra yapılacak deneyler için kullanılmıştır. Kültür sıvısının toplam reaksiyon karışımındaki oranı % 3.3 ile % 50 olacak şekilde 15 farklı reaksiyon karışımı tasarlamış ve bu karışımların antioksidan aktivitelerini belirlemiştir.(Çizelge 3.4.)

Çizelge 3.4. Kültür sıvısı miktarının DPPH radikal süpürücü madde miktarına oranı

Kültür sıvısı (ml)	DPPH miktarı (ml)
0,1	2,9
0,2	2,8
0,3	2,7
0,4	2,6
0,5	2.5
0,6	2,4
0,7	2,3
0,8	2,2
0,9	2,1
1	2
1,1	1,9
1,2	1,8
1,3	1,7
1,4	1,6
1,5	1,5

3.2.1.2. Makrofungus izolatlarının üretileceği kültür tipi ve besiyerinin seçilmesi

Makrofunguslar ile yapılan antioksidan aktivite çalışmalarında sıklıkla kültür sıvıları kullanılmasına rağmen kültür tipi ve besiyerleri açısından bir standardizasyon yoktur. Farklı kültür tiplerinde farklı besiyerlerinin kullanımı, elde edilen sonuçların birbiri ile karşılaştırılması açısından zorluk yaratmaktadır. Özellikle karşılaştırma ve seçim amacı içeren tarama çalışmalarında bu parametrelerin standardize edilmesi daha da önemli hale gelmektedir. Bu nedenle antioksidan aktiviteyi indükleyen besi yeri ve kültür tipi seçilmesi için aktivite belirleme çalışmalarından önce bir ön çalışma yapılmıştır.

Bu ön çalışma için yapılan literatür taraması sonucu makrofunguslardan antioksidan aktiviteden sorumlu metabolitlerin üretimi amacı ile derin (Lung ve Huang, 2013; Tripathi ve vd.., 2013) ve statik (Arora ve Chandra, 2011) kültür tipleri tercih edilmiştir. Besiyeri olarak da Czapek Dox's Broth 1 ve 2 (Arora ve Chandra, 2010; Malpure ve vd.. 2006) ve HAGEM (Kalyoncu ve vd., 2010) gibi besiyerleri kullanılmaya karar verilmiştir. Böylece tarama çalışmasında hangi besiyeri ve hangi kültür tipinin kullanılacağı belirlenmiştir.

Test organizması olarak stok kültür koleksiyonundan rastgele 4 izolat seçilmiş (OBCC 0034, OBCC 1072, OBCC 5014 ve OBCC 5028) ve derin ve statik kültür tipinde ve yukarıda anılan 4 farklı besiyerinde üretilmişlerdir. Derin kültürde üretilen izolatlar 25 ^{o}C 150 rpm çalkalama hızında 10 gün boyunca inkübe edilmiştir. Statik kültürler de 25 ^{o}C de iklimlendirme sistemine sahip odada inkübe edilmiş ve yüzeyde film oluşumunun engellenmesi amacıyla günde bir kere hafifçe çalkalanmıştır. 10 günlük inkübasyon süresi sonunda kültür sıvısı Whartmann NO.1 filtre kâğıdı ile süzülerek hücre kitlesi kültür sıvısından ayrılmıştır. Daha sonran 10 dakika boyunca 4 ^{0}C de 10.000 rpm de santrifüjlenmiştir. Ön çalışma sonucu seçilen DPPH reaksiyon karışımı kullanılarak antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Tüm çalışmalar üç paralel olarak gerçekleştirilmiş olup çalışma sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizi iki ve üç yönlü varyans analizi ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.3. Makrofungus hücre kitlesinin ekstraksiyon yönteminin seçilmesi

Makrofungus izolatlarının hücre kitleleri, önceki aşamalarda seçilen besiyeri ve kültür koşullarında inkübe edilen kültürlerin filtrasyon, santrifüj ve liyofilizasyonu ile elde edilmiştir. Hücre kitlerlerine ait antioksidan aktivite tayininin yapılabilmesi için hazırlanan liyofilize makrofungus hücre kitlesinin (misellerinin) ekstraksiyonu gereklidir.

Bu nedenle maserasyon, mikrodalga, ultrases ekstraksiyon yöntemleri temsilci olarak seçilen beş fungus izolatı (OBCC 1128, 2002, 2003, 5501 ve 5502) kullanılarak etkinlik bakımından karışlaştırılmıştır.

Maserasyon ile ekstraksiyon; liyofilize misel ile çözücü (etilasetat) 1: 100 (w/v) oranında muamele edilmiş ve çözelti 50 °C de 150 rpm hızda çalkalanarak 24 saat süreyle ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir (Vamanu ve Nita, 2013).

Mikrodalga ile ekstraksiyon; ev tipi mikrodalga (Vestel MD23 2450 MHz) kullanılarak yapılmıştır. Çözücü ve liyofilize misel yukarıda bahsedilen oranlarda hazırlanmış 1. kademede iç sıcaklık 50 °C olacak şekilde 3 dakika muamele edilmiştir (Jorge ve vd.. 2014).

Ultrases uygulaması için ultrasonik banyo kullanılmıştır. Çözücü ve liyofilize misel yukarıda bahsedildiği gibi hazırlanmış 50 °C de 3 dakika muamele edilmiştir (Wang ve vd.., 2013).

Ekstraksiyon yöntem seçim çalışması sonunda istatiksel analiz verilerine göre yöntemler antioksidan aktivite bakımından karşılaştırıldığında en yüksek aktivitelerin görüldüğü ekstraksiyon yöntemi sonraki çalışmalar için seçilmiştir. Hücre kitleleri seçilen yöntem ile ekstrakte edildikten sonra filtre kâğıdı ile süzülmüştür. Daha sonra 9000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatantlar ayrılmış ve reaksiyon karışımı 0,1 süpernatant / 2,9 DPPH olacak şekilde DPPH radikal süpürücü aktivite yöntemi ile aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.2. DPPH yöntemi ile yüksek antioksidan aktiviteye sahip fungus izolatı ve yaşam formunun seçilmesi

Önceki başlık kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar ile DPPH radikali süpürücü aktivite tayini yöntemi, makrofungus izolatlarının üretileceği kültür tipi ve besiyeri ve makrofungus hücre kitlesinin ekstraksiyon yöntemi optimize edildikten sonra, kültür koleksiyonumuzda bulunan 132 fungus izolatı DPPH radikali süpürücü aktivite ve fenolik madde içerikleri yönünden karşılaştırılmıştır. Kültür sıvısı ve hücre kitleleri ile yapılan çalışmalar sonucu aktivite bakımından yüksek bulunan bir fungus izolatı daha sonraki antioksidan aktivite çalışmaları için seçilmiştir. Bu aşamadan sonra yapılan çalışmalar sadece yüksek aktivitesi ile seçilen fungus izolatı ile sürdürülmüştür.

3.2.3. Seçilen kültür sıvısı ekstraktının zamana bağlı antioksidan aktivitesi

Bu aşamada yüksek antioksidan aktivitesi nedeni ile seçilen fungus izolatının kültür sıvısına ait antioksidan aktivitelerinin güne bağlı değişimi sorgulanmıştır. Bu amaçla kültür sıvılarından periyodik örnek alınarak DPPH radikal süpürücü aktiviteleri ve toplam fenolik asit miktarları 20 gün boyunca izlenmiştir.

3.2.4. Seçilen makrofungus izolatının antioksidan aktivite potansiyelinin sorgulanması

DPPH radikal süpürücü antioksidan aktivite ile yapılan tarama çalışması sonrası seçilen makrofungus izolatı optimum kültürel koşullarda yeniden üretilmiştir. Makrofungus izolatı PDA ortamında 30 ^{o}C'de 7 gün inkübe edilerek aktifleştirilmiş ve fungal koloni misel diskleri, PMP besiyerine inoküle edilmiştir. 10 gün sonunda hücre kitlesi kültür sıvısından süzülerek ayrılmıştır. Kültür sıvısı 3:1 oranında etilasetat ile ekstrakte edilmiştir. Etilasetat rotary evaporatörde uçurulduktan sonra elde edilen ekstrakt, seçilen izolatın antioksidan aktivitesinin farklı yöntemler ile sorgulanması amacıyla kullanılmıştır.

3.2.4.1. DPPH radikal süpürücü antioksidan aktivite yöntemi

Fungal ekstraktın konsantrasyon serisi hazırlanarak her birinin difenil-1-pikrihidrazil (DPPH) süpürücü aktivite tayini yapılmıştır. Farklı derişimlerle ölçülen absorbanslarla lineer regresyon grafiği çizilmiştir ve y= ax+b denkleminde DPPH derişimini yarıya düşüren örnek miktarı µg/mL cinsinden bulunarak EC50 değeri hesaplanmıştır.

3.2.4.2. Beta karoten – linoleik asit yöntemi ile toplam antioksidan aktivite tayini

Bu yöntem, linoleik asit oksidasyonundan kaynaklanan uçucu organik bileşiklerin ve konjuge dien hidroperoksitlerin inhibisyonunun spektrofotomektrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır (Dündar vd., 2012).

Reaktif emülsiyonun hazırlanması amacı ile β- karoten, kloroformda çözülmüş ve üzerine lineolik asit ve tween 80 ilave edilmiştir. Kloroform oda sıcaklığında 15 dakika bekleyerek uçurulmuş ve 50 ml oksijenlenmiş su karışıma eklenmiştir. Kontrol çözeltisi içinde aynı işlemleri tekrarlanmıştır. Fungal ekstrakt üzerine emülsiyon eklenerek 50 C'de su banyosunda inkübasyona bırakılmış ve 470 nm de 20 dakika aralıklarla 2 saat ölçüm yapılmıştır. β- karoten renginin ağarması aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır (Denklem 3.2 ve 3.3) (Cheung vd., 2003):

$$R=\ln(A/B)/t \qquad (3.2.)$$

Ln: Doğal logaritma
A:Başlangıç absorbansı
B: 20-40-60-80-100-120 dakika sonundaki absorbansı
t: dakika
Total Antioksidan aktivite (AA) aşağıdaki denklem kullanılarak kontrolün yüzde inhibisyonu olarak hesaplanmıştır:

$$AA= ((R_{kontrol}-R_{örnek})/ R_{kontrol})x100 \qquad (3.3.)$$

3.2.4.3. ABTS radikal katyon renksizleştirme yöntemi

$ABTS^{\cdot+}$ radikal katyonu renksizleştirme yöntemi; hidrofilik ve lipofilik bileşenlerin antioksidan aktivitesinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Re vd., (1999) geliştirdiği yönteme göre $ABTS^{\cdot+}$ radikal katyonunun ekstraktaki antioksidanlar tarafından indirgenmesinin 734 nm de ölçümüne dayalıdır. Deneyde potasyum persülfit ile ABTS muamele edilerek mavi-yeşil renkli $ABTS^{\cdot+}$ oluşturulur ve daha sonra fungal ekstrakt $ABTS^{\cdot+}$ çözeltisi ile bir araya getirilerek 5 dakika sonunda 734 nm de köre karşı okunur. $ABTS^{\cdot+}$ radikal katyonundaki renk giderimi Denklem 3.4.' e göre hesaplanmıştır:

$$3.4 \qquad \%\ \text{ABTS radikal katyonu giderimi} = (Ac-As) / Ac\ X\ 100$$

Ac: $ABTS^{\cdot+}$ stok çözeltisinin absorbansı
As: Ekstreyi içeren örnek çözeltinin absorbansı

3.2.4.4. Metal şelatlayıcı aktivite

Metal iyonu şelatlama aktivitesi fungus ekstraktındaki antioksidanların çözeltideki Fe^{2+} iyonlarını bağlayabilmek için ferrozin ile yarışmasına göre değerlendirilmiştir (Orhan ve Üstün 2011). Demir iyonları ferrozin ile bir araya geldiğinde kırmızı renkli ferrozin komplexi oluştururlar. İzolata ait ekstrakta antioksidan aktivite yüksek ise demir iyonunu ferrozinden daha hızlı bağlayarak kırmızı rengin oluşumunu engellerler. Bu renk değişikliği 562 nm de spektrofotometrik olarak değerlendirilir (Sarıkurkcu vd., 2011). Pozitif kontrol olarak iyi bir metal şelatlayıcı olan EDTA kullanılmıştır. Yüzde metal şelatlayıcı aktivite Denklem 3.5.kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Metal Şelatlayıcı Aktivite} = [\ (A_{kontrol}/A_{örnek}\ )]/A_{kontrol\ x}\ 100 \qquad (3.5.)$$

$A_{kontrol}$: Fe^{2+} Ferrozin komplexine ait absorbans değeri
$A_{örnek}$: Ekstrakta ait absorbans değeri

3.2.4.5. Redükleyici güç

Redükleyici güç, bir numunenin bir elektron donörü olarak hareket etme yeteneğini ölçer ve antioksidanların serbest radikallerle reaksiyonlarıyla onları daha kararlı ürünlere dönüştürür ve böylece radikal zincir reaksiyonunu sona erdirir (Zohri vd., 2017). Genel olarak redükleyici güç deneyi ferrik demirin (Fe^{3+}) antioksidanların varlığında ferro demire (Fe^{2+}) indirgenmesine dayanmaktadır (Chang ve vd., 2002). Farklı konsantrasyonda hazırlanan fungal ekstraktlara fosfat tamponu ve potasyum ferrisiyanid (%1) eklenir. 50°C de 20 dakika inkübasyon sırasında ferrisiyanid ferrosiyanide redüklenmesi sağlanmıştır. Daha sonra karışıma trikloroasetik asit (%10) eklenmiş ve 650 g' de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası üst tabaka toplanıp distile su ve $FeCl_3$ (% 0.1) ile karıştırılmıştır. Bu aşamada demirklorür ile ferrisiyanid bir araya gelip ferik ferrosiyanidi oluşturmuştur. Bu bileşiğin kendine ait prussian mavisi rengi vardır. Oluşan bileşiğin absorbansı 700 nm de ölçülmüştür. 700 nm de 0.5 absorbans veren değer EC_{50} değeri olarak belirlenmiştir (Chang ve vd., 2002; Arora ve Chandra, 2010).

3.2.4.6. Ferrik tiyosiyanat yöntemi ile lipit peroksidasyonu (FTC)

Ferrik tiyosiyanat yöntemi, lipit oksidasyonunun ilk ürünü olan, oksidasyonun ilk aşamalarında üretilen peroksit miktarını ölçmektedir (Beyhan ve vd., 2010). Bu metotta in vitro koşullarda linoleik asit oksidasyonu oluşturulur ve oksidasyon sırasında Fe^{2+} iyonları Fe^{3+} iyonlarına yükseltgenir. Ferrik iyon daha sonra amonyum tiyosiyanat ile birleşir ve kırmızı ferrik tiyosiyanat üretilir (Zahin vd., 2009). Belli aralıklara karışımdan alınan örneklerde oluşan kırmızı rengin absorbansı 500 nm spektrofotomektrik olarak değerlendirilmiştir. Peroksit miktarının en yüksek seviyeye ulaştığı saatte lipit peroksidasyon inhibisyonu Denklem 3.6. kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\%\ \text{Lipit peroksidasyonu inhibisyonu: } 100-((Abs_{örnek}/Abs_{kontrol})*100) \qquad (3.6.)$$

$Abs_{örnek}$: Ekstreyi içeren örnek reaksiyon karışımının t dakikadaki absorbansı
$Abs_{kontrol}$: Kontrol çözeltinin t dakikadaki absorbansı

3.2.4.7. Tiyobarbutirik asit yöntemi ile lipit peroksidasyonu

Tiyobarbitürik asit (TBA) yöntemi, lipit peroksidasyonunun ikinci aşamasında üretilen aldehit ve keton ürünlerini ölçmek için kullanılmaktadır. Bu ürünler genel olarak tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri - TBARS olarak bilinmektedirler ve aralarında en tanınanı malonaldehittir. Yüksek sıcaklık ve düşük ph da malonaldehid ve TBA bağlanarak pembe renkli bir bileşik oluştururlar. Ortamda antioksidanlar varlığında lipit peroksidasyon reaksiyonları inihibe edildiğinden malonaldehid ve diğer TBARs oluşamaz ve pembe renk görülemez. Bu nedenle reaksiyon sonunda oluşan rengin spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi antioksidan maddenin etkinliği hakkında bilgi vermektedir. Deneyde ferrik tiyosiyanat yönteminde hazırlanan kontrol ve örnek reaksiyon karışımları kullanılmıştır. Reaksiyon karışımlarına (% 20) trikloroasetik asit ve (%0,67) tiyobarbutirik asit sulu çözeltisi eklenip, 10 dakika boyunca kaynar suda inkübe edildikten sonra 3,000 rpm de 20 dakika santrifüjlenmiştir. Absorbans 532 nm de ölçülmüştür (Kızıl vd. 2008). Antioksidant aktivite Denklem 3.7. kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\%\ \text{İnhibisyon} = [(Abs_0 - Abs_1)/Abs_1 \times 100] \qquad (3.7.)$$

Abs_0 : Kontrol çözeltinin t dakikadaki absorbansı

Abs_1 : Ekstre içeren çözeltinin t dakikadaki absorbansı

3.2.4.8. Total fenolik içerik tayini

Toplam fenolik bileşik miktarları Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak belirlenmiştir (Singleton et al., 1999). Folin-Ciocalteu reaktifi; fosfotungustik ve fosfo molibdik asitlerin karışımından oluşmaktadır ve asitler fenol oksidasyonu sırasında mavi renkli bileşiklere indirgenmektedir. Bu renk değişimi spektrofotometrik olarak 760 nm'de ölçülmüş ve sonuçlar gallik asit eşdeğeri olarak sunulmuştur.

3.2.4.9. Total flavanoid içerik tayini

Total flavonoid içerik tayini Down metodu adı verilen yöntem kullanılarak yapılmıştır. Eşit miktarda ekstrak ve alüminyum klorid ile karıştırılırak distile su ile 25 mL'ye tamamlanmıştır. Çözeltinin absorbansı 60 dakika sonra UV-spektrofotometrede 415 nm'de ölçülmüştür. Sonuçlar rutin eş değeri olarak belirlenmiştir.

3.2.4.10.Makrofungus izolatlarının moleküler yöntemlerle tanılanması

Çalışmanın moleküler yöntemlerle tanımlama kısmındaki tüm deney aşamaları ve elde edilen bulguların değerlendirilmesi aşağıdaki yöntemler kullanılarak Dr. Ayşe Betül Karaduman tarafından gerçekleştirilmiştir.

Fungus izolatlarının moleküler yöntemler ile isimlendirilmesi çalışmaları; DNA izolasyonu, ITS bölgelerinin PZR amplifikasyonu, elde edilen PZR ürünlerinin hizmet alımı ile dizi analizi ve elde edilen dizilerin gen bankasında depolanan veriler ile BLAST kullanılarak karşılaştırılması iş sırasına göre gerçekleştirilmiştir.

Fungus izolatları öncelikle PDB ortamında 30 ˚C' de 100 rpm'de 7 günlük inkübasyon sonunda elde edilen pelletler besiyerinden ayrılarak distile su ile yıkandıktan sonra liyofilize edilmiştir (Christ Alpha). Liyofilize örneklerden CTAB) yöntemi (Murray ve Thompson,1980 ile DNA ekstraksiyonu yapılmıştır.

Elde edilen DNA pelletleri -20 ˚C' de saklanmıştır. Dizi analizi yapılacak olan bölge ITS 1 – ITS 4 evrensel primerleri kullanılarak amplifiye edilmiştir (Martin ve Rygiewicz, 2005). Reaksiyon ürünleri elektroforezde % 1' lik agaroz jel kullanılarak 90 V' ta 40 dk yürütme ile kontrol edilmiştir. PZR ürünleri jel ekstraksiyon kiti kullanılarak elde edilmiş ve saflaştırma sonrası ürün varlığı agaroz (Biomax) jel elektroforezi ile tekrar kontrol edilmiştir. Elde edilen PZR reaksiyon ürününün DNA dizi analizi hizmet alımı biçiminde gerçekleştirilmiş olup, her izolat için analiz sonucunda elde edilen dizi verileri için BLAST analizi yapılmış, veritabanında kayıtlı olan izolatlar ile benzerlik seviyeleri belirlenmiştir. Her izolata ilişkin veriler Mega 7 software aracılığı ile neighbor-joining metodu kullanılarak filogenetik ağaç haline dönüştürülmüştür (Saitou ve Nei, 1987). Çalışılan fungus izolatları geleneksel ve moleküler yöntemlerden elde edilen verilerin birlikte değerlendirilmesi ile isimlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Tarama Çalışmasında Kullanılacak Koşulların Optimizasyonu

4.1.1. DPPH radikali süpürücü aktivite tayini yöntemi optimizasyonu

Kültür koleksiyonumuzda bulunan fungal izolatların antioksidan aktivitelerini karşılaştırarak yüksek aktiviteye sahip olanların seçilebilmesi amacıyla DPPH radikal süpürücü aktivite tayini seçilmiştir. Hızlı, etkin ve güvenilir bir yöntem olan DPPH radikal süpürücü aktivite tayini toplam reaksiyon hacmi optimize edilerek kullanılmıştır. Deney aşamasından önce yapılan literatür çalışmaları göstermiştir ki antioksidan aktivitesi belirlenecek olan kültür sıvısı / hücre ekstraktının toplam reaksiyon karışımındaki oranı çok farklı değerlerde olabilmektedir.

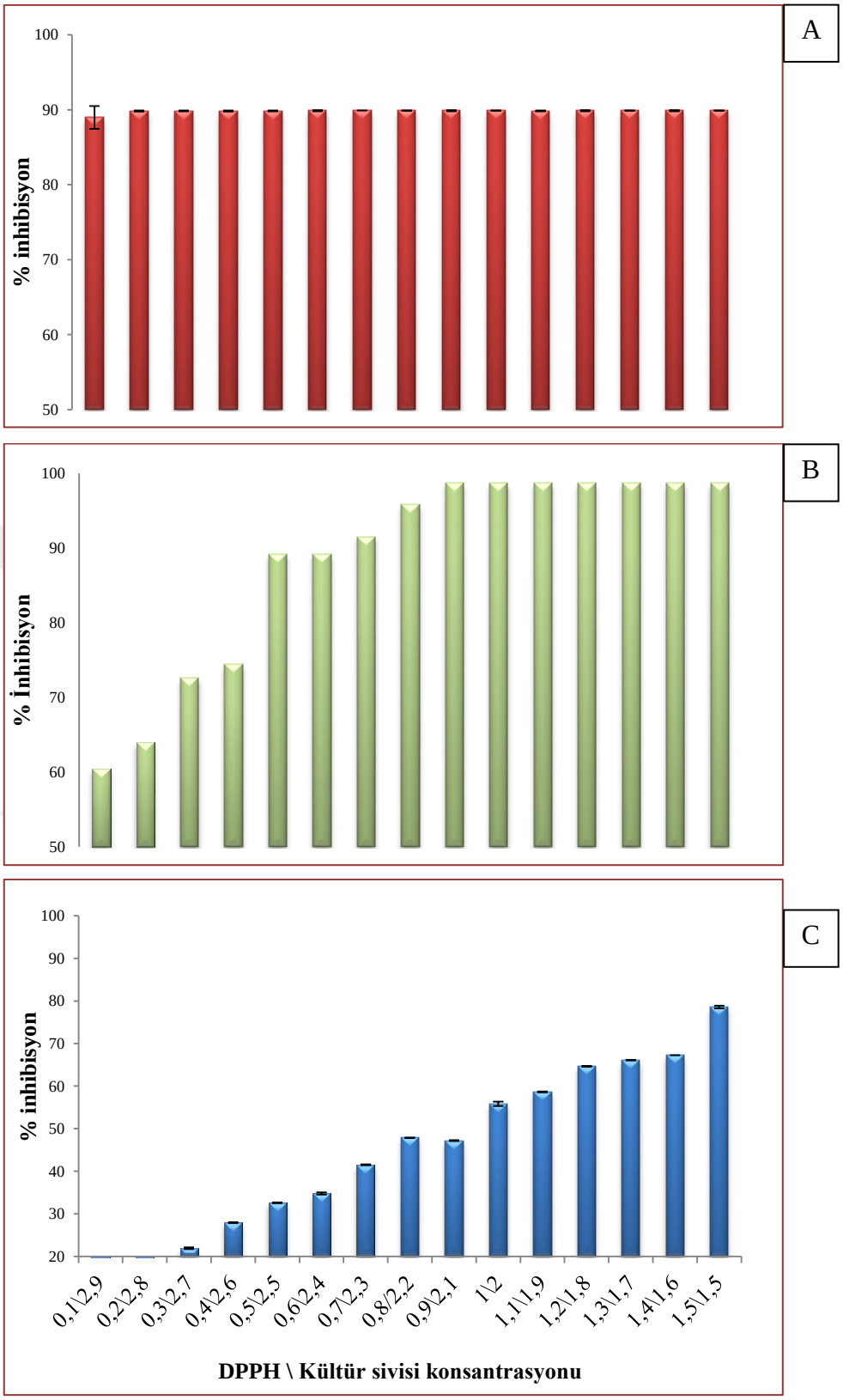
Örneğin Dündar ve arkadaşları (2012) %25 oran ile çalışırken (ekstrakt: DPPH oranı 1: 3) , Tripathi ve Tiwary, (2013) için bu oran % 20 kadardır (ekstrakt: DPPH oranı 1: 4). Orhan ve Üstün (2011) ve Akata vd.., (2012) ise araştırmalarını % 5 (ekstrakt : DPPH oranı 1 : 5) ve % 5 (ekstrakt : DPPH oranı 0.2 : 3.8) olarak gerçekleştirmişlerdir ancak ekstrat miktarları farkıdır. Dulay vd.. (2016) için reaksiyon karışımındaki fungal ekstrakt oranı % 95 (ekstrakt : DPPH oranı 0,1 : 0,05) gibi çok yüksek bir değerdir. . Bu örneklerden de görüldüğü gibi yapılan çalışmalar arasında bir standart olmadığı gibi yöntem uygulanması açısından da farklılıklar mevcuttur. Bu nedenle çalışmalardan elde edilen verilerin birbirleriyle karşılaştırılması mümkün değildir.

Yaptığımız ön çalışmada elde edilen verilerden görüldüğü üzere (Çizelge 4.1., Şekil 4.1.) ekstrakt miktarı toplam hacimde arttıkça % inhibisyonda artmaktadır. Bu durum yalancı yüksek aktivite değerlerinin elde edilmesine neden olmaktadır. Doğru sonuçlara ulaşabilmek adına tek olanak olarak, kullanılan pozitif kontrol(ler) ile karşılaştırmaktır. Bu nedenle reaksiyon hacmi kaynaklı oluşan bilgi karmaşasının önüne geçebilmek ve fungal izolatlar arasından en doğru seçimi yapabilmek adına tarama çalışması öncesi bir optimizasyon çalışması tasarlanmıştır.

Tarama çalışmasında kullanılacak seçiciliği en yüksek reaksiyon karışımının belirlemesi için seçilen 3 fungus örneğinin antioksidan aktivitesi kültür sıvısının toplam reaksiyon karışımındaki oranı 15 farklı reaksiyon karışımı hazırlanarak belirlenmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 4.1. ve Şekil 4.1. de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Üç fungus örneğinde toplam reaksiyon karışımındaki kültür sıvısı miktarının DPPH radikal süpürücü aktiviteye (%) etkisi.

Kültür sıvısı / DPPH miktarı (ml)	İzolata Bağlı DPPH Radikal Giderimi (%)		
	1047	1056	1060
0.1 / 2.9	88.98	60.43	15.84
0.2 / 2.8	89.84	63.98	17.31
0.3 / 2.7	89.86	72.55	21.90
0.4 / 2.6	89.84	74.40	27.90
0.5 / 2.5	89.86	92.49	32.59
0.6 / 2.4	89.88	89.19	34.75
0.7 / 2.3	89.92	91.48	41.50
0.8 / 2.2	89.90	95.85	47.86
0.9 / 2.1	89.88	98.71	47.21
1.0 / 2.0	89.90	98.71	55.82
1.1 / 1.9	89.86	98.71	58.62
1.2 / 1.8	89.88	98.71	64.65
1.3 / 1.7	89.90	98.71	66.11
1.4 / 1.6	89.88	98.71	67.23
1.5 / 1.5	89.90	98.71	78.58



Şekil 4.1. Üç fungus örneğinde toplam reaksiyon karışımındaki kültür sıvısı miktarının DPPH radikal süpürücü aktiviteye (%) etkisi A) OBCC 1047 B)OBCC 1056 C)OBCC 1060

Şekil 4.1.'e göre kültür sıvısı konsantrasyonu arttıkça antioksidan aktivite de artmıştır. Optimizasyon çalışması sonucu elde edilen verilere göre gerçekten yüksek antioksidan aktiviteye sahip fungusların seçilmesi için fungal kültür sıvısı / ekstraktın toplam reaksiyon karışımı içindeki oranının düşük olması gerekmektedir. Konsantrasyon düştükçe izolatların inhibisyon değerleri azalmış ve izolatlar arası aktivite farkı oluşmaya başlamıştır.

Yapılacak tarama çalışmasında amaç izolatları doğru bir şekilde ayrıştırmak ve gerçek yüksek aktivite gösteren izolatları belirlemek olduğundan en düşük konsantrasyon oranı 0,1:2,9 ile çalışmanın devam edilmesine karar verilmiştir. Çizelge 4.1. ve Şekil 4.1. de sunulan veriler, kullanılan en düşük ekstraktın DPPH oranının seçiciliği en yüksek reaksiyon karışımı olduğunu doğrulamaktadır.

4.1.2. Makrofungus izolatlarının üretileceği kültür tipi ve besiyerinin seçilmesi

Antioksidan aktivitenin belirlenmesinde nasıl ki kültür sıvısı - reaksiyon hacmi oranında bir standart olmadığı gibi kültür tipi ve besi yeri hakkında da bir standardizasyon yoktur. Farklı kaynaklarda derin (Lung ve Huang, 2013; Tripathi vd.., 2013) ve statik (Arora ve Chandra, 2011) kültür tiplerinde Czapek Dox's Broth (Arora ve Chandra, 2010; Malpure vd., 2006) ve HAGEM (Kalyoncu vd., 2010) gibi besiyerleri kullanılmıştır. Ancak farklı kültür tiplerinde farklı besiyerlerinin kullanımı, elde edilen sonuçların birbiri ile karşılaştırılması açısından zorluk yaratmaktadır. Tarama çalışmalarında doğru sonuçlara ulaşabilmek adına bu parametrelerin standardize edilmesi daha da önem taşımaktadır. Bu nedenle çalışmamızda antioksidan aktiviteden sorumlu bileşiklerin üretimini arttırmak için uygun kültür tipi ve besi yeri seçilmiştir. Tarama çalışmasında kullanılacak besiyeri ve kültür tipini belirlemek amacıyla seçilen dört fungus izolatı (OBCC 34, 1072, 5014 ve 5028), Czapek Dox 1, Czapek Dox 2, HAGEM, PMP besi yerlerinde ve statik ve çalkamalı kültür tipinde üretilmiş ve kültür sıvılarında DPPH radikal giderimi (%) hesaplanmıştır.

Çizelge 4.2. de sunulan istatistiksel analiz verileri, kültür tipinin antioksidan aktivite üzerine anlamlı bir etkisi olmadığını gösterirken, kullanılan besiyeri ve izolata bağlı olarak ise antioksidan aktivite anlamlı olarak değiştiğini belirlenmiştir. ($P<0.05$).

Çizelge 4.2. Kültür tipi, besiyeri ve izolat değişiminin antioksidan aktivite üzerin etkisine ait varyans analiz çizelgesi

Değişim Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi (df)	Kareler Ortalaması	F	P
Kültür tipi	13.536	1	13.536	0.181	0.671
Besiyeri	5202.690	3	1734.230	23.246	0.000*
İzolat	1475.782	3	491.927	6.594	0.000*
Hata	6565.199	88	74.605		
Toplam	13257.207	95			

*: P<0.05

Çalışma sonucunda elde edilen antioksidan aktivite ve toplam fenolik madde içeriği değerleri ise Çizelge 4.3. te sunulmuştur. Elde edilen istatiksel analiz verilerine göre statik kültür tipinde ve PMP besiyerinde DPPH radikali % giderim ve toplam fenolik madde (gallik asit eşdeğeri mg/ml) değerleri açısından istatistiksel anlamda daha yüksek değerlere sahip olduğunu belirlenmiştir. Bu nedenle çalışmanın sonraki basamaklarında izolatlar PMP besiyerinde statik kültür tipinde 25 ºC de 10 gün inkübe edilerek antioksidan aktivite çalışmalarına dâhil edilmiştirler.

Çizelge 4.3. Farklı besiyerleri ve kültür tiplerinde elde edilen DPPH radikal giderimi (%) ve toplam fenolik madde (gallik asit eşdeğeri mg/ml) değerleri.

		Kültür tipi							
		ÇALKALAMALI				STATİK			
Besiyeri / Fungus Kodları (OBCC)		34	1072	5014	5028	34	1072	5014	5028
Antioksidan Aktivite	Czapek Dox - 1	2,87 ± 0,19 a	21,92 ± 9,85 a	4,85 ± 0,26 a	11,88 ± 2,40 a	3,82 ± 1,26 a	11,72 ± 4,79 a	3,69 ± 0,60 a	3,47 ± 0,58 a
	Czapek Dox - 2	10,60 ± 1,00 b	4,85 ± 1,46 b	12,27 ± 1,08 ab	10,92 ± 0,93 a	8,67 ± 3,50 a	9,23 ± 1,67 a	6,30 ± 0,69 a	31,17 ± 4,17 bc
	HAGEM	16,65 ± 1,53 c	8,20 ± 0,22 b	15,67 ± 5,01 bc	19,13 ± 2,67 b	7,66 ± 0,47 a	10,16 ± 0,04 a	14,57 ± 2,98 b	18,71 ± 1,24 b
	PMP	20,60 ± 1,51 d	19,88 ± 0,18 a	20,77 ± 2,47 c	37,47 ± 4,57 c	25,44 ± 2,03 b	29,95 ± 3,29 b	23,58 ± 2,74 c	42,42 ± 9,53 c
Fenolik İçerik	Czapek Dox - 1	0,71 ± 0,00 a	0,83 ± 0,04 a	0,71 ± 0,00 a	0,94 ± 0,05 a	0,71 ± 0,00 a	0,77 ± 0,01 a	0,71 ± 0,00 a	0,76 ± 0,01 a
	Czapek Dox - 2	0,98 ± 0,04 b	1,08 ± 0,03 b	0,96 ± 0,05 b	0,97 ± 0,00 a	0,85 ± 0,12 a	1,06 ± 0,02 ab	0,85 ± 0,02 ab	2,21 ± 0,24 b
	HAGEM	1,13 ± 0,07 c	1,07 ± 0,03 b	1,09 ± 0,08 b	1,26 ± 0,17 a	0,81 ± 0,00 a	1,13 ± 0,03 b	1,03 ± 0,13 b	1,27 ± 0,08 a
	PMP	1,41 ± 0,02 d	6,05 ± 0,06 c	1,12 ± 0,09 b	6,66 ± 1,08 b	1,85 ± 0,14 b	2,25 ± 0,24 c	1,49 ± 0,09 c	2,36 ± 0,34 c

ANOVA, P<0.05, sütunlarda aynı harflerin kullanımı istatistiksel anlamda benzerliği ifade etmektedir.

4.1.3. Makrofungus hücre kitlesinin ekstraksiyon yönteminin seçilmesi

Makrofungus hücre kitlelerinin antioksidan aktiviteden sorumlu hücre içi metabolitlerinin ya da yapısal bileşenlerinin aktivitelerinin değerlendirilebilmesi için öncelikle bu bileşenlerin uygun çözücü ve / veya yöntemlerle ekstrakte edilmesi gerekmektedir. Bu aşamanın en yüksek verimle gerçekleştirilmesi elde edilen sonucu doğrudan etkileyeceğinden ektraksiyon aşaması hücre kitleleriyle yapılan çalışmaların en önemli basamağı haline gelmektedir.

Biyomasın ekstraksiyonu amacı ile farklı araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda maserasyon (Keleşve vd., 2011; Tripathi ve Tiwary, 2013), mikrodalga (Kaur vd., 2012; Özyürek vd., 2014), ultrases (Mujić ve vd., 2010; Morelli ve Prado, 2012) gibi uygulamalar kullanılmıştır.

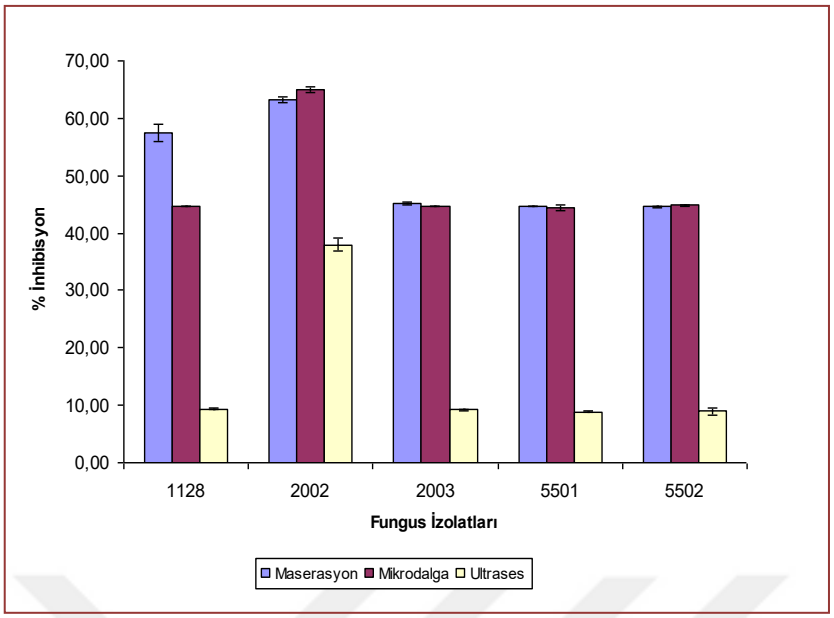
Maserasyon, mikrodalga ve ultrases yöntemleri arasından en başarılı ekstraksiyon yöntemini seçmek amacıyla OBCC kültür koleksiyonundan seçilen 5 fungus izolatına ait hücre kitleleri kullanılmıştır.

Çalışma sonucunda elde edilen antioksidan aktivite ve toplam fenolik madde içeriği değerleri sayısal olarak Çizelge 4.4. de ve görsel olarak Şekil 4.2. de sunulmuştur. Elde edilen veriler doğrultusunda diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında mikrodalga uygulamasının hızlı, ucuz ve etkin bir ekstraksiyon yöntemi olduğunu desteklemektedir.

Çizelge 4.4. Fungus hücre ekstraksiyon yönteminin DPPH radikalinin % giderimine etkisi.

Fungus İzolat Kodu (OBCC)	Ekstraksiyon Yöntemine Bağlı DPPH Radikal Giderimi (%)		
	Maserasyon	Mikrodalga	Ultrases
1128	57.56 ± 1.52 a	44.70 ± 0.03 a	9.39 ± 0.14 b
2002	63.28 ± 0.51 a	64.97 ± 0.41 a	37.94 ± 1.18 b
2003	45.15 ± 0.20 a	44.64 ± 0.08 a	9.18 ± 0.12 b
5501	44.64 ± 0.08 a	44.47 ± 0.51 a	8.88 ± 0.15 b
5502	44.59 ± 0.10 a	44.82 ± 0.18 a	8.97 ± 0.60 b

ANOVA, $P<0.05$, aynı harf kullanılan satırlar istatistiksel anlamda benzerdir.



Şekil 4.2. Fungus hücre ekstraksiyon yönteminin DPPH radikalinin % giderimine etkisi

Çalışma sonucunda; ultrases yönteminin antioksidan aktiviteden sorumlu hücre içi bileşenlerin ekstraksiyonu amacı ile kullanılan diğer yöntemlere göre oldukça düşük verime sahip olduğu ve maserasyon ve mikrodalga uygulamalarından elde edilen verilerin ise istatistiksel anlamda farklı olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.4.). Bu durumda daha kısa sürede ve daha ucuz olarak gerçekleştirilen bir yöntem olan mikrodalga uygulamasının hücre ekstraksiyonu amacı ile kullanımı daha uygun görülmüş ve araştırmanın sonraki kısmı bu yöntem ile gerçekleştirilmiştir.

4.1.4. DPPH yöntemi ile yüksek antioksidan aktiviteye sahip fungus izolatı ve yaşam formunun seçilmesi

Gerçekleştirilen üç optimizasyon çalışması sonucunda elde edilen veriler bir araya getirildiğinde;

a. DPPH radikal süpürücü aktivite tayininde 0,1: 2,9 oranında kültür sıvısı / DPPH (h/h) kullanılması,
b. Organizmaların PMP besiyerinde ve statik kültür koşullarında üretilmesi,
c. Hücre kitlelerinin mikrodalga uygulaması ile ekstrakte edilmesi uygun görülmüştür..

Bu aşamada yukarıdaki veriler kullanılarak 132 adet fungus izolatının kültür sıvısı ve hücre kitlesinin antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir.

4.1.4.1. Yüksek antioksidan aktiviteye sahip hücre kitlesinin belirlenmesi

Statik kültür koşullarında üretilmiş olan makrofungus hücre kitleleri liyofilize edilerek mikrodalga yöntemi ile ekstrakte edilmiş ve DPPH radikal süpürücü aktiviteleri ve fenolik madde içeriği belirlenmiştir. Fungus izolatlarından elde edilen hücre kitlelerinin DPPH radikal süpürücü aktivite ve toplam fenolik madde içeriği değerleri Çizelge 4.7. te sunulmuştur.

Çizelge 4.5. Fungal hücre kitlelerinin DPPH radikal giderimi ve toplam fenolik madde içerikleri

Fungus İzolat Kodu (OBCC) ve Kontroller	DPPH Radikali Giderimi (%)	Toplam Fenolik Madde İçeriği (mg/ml gallik asit eşdeğeri)
2	19.57 ± 0.42 ab	0.87 ± 0.01
3	8.77 ± 0.46 ab	1.21 ± 0.03
4	5.17 ± 0.39 b	1.16 ± 0.00
5	0.84 ± 0.07 ab	1.89 ± 0.01
9	15.85 ± 0.07 ab	0.83 ± 0.01
17	12.69 ± 0.21 a	1.00 ± 0.01
19	6.94 ± 0.00 ab	1.14 ± 0.04
21	21.01 ± 0.16 ab	1.42 ± 0.01
23	23.98 ± 0.73 ab	1.29 ± 0.03
24	9.21 ± 0.15 ab	1.01 ± 0.00
25	13.98 ± 0.27 a	0.87 ± 0.00
26	6.66 ± 0.00 ab	1.04 ± 0.03
27	9.63 ± 1.26 ab	1.31 ± 0.01
28	10.50 ± 0.16 ab	1.03 ± 0.02
30	15.52 ± 1.33 ab	1.21 ± 0.05
31	21.32 ± 0.51 ab	1.17 ± 0.07
32	1.05 ± 0.00 ab	0.90 ± 0.00
33	22.09 ± 0.43 ab	1.15 ± 0.03
34	17.84 ± 0.48 ab	0.90 ± 0.02
36	19.64 ± 0.85 ab	1.20 ± 0.04

Çizelge 4.5. Fungal hücre kitlelerinin DPPH radikal giderimi ve toplam fenolik madde içerikleri (devam).

Fungus İzolat Kodu (OBCC) ve Kontroller	DPPH Radikali Giderimi (%)	Toplam Fenolik Madde İçeriği (mg/ml gallik asit eşdeğeri)
37	4.03 ± 0.95 b	1.09 ± 0.04
38	6.86 ± 0.15 ab	0.88 ± 0.02
39	0.23 ± 0.08 ab	4.60 ± 0.00
40	17.58 ± 0.18 ab	0.97 ± 0.00
51	11.83 ± 0.27 a	0.80 ± 0.00
1002	9.30 ± 0.11 ab	1.05 ± 0.00
1004	1.74 ± 1.30 b	0.76 ± 0.03
1005	5.71 ± 0.77 ab	0.87 ± 0.13
1006	1.60 ± 0.53 b	0.79 ± 0.01
1008	3.94 ± 0.34 b	0.83 ± 0.02
1010	2.04 ± 0.49 b	0.78 ± 0.03
1014	0.63 ± 0.07 ab	1.20 ± 0.01
1015	3.21 ± 0.10 b	0.73 ± 0.00
1021	1.90 ± 0.44 b	2.43 ± 1.70
1023	3.68 ± 0.11 b	0.68 ± 0.01
1025	2.78 ± 0.14 b	0.74 ± 0.01
1026	4.91 ± 0.15 b	0.77 ± 0.02
1031	4.06 ± 0.21 b	0.73 ± 0.04
1033	5.95 ± 0.66 ab	0.80 ± 0.00
1035	5.08 ± 1.08 b	0.79 ± 0.04
1038	4.28 ± 0.80 b	0.76 ± 0.02
1040	15.01 ± 1.09 ab	1.52 ± 0.05
1043	2.09 ± 0.15 b	0.83 ± 0.08
1046	3.29 ± 0.00 b	0.86 ± 0.05
1047	17.37 ± 0.77 ab	2.14 ± 0.07
1048	5.32 ± 0.03 ab	0.83 ± 0.04
1049	3.65 ± 0.24 ab	0.79 ± 0.02
1050	13.60 ± 0.51 a	1.41 ± 0.03

Çizelge 4.5. Fungal hücre kitlelerinin DPPH radikal giderimi ve toplam fenolik madde içerikleri (devam).

Fungus İzolat Kodu (OBCC) ve Kontroller	DPPH Radikali Giderimi (%)	Toplam Fenolik Madde İçeriği (mg/ml gallik asit eşdeğeri)
1056	5.57 ± 0.35 ab	0.80 ± 0.01
1057	3.01 ± 0.98 ab	0.94 ± 0.05
1058	3.75 ± 0.04 ab	0.78 ± 0.03
1059	3.65 ± 0.56 ab	0.99 ± 0.13
1060	12.41 ± 0.25 a	1.20 ± 0.00
1067	15.52 ± 0.69 ab	2.01 ± 0.01
1070	18.33 ± 0.18 ab	0.91 ± 0.01
1071	5.19 ± 0.07 ab	1.19 ± 0.04
1072	2.75 ± 1.36 ab	0.79 ± 0.03
1075	3.16 ± 0.63 ab	0.63 ± 0.01
1078	4.38 ± 0.56 ab	0.80 ± 0.02
1079	6.16 ± 0.03 ab	0.82 ± 0.05
1080	7.14 ± 0.04 ab	0.91 ± 0.02
1084	4.08 ± 0.19 ab	0.75 ± 0.01
1085	3.12 ± 0.81 ab	0.71 ± 0.03
1086	4.45 ± 0.42 ab	0.81 ± 0.07
1087	6.23 ± 0.17 ab	0.79 ± 0.01
1088	3.05 ± 0.46 ab	0.71 ± 0.01
1089	3.89 ± 0.10 ab	0.76 ± 0.00
1092	2.35 ± 0.04 ab	0.71 ± 0.01
1095	2.33 ± 0.10 ab	0.83 ± 0.08
1097	2.56 ± 0.32 ab	0.74 ± 0.01
1098	4.62 ± 0.34 ab	0.79 ± 0.00
1099	4.20 ± 0.42 ab	0.72 ± 0.02
1100	1.16 ± 0.76 ab	0.72 ± 0.01
1106	11.04 ± 0.07 a	1.12 ± 0.04
1108	4.37 ± 0.78 ab	0.74 ± 0.02
1109	2.28 ± 0.11 ab	0.68 ± 0.01

Çizelge 4.5. Fungal hücre kitlelerinin DPPH radikal giderimi ve toplam fenolik madde içerikleri (devam).

Fungus İzolat Kodu (OBCC) ve Kontroller	DPPH Radikali Giderimi (%)	Toplam Fenolik Madde İçeriği (mg/ml gallik asit eşdeğeri)
1110	3.83 ± 0.14 ab	0.83 ± 0.02
1120	21.04 ± 0.28 ab	1.22 ± 0.02
1121	20.85 ± 0.40 ab	1.69 ± 0.02
1128	44.69 ± 0.02 ab	0.79 ± 0.01
1136	3.82 ± 0.32 ab	0.81 ± 0.05
1137	2.87 ± 0.56 ab	0.74 ± 0.01
1506	7.08 ± 0.07 ab	0.90 ± 0.01
1508	5.73 ± 0.28 ab	0.98 ± 0.01
1509	4.91 ± 0.10 ab	0.94 ± 0.01
2001	7.34 ± 0.45 b	0.98 ± 0.02
2002	64.97 ± 0.41 ab	1.93 ± 0.02
2003	44.64 ± 0.08 ab	1.09 ± 0.01
2004	8.84 ± 0.35 ab	0.23 ± 0.00
2503	19.52 ± 0.46 ab	1.41 ± 0.03
2517	13.96 ± 0.46 b	1.38 ± 0.05
2523	8.46 ± 0.35 ab	1.11 ± 0.00
2524	9.78 ± 0.10 b	1.28 ± 0.03
2525	2.59 ± 0.12 a	1.23 ± 0.01
3001	29.52 ± 6.04 ab	0.83 ± 0.03
3003	23.00 ± 0.81 ab	1.68 ± 0.00
3008	9.54 ± 0.37 b	0.92 ± 0.01
3009	6.84 ± 0.53 a	0.84 ± 0.00
3504	9.28 ± 0.36 ab	1.15 ± 0.00
3505	10.50 ± 0.11 b	0.88 ± 0.00
5002	6.59 ± 0.00 a	0.76 ± 0.01
5004	10.05 ± 0.16 b	1.04 ± 0.03
5006	13.30 ± 0.89 b	1.45 ± 0.00
5008	16.85 ± 0.40 ab	1.39 ± 0.01

Çizelge 4.5. Fungal hücre kitlelerinin DPPH radikal giderimi ve toplam fenolik madde içerikleri (devam).

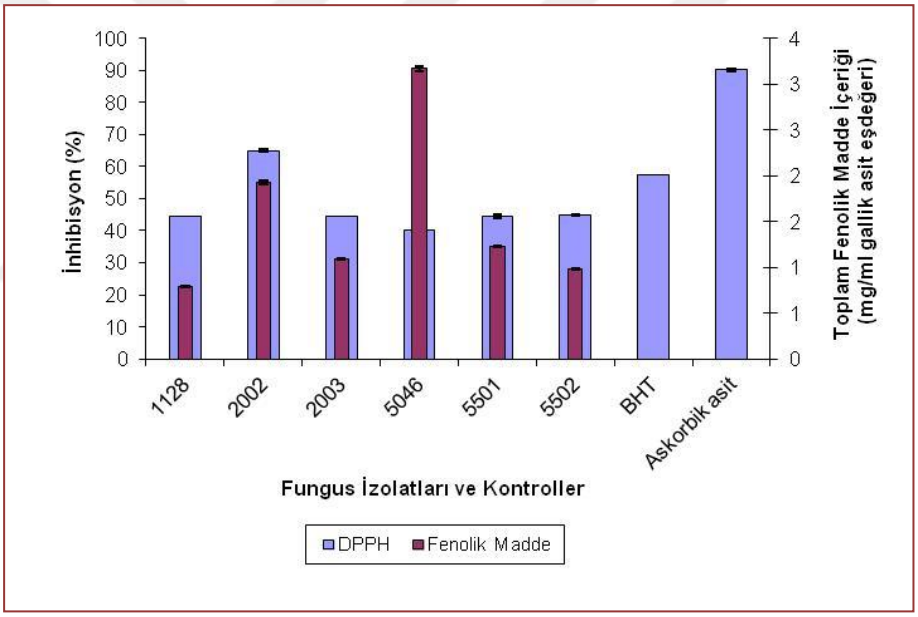
Fungus İzolat Kodu (OBCC) ve Kontroller	DPPH Radikali Giderimi (%)	Toplam Fenolik Madde İçeriği (mg/ml gallik asit eşdeğeri)
5009	17.25 ± 0.00 ab	0.90 ± 0.01
5010	1.05 ± 0.12 a	1.20 ± 0.01
5011	20.55 ± 0.00 ab	1.05 ± 0.01
5014	21.18 ± 0.25 ab	1.21 ± 0.01
5015	7.71 ± 0.14 ab	1.72 ± 0.00
5016	8.27 ± 0.74 ab	0.94 ± 0.00
5022	0.96 ± 0.04 a	1.23 ± 0.00
5023	21.97 ± 0.42 ab	1.16 ± 0.02
5024	7.25 ± 0.11 a	1.55 ± 0.03
5028	0.54 ± 0.04 ab	0.87 ± 0.01
5040	20.38 ± 0.33 ab	1.06 ± 0.01
5041	10.33 ± 0.49 b	1.01 ± 0.00
5046	40.00 ± 1.66 ab	3.17 ± 0.03
5049	20.73 ± 0.04 ab	1.10 ± 0.02
5050	4.28 ± 0.66 a	1.45 ± 0.08
5051	8.53 ± 0.21 ab	1.36 ± 0.03
5052	7.62 ± 0.28 a	1.14 ± 0.02
5054	19.19 ± 0.68 ab	1.11 ± 0.01
5058	24.82 ± 1.09 ab	1.43 ± 0.01
5059	14.61 ± 0.98 b	1.47 ± 0.02
5060	2.83 ± 0.25 a	1.22 ± 0.02
5063	0.94 ± 0.01 a	0. 42 ± 0.01
5066	2.28 ± 0.05 a	0.91 ± 0.01
5501	44.47 ± 0.52 ab	1.23 ± 0.01
5502	44.82 ± 0.18 ab	0.98 ± 0.01
5503	3.80 ± 1.01 a	0.73 ± 0.01
5507	8.02 ± 0.48 ab	1.03 ± 0.00
6008	4.07 ± 0.52 a	0.80 ± 0.01

Çizelge 4.5. Fungal hücre kitlelerinin DPPH radikal giderimi ve toplam fenolik madde içerikleri (devam).

Fungus İzolat Kodu (OBCC) ve Kontroller	DPPH Radikali Giderimi (%)	Toplam Fenolik Madde İçeriği (mg/ml gallik asit eşdeğeri)
Askorbik asit	90.22± 0.43 b	Denenmedi
BHT	57.29 ± 0.07 a	Denenmedi

a: Askorbik asitten istatistiksel olarak farklı, b: BHT den istatistiksel olarak farklı (P<0.05)

Fungal izolatların birçoğunun BHT ve askorbik asitten daha yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Pozitif kontroller ile rekabet edecek seviyede değerlere sahip izolatlara ilişkin veriler Şekil 4.3. de sunulmuştur.



Şekil 4.3. Seçilmiş OBCC izolatlarının hücre kitlesi ekstraktlarına ait antioksidan aktivite ve total fenolik içerik

4.1.4.2. Yüksek antioksidan aktiviteye sahip kültür sıvısının belirlenmesi

OBCC kültür koleksiyonundan seçilen 132 izolata PMP besiyerinde statik kültür koşullarında üretildikten sonra kültür sıvıları doğrudan DPPH radikal süpürücü aktivite ve toplam fenolik madde içeriğinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Elde edilen değerler Çizelge 4.6. da sunulmuştur.

Çizelge 4.6. Fungal kültür sıvılarının DPPH radikal giderimi ve toplam fenolik madde içerikleri.

Fungus İzolat Kodu (OBCC) ve Kontroller	DPPH Radikali Giderimi (%)	Toplam Fenolik Madde İçeriği (mg/ml gallik asit eşdeğeri)
2	9.17 ± 1.05	0.96 ± 0.02
3	18.53 ± 1.47 ab	1.58 ± 0.05
4	23.78 ± 1.28 ab	1.06 ± 0.02
5	18.11 ± 0.70 ab	1.55 ± 0.11
9	33.18 ± 0.19 ab	1.24 ± 0.02
17	5.35 ± 0.11 a	1.25 ± 0.10
19	29.10 ± 0.61 ab	1.01 ± 0.02
21	26.95 ± 1.94 ab	1.77 ± 0.10
23	16.39 ± 0.95 b	2.00 ± 0.24
24	10.99 ± 0.61 b	1.56 ± 0.31
25	28.16 ± 1.20 ab	0.97 ± 0.06
26	4.70 ± 0.76 a	1.04 ± 0.05
27	19.28 ± 0.39 ab	1.67 ± 0.04
28	18.60 ± 1.65 ab	1.29 ± 0.13
30	25.70 ± 0.50 ab	1.36 ± 0.03
31	10.46 ± 1.62 b	1.09 ± 0.11
32	28.57 ± 1.68 ab	1.40 ± 0.01
33	19.17 ± 0.54 ab	1.21 ± 0.08
34	12.35 ± 0.00 b	1.40 ± 0.01
36	13.64 ± 1.30 b	1.19 ± 0.10
37	10.36 ± 0.77 b	1.04 ± 0.06
38	8.63 ± 0.19 a	1.12 ± 0.04
39	23.82 ± 0.40 ab	1.52 ± 0.02
40	9.96 ± 0.24 b	0.83 ± 0.40
51	8.82 ± 0.46	1.00 ± 0.03
1002	9.39 ± 0.35	1.15 ± 0.03
1004	12.11± 0.18 b	1.62 ± 0.06

Çizelge 4.6. Fungal kültür sıvılarının DPPH radikal giderimi ve toplam fenolik madde içerikleri (devam).

Fungus İzolat Kodu (OBCC) ve Kontroller	DPPH Radikali Giderimi (%)	Toplam Fenolik Madde İçeriği (mg/ml gallik asit eşdeğeri)
1005	8.97 ± 1.44	1.04 ± 0.02
1006	21.73 ± 1.09 ab	1.72 ± 0.02
1008	20.68 ± 4.61 ab	1.56 ± 0.21
1010	21.47 ± 1.85 ab	2.05 ± 0.17
1014	25.76 ± 0.10 ab	1.06 ± 0.02
1015	40.98 ± 0.00 ab	1.17 ± 0.00
1021	9.61 ± 0.70 b	1.46 ± 0.03
1023	20.28 ± 0.00 ab	1.70 ± 0.00
1025	40.17 ± 2.85 ab	1.90 ± 0.02
1026	15.33 ± 0.11 b	0.81 ± 0.00
1031	16.24 ± 1.22 b	1.50 ± 0.08
1033	60.25 ± 0.39 ab	1.32 ± 0.01
1035	17.86 ± 2.21 b	1.71 ± 0.17
1038	24.74 ± 1.79 ab	1.61 ± 0.00
1040	20.20 ± 0.46 ab	1.07 ± 0.14
1043	14.57 ± 1.39 b	1.28 ± 0.07
1046	18.74 ± 3.58 ab	1.68 ± 0.05
1047	100.00 ± 0.00 ab	4.62 ± 0.22
1048	54.12 ± 2.21 ab	2.24 ± 0.12
1049	11.73 ± 0.79 b	1.17 ± 0.02
1050	25.35 ± 0.59 ab	0.92 ± 0.01
1056	91.37± 0.28 ab	2.18 ± 0.10
1057	9.92 ± 0.82	0.97 ± 0.02
1058	9.47 ± 0.21	1.81 ± 0.02
1059	14.32 ± 1.31 b	1.95 ± 0.00
1060	15.84 ± 1.64 b	1.02 ± 0.01
1067	50.29 ± 3.91 ab	1.71 ± 0.17

Çizelge 4.6. Fungal kültür sıvılarının DPPH radikal giderimi ve toplam fenolik madde içerikleri (devam).

Fungus İzolat Kodu (OBCC) ve Kontroller	DPPH Radikali Giderimi (%)	Toplam Fenolik Madde İçeriği (mg/ml gallik asit eşdeğeri)
1070	7.95 ± 1.12	1.14 ± 0.04
1071	5.99 ± 0.07a	0.98 ± 0.03
1072	25.47 ± 1.33 ab	1.24 ± 0.00
1075	16.64± 0.30 b	1.52 ± 0.06
1078	8.81 ± 0.18	1.17 ± 0.01
1079	13.64 ± 0.21 b	0.97 ± 0.03
1080	14.21 ± 0.52 b	1.82 ± 0.01
1084	10.81 ± 0.72	1.14 ± 0.01
1085	16.80 ± 0.23 b	1.46 ± 0.01
1086	14.57± 1.79 b	1.23 ± 0.07
1087	8.49 ± 0.00	2.33 ± 0.00
1088	11.12 ± 0.04	1.08 ± 0.09
1089	13.72 ± 0.72 b	1.28 ± 0.01
1092	25.24 ± 0.65 ab	1.23 ± 0.10
1095	30.39± 0.98 ab	1.24 ± 0.00
1097	8.31 ± 1.10	1.22 ± 0.09
1098	26.36 ± 0.58 ab	0.98 ± 0.01
1099	38.33± 2.93 ab	1.74 ± 0.05
1100	7.72 ± 0.38	0.95 ± 0.00
1106	15.53 ± 3.14 b	2.00 ± 0.29
1108	10.97 ± 0.73	1.10 ± 0.04
1109	23.74± 2.67 ab	1.60 ± 0.16
1110	9.05 ± 0.84	1.03 ± 0.00
1120	19.02 ± 7.91 b	2.81 ± 0.01
1121	25.56 ± 5.92 ab	1.20 ± 0.00
1128	27.15± 0.23 ab	1.86 ± 0.06
1136	7.21 ± 1.54	1.16 ± 0.00

Çizelge 4.6. Fungal kültür sıvılarının DPPH radikal giderimi ve toplam fenolik madde içerikleri (devam).

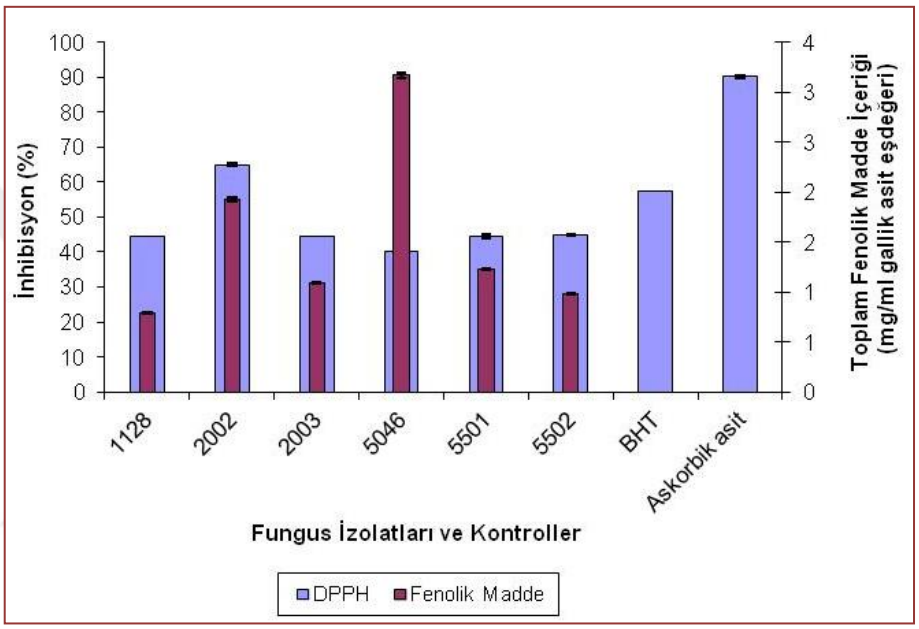
Fungus İzolat Kodu (OBCC) ve Kontroller	DPPH Radikali Giderimi (%)	Toplam Fenolik Madde İçeriği (mg/ml gallik asit eşdeğeri)
1137	26.89± 3.43 ab	1.65 ± 0.03
1506	8.94 ± 0.10	1.00 ± 0.02
1508	31.90 ± 1.82 ab	1.70 ± 0.00
1509	29.69 ± 1.18 ab	2.72 ± 0.01
2001	10.49 ± 0.11	1.01 ± 0.02
2002	86.67± 1.12 ab	4.35 ± 0.54
2003	8.44 ± 0.43	1.27 ± 0.00
2004	36.04 ± 1.76 ab	1.79 ± 0.05
2503	15.35 ± 1.63 b	1.35 ± 0.02
2517	26.81 ± 0.14 ab	2.16 ± 0.09
2523	25.51± 2.98 ab	1.97 ± 0.11
2524	5.77 ± 0.86 a	1.08 ± 0.03
2525	6.83 ± 0.91 a	1.52 ± 0.16
3001	13.34 ± 0.81 b	1.08 ± 0.03
3003	23.50 ± 0.63 ab	1.54 ± 0.00
3008	32.28 ± 0.90 ab	1.83 ± 0.17
3009	23.34± 0.65 ab	1.67 ± 0.02
3504	5.20 ± 1.08 a	1.34 ± 0.05
3505	23.48± 0.00 ab	1.79 ± 0.08
5002	8.09 ± 1.63	0.98 ± 0.03
5004	16.16 ± 3.16 b	1.21 ± 0.07
5006	15.18 ± 0.19 b	1.38 ± 0.04
5008	29.04 ± 0.19 ab	1.19 ± 0.03
5009	50.35 ± 0.21 ab	2.44 ± 0.14
5010	24.39 ± 0.25 ab	1.92 ± 0.07
5011	10.53 ± 0.42	1.00 ± 0.00
5014	11.86 ± 0.14 b	1.21 ± 0.11

Çizelge 4.6. Fungal kültür sıvılarının DPPH radikal giderimi ve toplam fenolik madde içerikleri (devam).

Fungus İzolat Kodu (OBCC) ve Kontroller	DPPH Radikali Giderimi (%)	Toplam Fenolik Madde İçeriği (mg/ml gallik asit eşdeğeri)
5015	14.39 ± 0.00 b	1.64 ± 0.00
5016	13.24 ± 0.67 b	1.76 ± 0.07
5022	13.63± 4.11 b	1.34 ± 0.02
5023	9.68 ± 0.14	2.29 ± 0.04
5024	8.89 ± 1.27	1.23 ± 0.09
5028	24.80 ± 1.36 ab	1.82 ± 0.03
5040	11.75 ± 0.60 b	1.03 ± 0.00
5041	12.37 ± 0.97 b	1.41 ± 0.09
5046	19.95 ± 5.23 ab	2.00 ± 0.80
5049	23.53 ± 2.18 ab	1.19 ± 0.04
5050	40.50 ± 3.72 ab	1.51 ± 0.02
5051	34.63 ± 1.29 ab	1.89 ± 0.06
5052	26.00 ± 1.44 ab	1.87 ± 0.14
5054	21.34 ± 0.17 ab	1.70 ± 0.00
5058	10.90 ± 0.42 b	1.06 ± 0.06
5059	10.29 ± 0.38	1.03 ± 0.02
5060	11.20 ± 1.75 b	2.05 ± 1.78
5063	14.43 ± 0.90 b	1.53 ± 0.02
5066	10.14 ± 0.64	1.71 ± 0.07
5501	9.58 ± 0.25	1.11 ± 0.00
5502	7.12 ± 0.25 a	1.07 ± 0.00
5503	11.24 ± 0.10 b	1.03 ± 0.02
5507	4.60 ± 0.67 a	1.09 ± 0.01
6008	74.67 ± 6.70 ab	2.17 ± 0.02
Askorbik asit	90.22± 0.43 b	Denenmedi
BHT	57.29 ± 0.07 a	Denenmedi
PMP Besiyeri	1.96 ± 0.90 ab	Denenmedi

a; Askorbik asitten istatistiksel olarak farklı, b: BHT den istatistiksel olarak farklı ($P<0.05$)

Çalışmaya BHT ve Askorbik asit pozitif kontrol olarak, fungal izolatların üretildiği PMP besiyeri ise negatif kontrol olarak dâhil edilmiştir. PMP besiyeri % 1.96 oranında inhibisyon göstermiştir. Bu sonuç PMP besiyerinin kültür sıvılarından belirlenen antioksidan aktiviteye girişim yapmadığını göstermektedir. Pozitif kontroller ile rekabet edecek seviyede değerlere sahip izolatlara ilişkin veriler Şekil 4.4 de sunulmuştur.



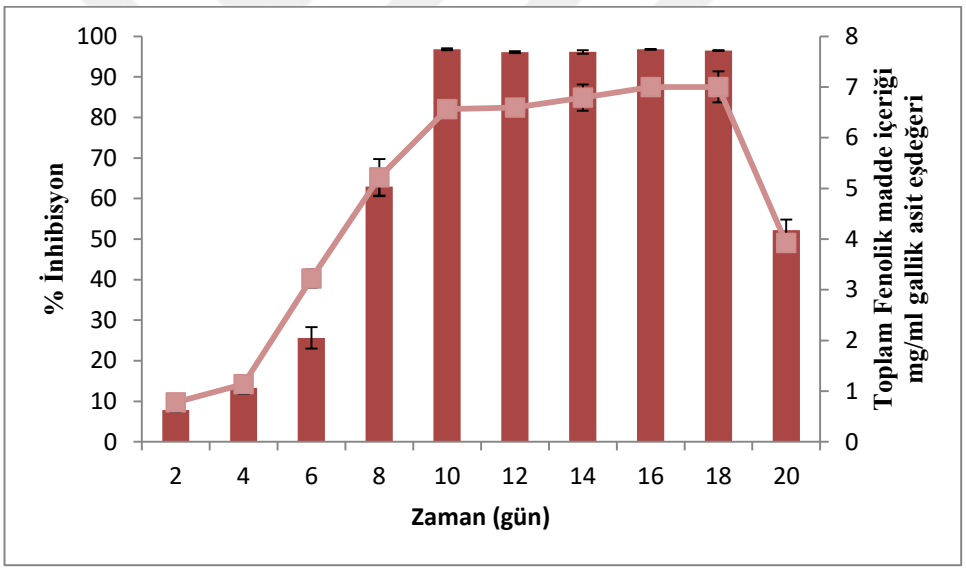
Şekil 4.4. Seçilmiş OBCC izolatlarının kültür sıvısı ekstraktlarına ait antioksidan aktivite ve total fenolik içerik

Yukarıda çizelgelerda verilen sonuçlar göz önüne alındığında kültür sıvısı ve hücre kitlesi ile elde edilen veriler DPPH radikal giderim aktiviteleri arasında bir korelasyon olmadığını görülmektedir. Kültür sıvısı ile yüksek aktivite sunan izolatların hücre kitleleri (OBCC 2002 izolatı dışında) nispeten düşük DPPH radikal giderim aktivitesine sahiptir. Buna karşın kültür sıvıları düşük aktivite sunan OBCC 1128, 2003, 5046, 5501ve 5502 gibi makrofungus izolatlarının hücre kitleleri daha yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir. Ancak genel olarak tüm deney sonuçları incelendiğinde denemeye alınan fungal izolatların hücre kitlesi ekstraktlarının tamamından elde edilen DPPH radikal giderim aktiviteleri, kültür sıvılarından elde edilenlere oranla daha düşük değerlerdedir. Bu anlamda bu çalışmada kullanılan tüm izolatların hücre dışı sekonder metabolitlerinin hücre kitlelerine göre daha yüksek antioksidan aktivite potansiyeline sahip olduğu söylenebilir.

Deneye alınan fungal izolatların kültür sıvılarının önemli kısmının pozitif kontrollerden yüksek inhibisyon değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Ancak OBCC 1047 kodlu izolat diğer organizmalara kıyasla en yüksek aktiviteyi göstererek deneye alınan diğer izolatlar arasından sıyrılmıştır. En yüksek aktiviteyi gösteren OBCC 1047 kodlu izolat daha sonraki çalışmalara devam etmek üzere seçilmiştir.

4.2. Seçilen Kültür Sıvısı Ekstraktının Zamana Bağlı Antioksidan Aktivitesi

OBCC 1047 nin PMP besiyerinde inkübasyon süresince meydana gelen antioksidan aktivite ve fenolik bileşiklerin güne bağlı antioksidan aktivite çalışması yapılarak belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.25 de verilmiştir.



Şekil 4.5. Zamana (gün) bağlı değişen DPPH radikali süpürücü antioksidan aktivite miktarı

Şekil 4.5. de OBCC 1047 kodlu fungus izolatının inkübasyonun 10. gününde maksimum DPPH radikal süpürücü aktiviteye sahip olduğu ve belirtilen günde fenolik madde içeriğinin de yükseldiği görülmektedi. Bu nedenle in vivo antioksidan çalışmaları için üretilecek olan fungus kültürünün belirtilen inkübasyon süresinde hasat edilerek ekstraksiyonunun yapılmasına karar verilmiştir. Çalışmamızda fenolik içerik miktarı antioksidan aktivite miktarı ile artarak bir korelasyon göstermiştir. Ancak her zaman antioksidan aktivite ile fenolik içerik arasında pozitif bir korelasyon blunmaya bilir.

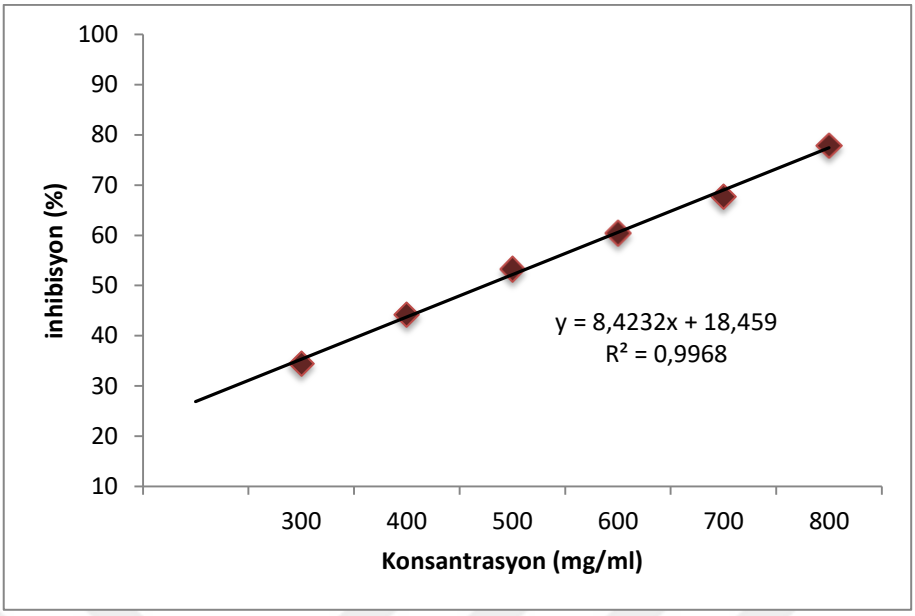
Örneğin Yadav vd., (2014) ve Khiralla vd. (2015) endofitik mantarla yaptıkları çalışmada antioksidan aktivite ile fenolik içeriğin birbirleriyle korelasyon içine bulurken, Saraswaty vd. (2013) *Fenellia nivea* 'nin diklorometan ve etilasetat ile yaptığı çalışmasından etilasetat ekstratktı total fenolik içerik ile pozitif korelasyon gösterir iken diklorometan ekstraktının negatif kolerasyon gösterdiğini belirlemiştir. Nedeni fenolik maddelerin farklı kromofor alt gruplara sahip olmak ya da total hidroksil gruplarının pozisyonlarının farklı olması olabileceği olarak bildirmiştir. Nikolovska-Nedelkoska (2017), yaptığı çalışmada *Tricholoma aurantium*'un en düşük EC50 değerine denk gelen en yüksek fenolik üretim sergilediğini diğer taraftan, en düşük miktarda fenolik olan Collybia peronata en yüksek EC50 değerlerini gösterdiğini belirlemiştir. Bu negatif korelasyonun nedenlerinin ancak ileride yapılacak antioksidan aktiviteye neden olan maddelerin belirlenmesiyle mümkün olacağını bildirmiştir.

4.3. Seçilen Makrofungus İzolatının Antioksidan Aktivite Potansiyelinin Sorgulanması

Seçilen OBCC 1047 kodlu izolatın antioksidan aktivitesi 5 yöntem (beta karoten – linoleik asit yöntemi ile toplam antioksidan aktivite, redükleyici güç, ABTS radikal katyon renksizleştirme, metal şelatlayıcı aktivite, ferrik tiyosiyanat yöntemi ile lipid peroksidasyonu) ile sorgulanmıştır. Ayrıca bu ekstrakta ait toplam fenolik madde tayini de gerçekleştirilmiştir.

4.3.1. Difenil-1-pikrihidrazil (DPPH) radikal süpürücü antioksidan aktivite yöntemi

En yüksek aktiviteye sahip olması nedeniyle seçilen OBCC 1047 kodlu izolatın kültür sıvısında bulunan hücre dışı sekonder metabolitlerinin antioksidan aktivite kaynağı olabileceği düşünüldüğünden, etilasetat ile ekstraksiyonu ardından, metanolde çözülerek 0,1mg/ml ile 1mg/ml arasında hazırlanan ardışık konsantrasyonlar ile DPPH radikal süpürücü aktivite tayini tekrarlanmıştır. Elde edilen 10 farklı derişimin her biri için DPPH radikal süpürücü antioksidan aktivite absorbansı ölçülmüştür. Derişimlere karşılık gelen absorbanslar ile lineer regresyon grafiği çizilip, aşağıda verilen denklemde değerler yerine yazılarak DPPH derişimini yarıya düşüren ekstrakt miktarı mg/mL cinsinden bulunmuştur.



Şekil 4.6. OBCC 1047 kültür sıvısı ekstraktının DPPH radikal süpürücü antioksidan aktivite konsantrasyon - absorbans grafiği





Şekil 4.7. OBCC 1047 DPPH radikal süpürücü antioksidan aktivite

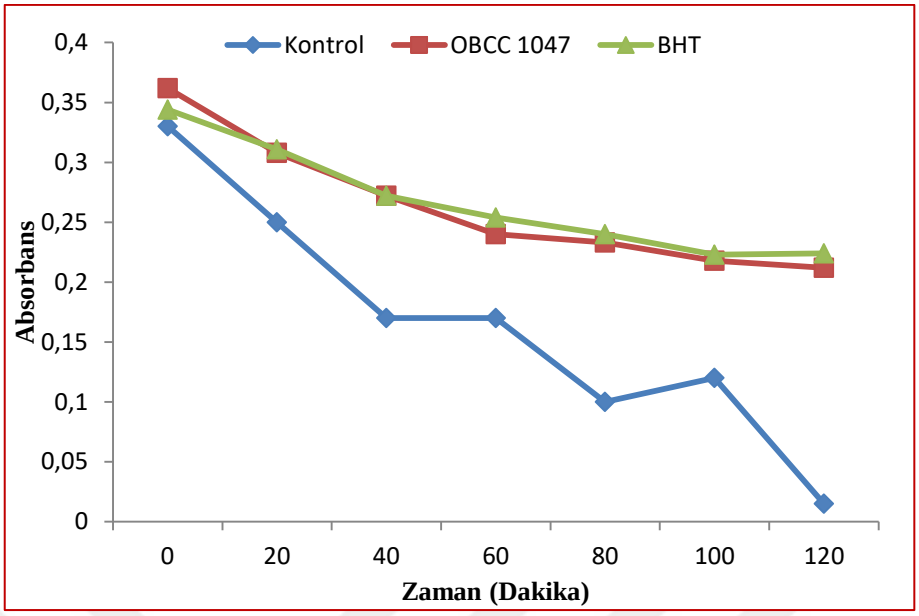
Çizelge 4.7. OBCC 1047 ve sentetik antioksidanların DPPH radikal süpürücü antioksidan aktivite testi için EC 50 değerleri

Fungus İzolat Kodu (OBCC) ve Kontroller	EC 50 Değeri mg/mL
1047	0,43
BHT	0,30
Askorbik asit	0,26

DPPH radilkal süpürücü antioksidan aktivite yöntemi mantarlaın antioksidan aktivite tayinlerinde en çok tercih edilen yöntemdir. Ucuz olması ve hızlı sonuç alınabilmesi bu yöntemin seçiminde ilk sırada yer alan kriterlerdir. DPPH yöntem sonuçlarının sunulmasında % inhibisyon sıklıkla kullanılsada gerçek en doğru sonucu EC 50 değeri vermektedir. Yapılan çalışmalar örnek konsantrasyonu, DPPH konsantrasyonu reaksiyon karışım oranının % inhibisyonu değiştirdiğini göstermektedir. Bu nedenle aynı organizmanın farklı konsantrasyonları ile çalışan araştırıcıların farklı sonuçlar alması muhtemeldir.

4.3.2. Beta karoten – linoleik asit yöntemi ile toplam antioksidan aktivite tayini

Linoleik asit gibi çoklu yağ asitleri kolaylıkla oksijen tarafından oksitlenirler (Gürsoy vd., 2010). Yöntem; bu oksidasyonun β karotende meydana getirdiği renk açılımını antioksidanların hangi oranda inhibe ettiğinin spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanmaktadır. β-karoten ağartma oranı, antioksidanların varlığında yavaşlatılabilir ya da inhibe edilebilinir. Bu durum antioksidan aktivitenin değerlendirilmesinde kullanılır (Lu vd., 2014). Aynı konsantrasyonda (1 mg/ml) OBCC 1047 ekstraktının ve pozitif kontrolün beta karoten – linoleik asit yöntemi ile zamana bağlı antioksidan aktivite değerleri Şekil 4.7. de sunulmuştur.

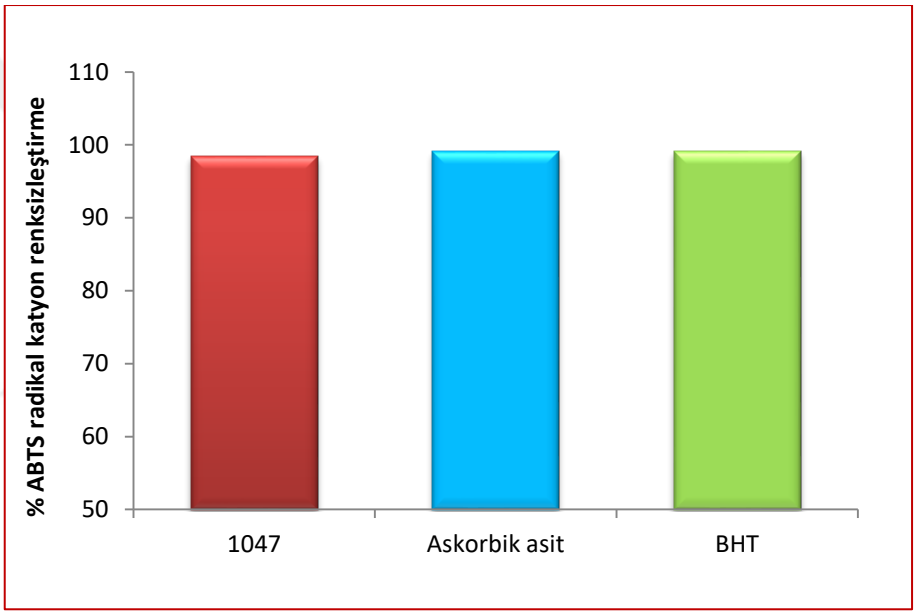


Şekil 4.8. Kontroller ve OBCC 1047 kodlu izolata ait antioksidan aktivite değerleri

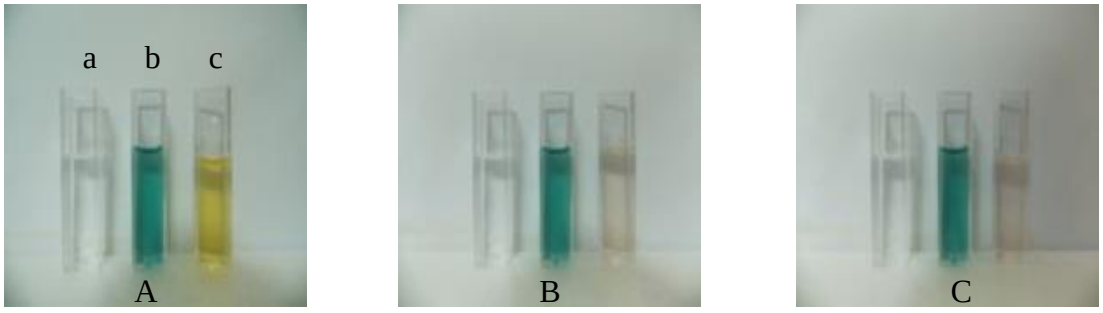
Şekil 4.7. de görüldüğü gibi fungal ekstrakt içermeyen kontrol çözeltisinin absorbansı hızla azalmış ve 120 dakika sonunda β karoten rengi tamamen kaybolmuştur. Farklı antioksidanların varlığı, sistemde oluşan linoleat içermeyen radikal ve diğer serbest radikalleri nötralize ederek b-karoten ağartma derecesini engelleyebilir (Jayaprakasha vd., 2001). Bu nedenle fungal ekstrakt ve sentetik antioksidan BHT içeren deneylerde ise β karoten ağarması daha yavaştır. 120. Dakika sonunda % toplam antioksidan aktivite BHT % 86,12 iken OBCC 1047 % 83,50 olarak hesaplanmıştır. OBCC 1047 ekstraktının reaksiyondaki serbest linoleik asit radikalini ve oluşan diğer radikalleri indirgediği ve betakaroten rengini koruduğu görülmektedir. Sarikürkçü vd. (2010) yenilebilir mantar karpaforlarıyla yaptığı çalışmaya baktığımızda 10mg/ml konsantrasyonda *Amanita caesarea* % 70.1 ± *Clitocybe geotropa* % 61.3 *Leucoagaricus pudicus* % 90 oranında aktivite gösterdikleri görülmektedir. Konsantrasyonun yüksek olması yüksek antioksidan aktiviteyi de beraberinde getirmiştir buna rağmen OBCC 1047'nin altında kalmıştır.1mg/ml ileyaptığımız çalışmada % 83,50 gibi bir değer elde etmemizin nedeni organizmanın kültürel koşullarına neden olabilir. Doğadan toplanan karpaforlarla yapılan çalışmalarda stabil bir sonuç elde etmek imkansız denilecek kadar azdır. Organizmanın girdiği stres koşulları antioksian aktiviteyi etkileyeceğinden iklim şartlarından, rekabete kadar birçok etken doğada antioksidan aktiviteyi etkileyebilir. Stabil kültür koşullarında ise antioksidan aktivite yapılacak optimizasyon çalışmaları ile maksimum hale getirilebilir.

4.3.3. ABTS radikal katyon renksizleştirme yöntemi

Mavi - yeşil renkli stabil bir serbest radikal olan $ABTS^{+}$ radikalinin antioksidanlar tarafından inhibe edilmesiylr renkte meydana gelen değişimler spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. OBCC 1047 ve pozitif kontrol olarak kullanılan sentetik antioksidanların 734 nm de verdikleri absorbans değerlerine göre % inhibisyon hesaplanmış ve Şekil 4.8.'de verilmiştir. 5 dakika sonunda yapılan spektrofotometrik ölçümlerden elde edilen absorbans değerlerine göre OBCC 1047, BHT ve askorbik asit % radikal katyon giderimleri sırasıyla, %98,44, %99,08, %99,05'dir.



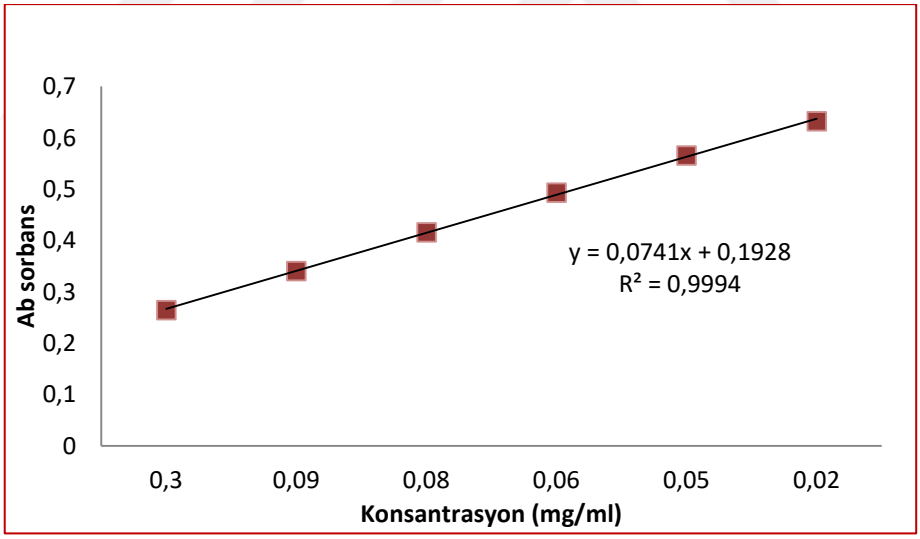
Şekil 4.9. Sentetik antioksidanlar ve OBCC 1047 kodlu izolata ait % ABTS radikal katyon renksizleştirme yöntemi grafiği



Şekil 4.10. % ABTS radikal katyon renksizleştirme yöntemiA) OBCC 1047 B) BHT C) Askorbik Asit a) Kör b) ABTS radikali c) Deney

Bu sonuçların yanı sıra ABTS radikal renksizleştirme aktivite sonuçları α tokoferol eş değeri olarak da sunulmuştur. α tokoferol doğada bulunan E vitamini formudur ve canlı hücreler için yaşamsal önem taşır. Şekil 4.11. tokoferol lineer regresyon grafiğinden elde edilen denklem ile tokoferol eş değeri inhibisyon hesaplanmış ve 3.38 mg tokoferol eşdeğeri/g ekstrakt olarak belirlenmiştir.

ABTS radikal renksizleştirme yöntemi ile DPPH radikali süpürücü aktivite yöntemleri incelendiğinde genellikle benzer inihibisyonları verdikleri görülmektedir. 1047 ABTS radikal renksizleştirme yönteminde %98,44, aktivite gösterirken DPPH radikali süpürücü antioksidan aktivite yönteminde %98,93 aktivite göstermitir. ABTS radikal katyonu da DPPH da antioksidanlardan hidrojen atomu alarak stabil hale geçerken rengini yitiren maddelerdir. Antioksidanların indirgeme yeteneklerine bağlı iki farklı yöntem olsalar da yöntemler genel olarak elektron alışverişine dayandığından sonuçlar birbirine paraleldir.

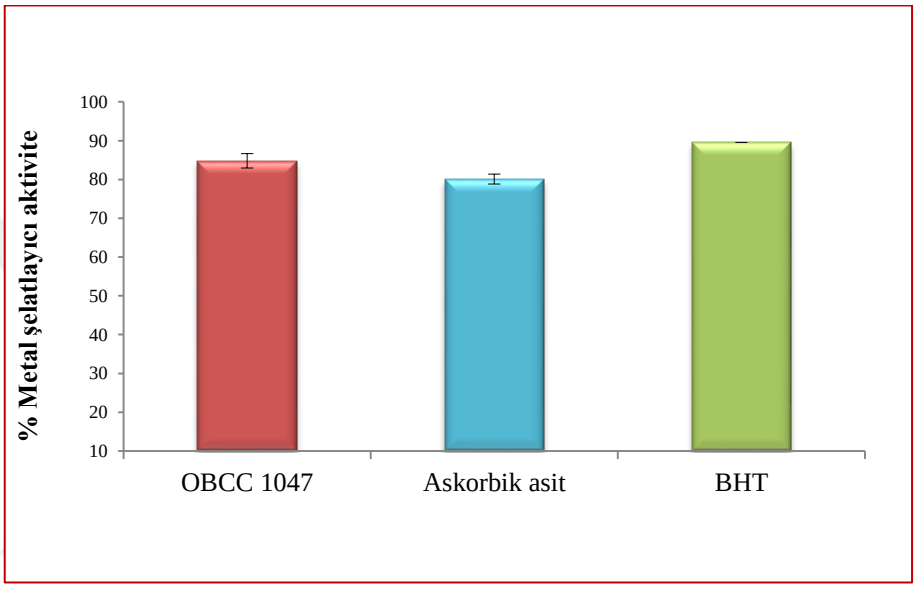


Şekil 4.11.Tokoferol lineer regresyon grafiği

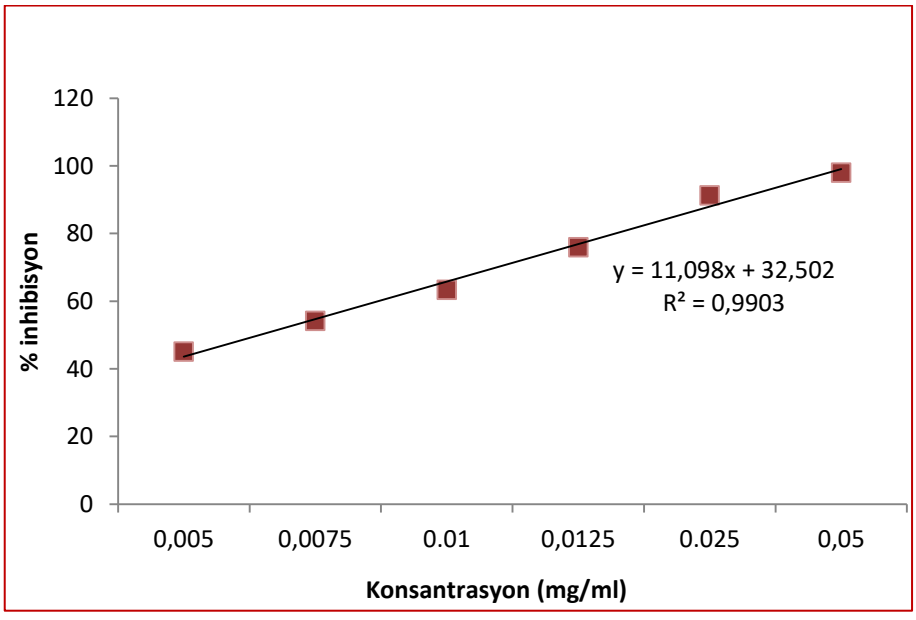
4.3.4. Metal şelatlayıcı aktivite

Metal şelatlama aktivitesi; antioksidanların yardımıyla ortam da bulunan serbest demirin bağlanması prensibine dayanmaktadır. Reaksiyonda Fe^{2+} iyonlarını bağlamak üzere, güçlü bir demir şelatlayıcı olan ferrozin reaktifi ile ortamda bulunan antioksidan maddeler demire bağlanmak üzere yarışmaktadırlar.

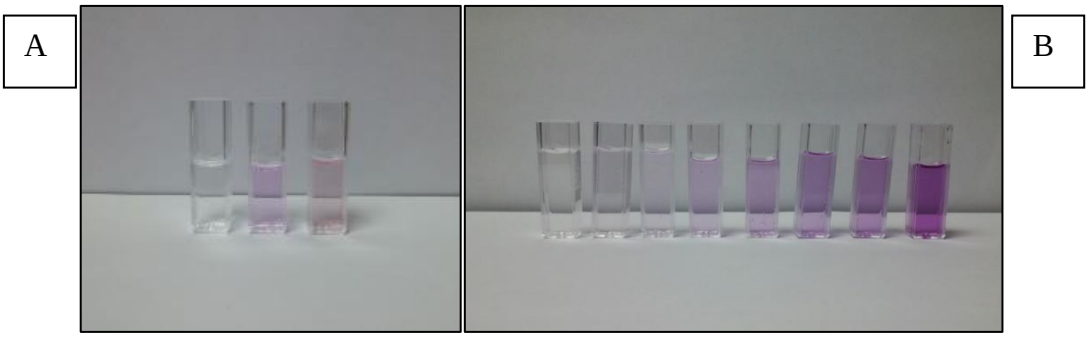
Fungal izolatın şelatlama gücü ferrozinden yüksek ise demire ferrozinden önce bağlanır ve Fe^{2+} + Ferrozin kompleksinin kırmızı rengi oluşamaz. Sonuçları karşılaştırmak amacıyla iyi bir metal şelatlayıcı olan EDTA seçilmiştir. EDTA ile yapılan metal şelatlaycı aktivite çalımaları sonucu çizilen lineer regrasyon (Şekil 4.13.) grafiğinden "EDTA eşdeğeri mg/g ekstakt" belirlenmiştir. OBCC1047 ve sentetik antioksidanlara ait % metal şelatlayıcı aktivite sonuçları Şekil 4.11. de sunulmuştur.



Şekil 4.12. OBCC 1047 ve sentetik antioksidanlara ait % metal şelatlayıcı aktivite



Şekil 4.13. EDTA lineer regresyon grafiği



Şekil 4.14. Deney ve kontrol gruplarının % metal şelatlayıcı aktiviteleri A) OBCC 1047 soldan sağa kör, kontrol ve deney B) EDTA standartları

Metal şelatlama aktivitesiyle fungal izolatların lipit peroksidasyonuna sebep olan metalleri bağlama kabiliyeti de ölçülmesi nedeniyle önemlidir. % inhibisyonlar karşılaştırıldığında sonuçların birbirine yakın olduğu görülmektedir. OBCC 1047 % 83,5 aktivite gösterirken BHT ve Askorbik asit sırayla 89,53±0,00 ve 80,1±0,00 değerleri göstermektedir. Ayrıca inhibisyon absorbans grafiğinden EC 50 değeri hesaplanmış ve 3,68 mg/ml bulunmuştur. Sonuçlar yüksek metal şelatlama kabiliyetiyle bilinen EDTA ile de karşılaştırılmıştır ve metal şelatlayıcı antioksidan aktivite 4,59 EDTA eşdeğeri mg/g ekstakt bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarla ekstraksiyon sıvısı, kültür koşulları, besi yeri ve büyüme fazının EC 50üzerinde etkisi olduğunu göstermiştir. Hameed vd. (2017) *Mucor circinelloides* ile yaptığı çalışmada kültür sıvısının etanolik ekstraktının, ham kültür sıvısına ve sulu ekstraktına oranla daha yüksek metal şelatlayıcı aktivite gösterdiğini belirlemiştir. Ayrıca en yüksek bağlama yeteneğinin geç büyüme fazındaki ekstrelerde görüldüğünü bildirmiştir. Ancak farklı çalışmalarda genellikle sulu ekstraktın aktivitesinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Smith vd., 2015). Bunun nedeninin antioksidan aktivite çalışmalarında tercih edilen filamentöz mantarların, basidiomycetes ve ascomycetes olarak adlandırılan daha yüksek fungus gruplarına ait olduğu, *Mucor circinelloides* Zygomycetes olarak adlandırılan alt fungal gruba ait olduğundan taksonomik gruplardaki farklılık olduğu kaynaklandığını ileri sürmüştür. Bu durumda mantarların ait oldukları taksonomik gruplarında antioksidan aktiviteleri üzerinde ektileri olduğu söylenebilir.

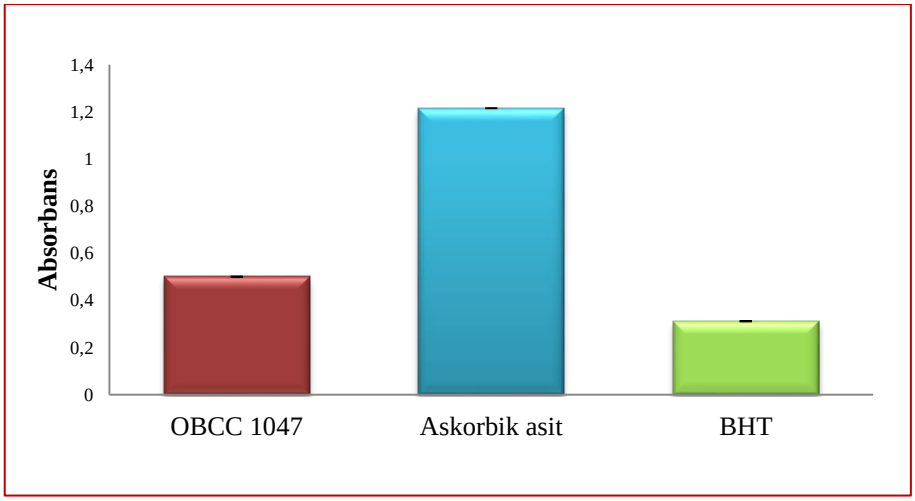
4.3.5. Redükleyici güç

Redükleyici güç antioksidan özellik gösteren maddelerin hidrojen atomu verme yeteneğinden kaynaklanır (Shimada vd., 1992) . Bu nedenle indirgeme yeteneği potansiyel antioksidan aktivitesi için önemli bir göstergedir (Jıang vd., 2005). Serbest radikallere hidrojen atomu verilerek, serbest radikal kaynaklı oluşan reaksiyonları inhibe ederler ya da etkinliklerini azaltırlar. Deneyde OBCC 1047 ve sentetik antioksidanların (Fe^{3+}) antioksidanların varlığında ferro demire (Fe^{2+}) indirgeme yetenekleri değerlendirilmiştir. Redükleyici güç sonuçları Çizelge 4.9 ve Şekil 4.15 de verilmiştir.

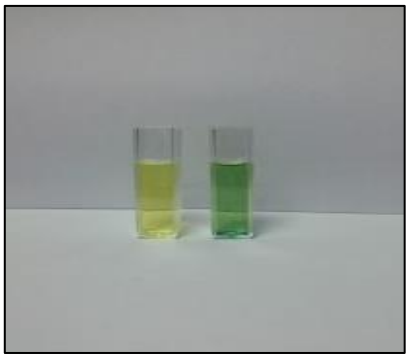
Çizelge 4.8. OBCC 1047 ve sentetik antioksidanların redükleyici güç testi için EC 50 değerleri

Fungus İzolat Kodu (OBCC)	EC 50 (mg/ml)
OBCC 1047	1,34
BHT	3,03
Askorbik Asit	0,80

OBCC 1047 ekstraktının Fe^{+3}'ü indirgeme yeteneği standartlarla karşılaştırıldığında, EC 50 değerlerine göre askorbik asitin indirgeme gücünün BHT ve OBCC 1047 göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Ancak OBCC 1047 ile BHT kıyaslandığında OBCC 1047 nin BHT ye göre indirgeyici gücünün yaklaşık 3 kat daha başarılı olduğu görülmektedir.



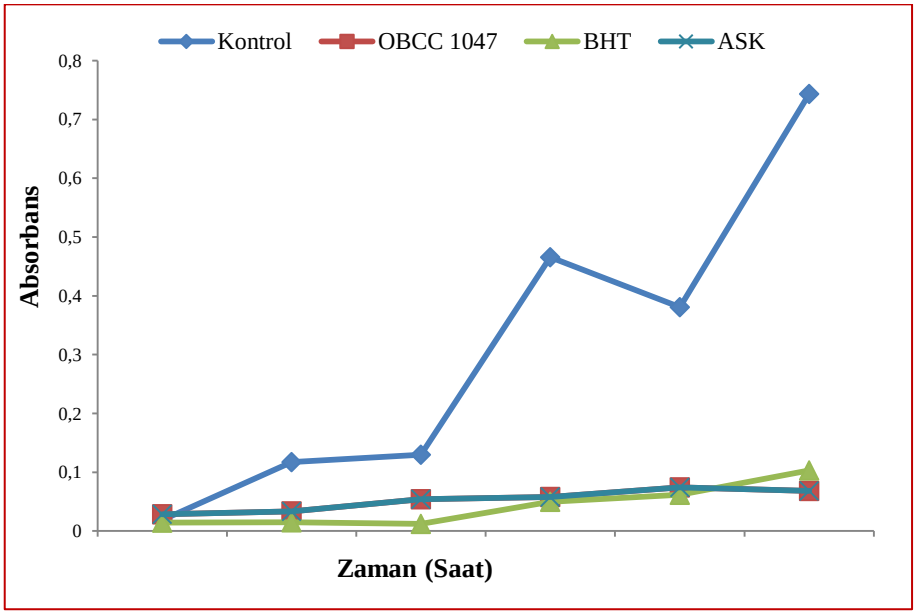
Şekil 4.15. OBCC 1047 ve sentetik antioksidanlara ait redükleyici güç absorbans değerleri



Şekil 4.16. Redükleyici güç testi A) Kör B) OBCC 1047

4.3.6. Ferriktiyosiyanat yöntemi ile lipit peroksidasyonu (FTC)

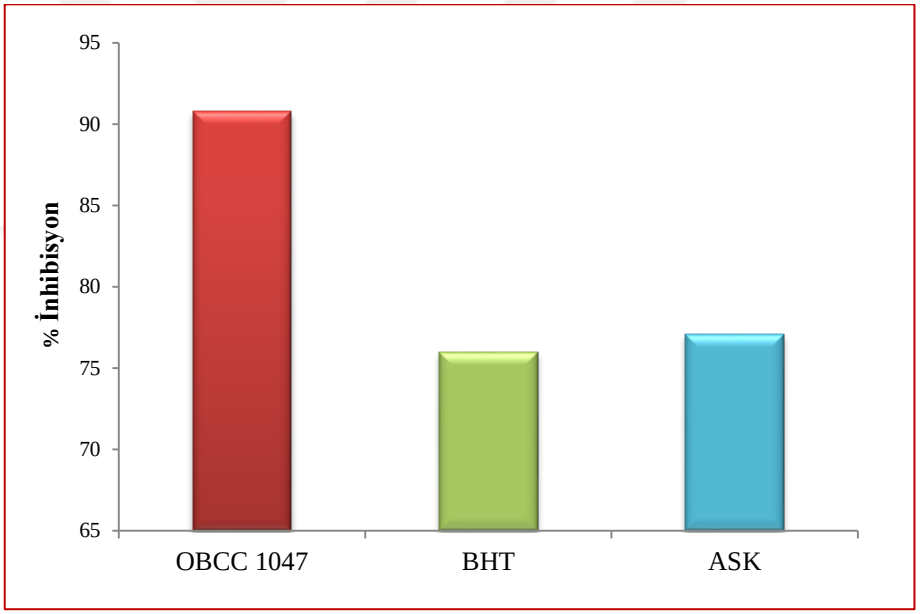
OBCC 1014 ve sentetik antioksidanların lipit peroksidasyonları ferriktiyosiyanat yöntemi (FTC) kullanılarak belirlenmiştir. Yöntemde demirklorür ve tiyosiyanat, peroksitler vasıtasıyla demir tiyosiyanat (kırmızı renk) üretmek için birbirleriyle reaksiyona girer (Beyhan ve vd., 2010). Spektrofotometrik olarak ölçülen kırmızı rengin absorbansı ortamdaki peroksit miktarını göstermektedir. Peroksit miktarı 120 saat boyunca 24 saatte bir örnek alınarak izlenmiştir. Şekil 4.16.' da gösterildiği üzere peroksit miktarı en yüksek absorbansa 120. saatte ulaşılmıştır. 120. saatteki absorbans değerleri kullanılarak % lipit peroksidasyonu hesaplanmıştır (Şekil 4.17.).



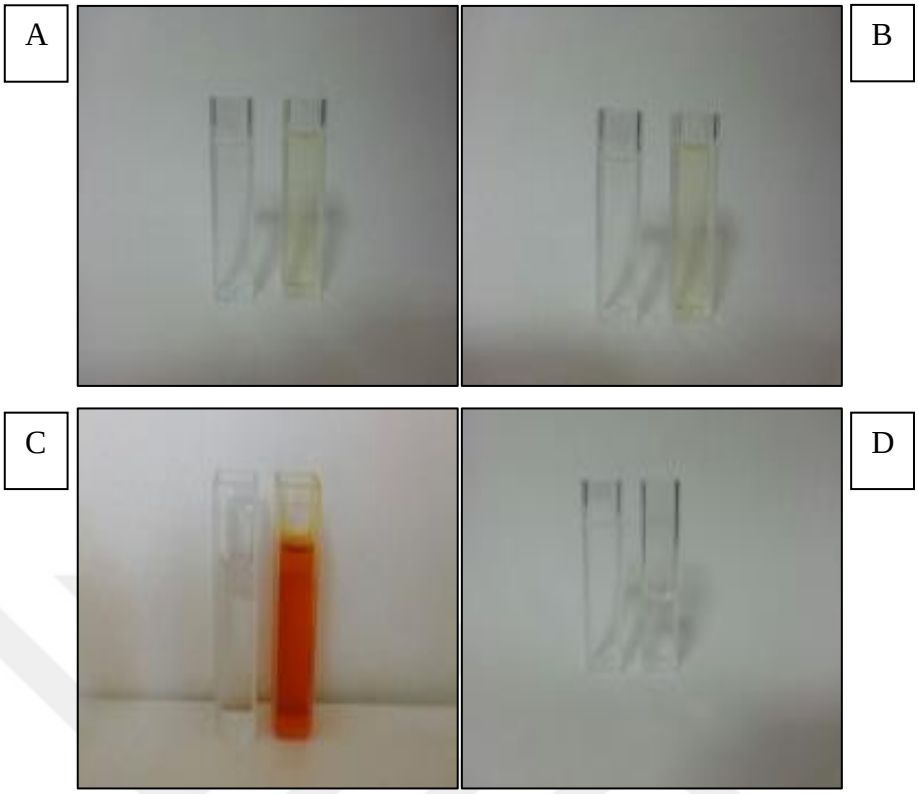
Şekil 4.17. 0-120 saatleri arasında Kontrol, OBCC 1047, BHT ve Askorbik asit absorbansları

Yapılan 120 saatlik takip sonucunda kontrolun absorbansı linoleik asitin perokside olmasıyla ortamda artan peroksit miktarıyla doğru orantılı olarak artmıştır. 120 saat sonunda maksimum peroksit miktarına ulaşmıştır. Ancak OBCC 1047 ve sentetik antioksidanlar içeren reaksiyon karışımlarında antioksidan maddeler görevlerini yaparak peroksitleri indirgemiş ve lipitlerin peroksidasyonunu azaltmışlardır. 120. Saatte kontrol absorbansı 0,73 e ulaşırken, OBCC 1047 absorbansı 0,06 da kalmıştır. BHT ve askorbik asitin absorbans değerleri sırasıyla 0,10 ve 0,27 dir.

Bu sonuçlara göre 120. saatteki yüzde inhibisyonlar hesaplandığında sırasıyla OBCC 1047 % 90,78, BHT % 75,99 ve askorbik asit %77,06 bulunmuştur. OBCC 1047 nin lipit peroksidasyonu inhibe etme yüzdesinin BHT ve askorbik asitten oldukça yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 4.18.).



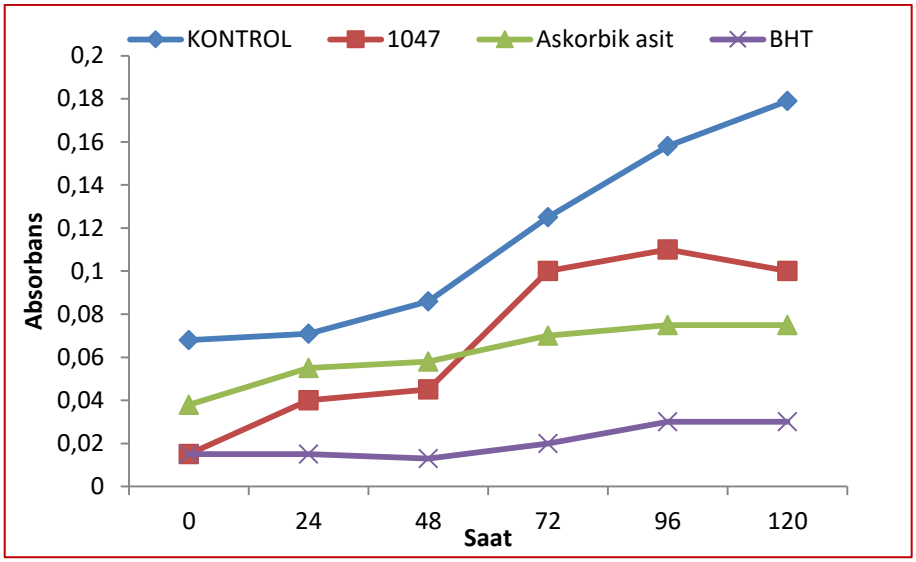
Şekil 4.18. Ferriktiyosiyanat yöntemi ile % lipit peroksidasyonu



Şekil 4.19. Ferriktiyosiyanat yöntemi ile % lipit peroksidasyonu A) Kör-OBCC 1047 B) Kör-BHT C)Kör- askorbik asit

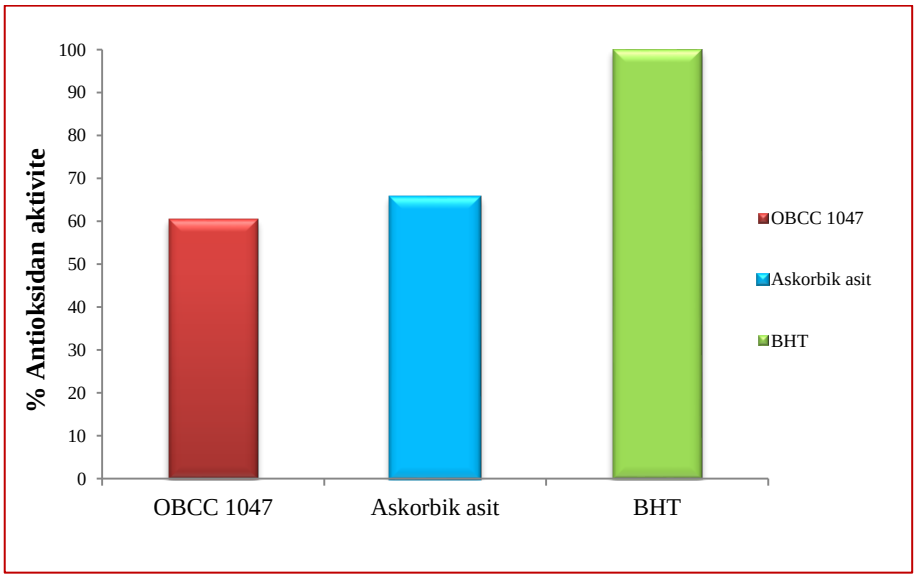
4.3.7. Tiyobarbutirik asit yöntemi ile lipit peroksidasyonu

Lipit peroksidasyon reaksiyonları birden fazla reaksiyonun ardışık olarak gerçekleşmesiyle meydana gelmektedirler. Tiyobarbutirik asit yöntemi lipit peroksidasyonu sonuna doğru gerçekleşen reaksiyonlarda açığa çıkan aldehit ve/veya ketonların belirlenmesiyle antioksidan aktivite tayini yapılan bir yöntemdir. Deneyde sentetik antioksidanların ve OBCC 1047'nin FTC yönteminde olduğu gibi 120 saat boyunca verdikleri absorbanslar takip edilmiştir. Absorbans değerlerinden elde edilen sonuçlar Şekil 4.20. da sunulmuştur.



Şekil 4.20. Tiyobarbutirik asit yöntemi ile /zamana bağlı absorbans değerleri

Başlangıçtaki ölçümlere bakıldığında reaksiyon henüz başlamadığı için kontrol ve deneylerin absorbansları birbirlerine oldukça yakındır. 120. saatin sonunda ise BHT nin absorbansı 0'a inerken OBCC 1047 ve askorbik asitin absorbasları daha yukarıda kalmıştır. Kontrol absorbansı ise malonaldehitin kararsız yapısı nedeniyle zamanla reaksiyonda alkol ve suya parçalanması reaksiyon karışımında kalmaması nedeniyle zamana bağlı azalmıştır. OBCC 1047, BHT ve askorbik asite ait a 120. saatte verilen absorbanslar 0,15, 0,13, 0,00' dır. 120. saatteki absorbanslar kullanılarak hesaplanan % antioksidan aktivite Şekil 4.20. de sunulmuştur.



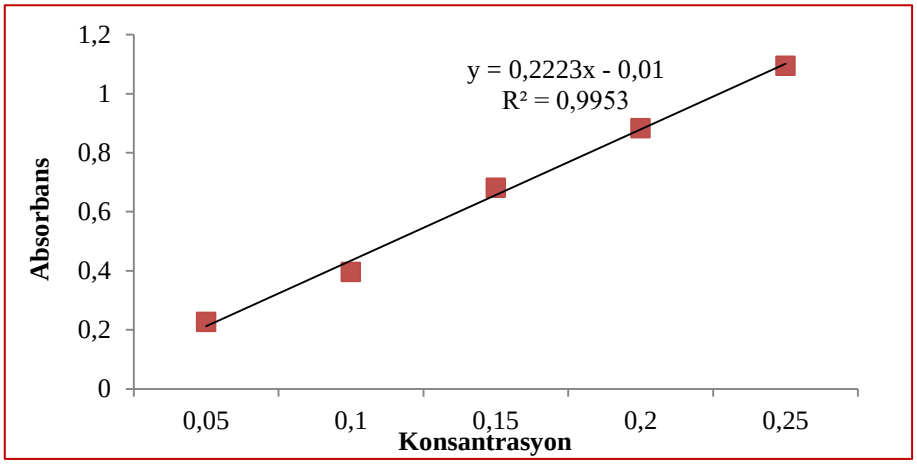
Şekil 4.21. Tiyobarbutirik asit yöntemi ile % antioksidan aktivite

Grafikte görüldüğü üzere sentetik antioksidan BHT 120. Dakikada lipit peroksidasyonunun nerdeyse tamamını %100 inhibe ederek en başarılı aktiviteyi göstermiştir. Askorbik asit % 65,55 ve OBCC 1047 % 60,41 ile birbirlerine çok yakın aktivite göstermişlerdir.

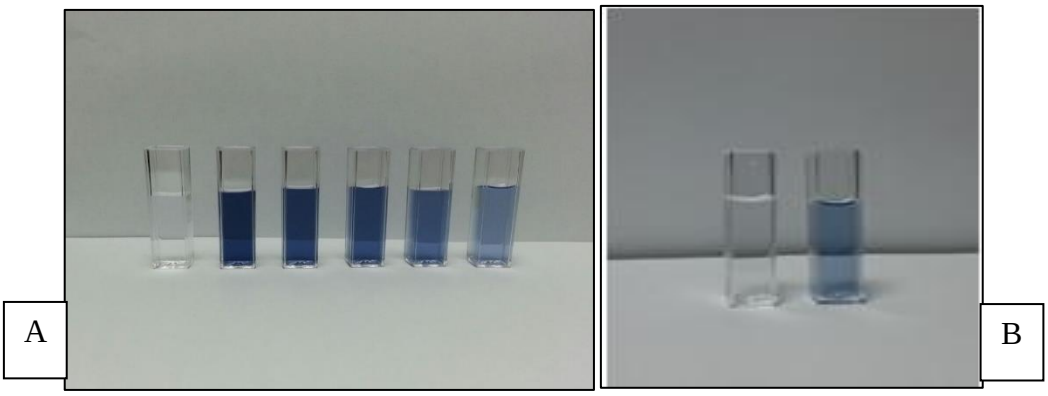
Ferrik tiyosiyanat ve tiyobarbitürik asit yöntemleri lpit peroksidasyonu reaksiyonlarında birlikte çalışan iki yöntemdir. FTC ilk oksidasyon ürünü olan perositleri ölçerken TBA, TBARS gibi peroksidasyonun son aşamasındaki ürünlerin miktarını ölçer. Genellikle birbirleriyle paralel sonuçlar verimektedirler. Ancak aralarında korelasyon olamdığı durumlarda mevcuttur. Lipit peroksidasyonu bir dizi reaksiyondan oluşmaktadır. Fungal ektrsaktın antioksidan aktivitesinin kaynağının izlediği yolun farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Lipit peroksidasyonu çalışmaları ıda endüstrisi açısından çok önemlidir. Sentetik gıda koruyucularının kanserojen etkileri çeşitli çalışmalarla belirlenditen sonra doğal gıda katkı maddeleri arayışı artmıştır. OBCC 1047 nin gösterdiği aktivitelerine bakılarak lipitlerin oksijen ile oksitlenmesinden hem reaksiyonların ilk aşamasında hemde son aşamasında lipitleri oksidasyondan koruduğu gözlemlenmiştir.

4.3.8. Fenolik Madde İçerik Tayini

OBCC 1047 nin kültür sıvısı bulunan toplam fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntem kullanılarak gallik asite ait lineer regresyon grafiği çizilmiştir (Şekil 4.23.) ve fenolik içerik sonuçları, 1,93 mg gallik asit eşdeğeri/g ekstrakt olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.2.).



Şekil 4.22. Gallik asit lineer regresyon grafiği

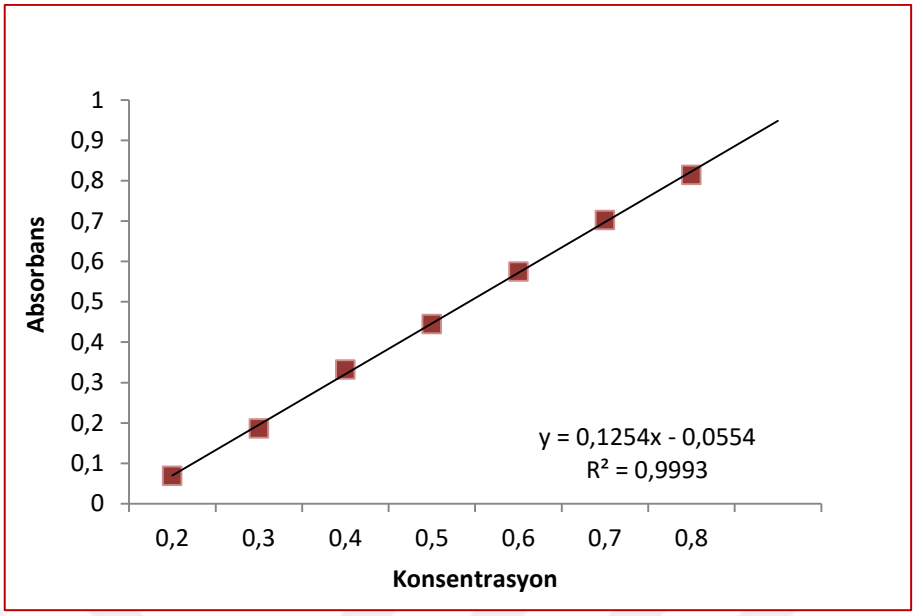


Şekil 4.23. Total fenolik asit içerik tayini A) Gallik asit standartları soldan sağa 1mg/ml 0.1mg/ml B) Kör-OBCC 1047

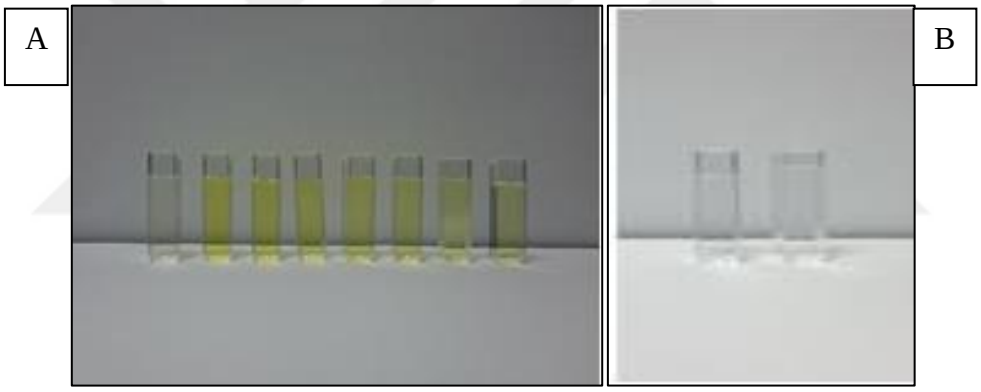
Matarlardaki antioksidan aktivite kaynagı biyoaktif bileşenlerin fenolik asitler olduğu düşünülmektedir. Fenolik bileşenlerin antioksidan aktiviteye olan etkileri redox potansiyellerinden kaynaklanmaktadır. Örneğin lipit peroksidasyonu inhibisyonu çalışmalarından Lung vd. (2011) *Armillaria mellea* ile yaptığı çalışmada lipit perosidasyonu inhibisyonunun fenolik içeriğe bağlı olarak arttığını belirlemiştir. Popa vd. de DPPH radikal süpürücü aktivite ile fenolik bileşenler arasında pozitif bir korelasyon olduğunu belirlemiştir. Ancak bu herzaman böyle olmaya bilir. 4.2 başlığı altında bahsedildiği gibi antioksidan aktiviteden fenolik bileşenler sorumlu olmayabilir. Ayrıca Yılmaz vd. (2017) *Pleurotus ostreatus* ile yaptığı çalışmada farklı besiyerinin fenolik bileşenleri etkilediğini belirlemiş ve mantarların biyoaktif özellikleri yüksek oranda mantar türlerine, yetiştirme koşullarına, ekstraksiyon prosesine ve substrat ortamına bağlı olduğunu bildirmiştir.

4.3.9. Flavonoid Madde İçerik tayini

Flavonoid içerik tayini aluminyum klorid kullanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar rutin eş değeri olarak hesaplanmıştır. Rutine ait lineer regresyon grafiği Şekil 4.24. de verilmiştir. OBCC 1047'nin rutin eş değeri total flavonoid içeriği 0,97 mg rutin eşdeğeri/g ekstraktbulunmuştur (Şekil 4.25.)



Şekil 4.24. Rutin lineer regresyon grafiği



Şekil 4.25. Total flavonoid içerik tayini A) Rutin standart eğrisi soldan sağa kör ve 1mg/ml - 0.1mg/ml arası konsantrasyonlar B) Kör ve OBCC 1047

Flavonoidlerin antioksidan olarak davranma kapasitesi moleküler yapılarına bağlıdır. Hidroksil gruplarının ve flavonoidlerin kimyasal konfigürasyonunda karakteristik olan diğer özelliklerin düzenlenmesi, serbest radikal süpürücü aktiviteleri ve antioksidan özellikleri için önemlidir (Yılmaz vd., 2017). Ayrıca Wong ve Chye fenolik içerik ve total flavonoid içerik tayinlerinde ekstraksiyon çözücüsününde önemli olduğunu bildirmişlerdir. olOH ve −COOH total fonksiyonel gruplarına sahip fenolik asit, flavonoidlerin polar çözücülerle kolayca ekstrakte edildiğini bildirmişlerdir. OBCC 1047 nin fenolik asit ve flavonoid yöntemleri apolar çözücü olan etil asetat ile gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle veriler diğer mantar ekstraktlarıyla karşılaştırıldığında düşüktür.

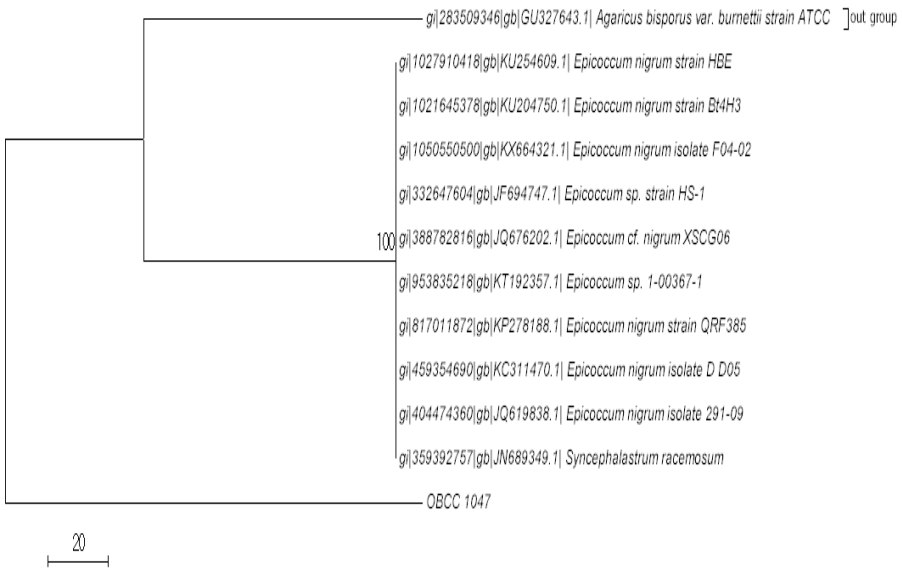
4.3.10. Makrofungus İzolatlarının Moleküler Yöntemlerle Tanılanması

Dizi analizi çalışmaları ile OBCC 1047 kodlu fungus izolatımızın rDNA-ITS dizilimi şu biçimde elde edilmiştir:

> OBCC 1047 -ITS4/5

CCTCCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGG
TCAAGAGTGTAAAAATGTACTTTTGGACGTCGTCGTTATGAGTGCAAAGCGCG
AGATGTACTGCGCTCCGAAATCAATACGCCGGCTGCCAATTGTTTTAAGGCGA
GTCTACACGCAGAGGCGAGACAAACACCCAACACCAAGCAGAGCTTGAAGGT
ACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCATGGAATACCAAGGGGCGCAATGT
GCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCA
TTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTG
TAACTATTATGTTTTTTCAGACGCTGATTGCAACTGCAAAGGGTTTGAATGTTG
TCCAATCGGCGGGCGGACCCGCCGAGGAAACGAAGGTACTCAAAAGACATGG
GTAAGAGGTAGCAGACCGAAGTCTACAAACTCTAGGTAATGATC

Belirlenen rDNA-ITS diziliminin GenBank: www.ncbi.nlm.nih.gov veri tabanında BLAST analizi yapılması sonucunda, OBCC 1047 kodlu makrofungus izolatımızın *Epicoccum nigrum* türüne (Accession# JQ 676202.1, KX 664321.1, KU254609.1) % 99 oranında benzediği belirlenmiştir. Şekil 4.28 OBCC 1047 kodlu izolatımızın GenBank: www.ncbi.nlm.nih.gov veri tabanında yer alan yakın ilişkili türler ile birlikte değerlendirilmesine olanak sağlayan filogenetik ağacı ifade etmektedir**.** Bu durum, geleneksel yöntemler ile de aynı tür olarak isimlendirdiğimiz OBCC 1047 kodlu izolatımızın identifikasyonunun doğrulanmasını sağlamıştır. İzolatın rDNA-ITS dizilimi, GenBank'a KY628656 erişim numarası ile kaydedilmiştir.



Şekil 4.26. OBCC 1047 kodlu fungus izolatının yakın ilişkili türler ile ilişkisini ifade eden filogenetik agaç

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Dünya üzerinde kaydedilmiş 125000 den fazla fungus türü olduğu bilinmektle birlikte bu sayı her geçen gün artmaktadır. Böylesine geniş bir tür çeşitliliği sunan mantarlar gerek insan diyetinin bir parçası olarak, gerek de farmosötik etkileri nedeniyle araştırıcıların ilgisini çekmiştir. Günümüzde birçok bilimsel yayında mantarların sahip olduğu biyoaktif bileşenlerin immünomodülatör, antikanser, antioksidan, antimikrobiyal özelliklerinin olduğu ayrıca kan basıncını ve kolesterol seviyesini düzenlediği, karaciğeri koruduğu bildirilmiştir. Mantarların bu etkilerinin sahip oldukları temel metabolitlerin sorumlu olduğu bilinmektedir. Bunlar genel olarak fenolik bileşenler ve flavonoidlerdir. Ancak bu özellikleri bilinmesine rağmen şimdiye kadar birkaç mantarın sahip olduğu antioksidan özellikleri ve biyoaktif bileşenleri tanımlanmıştır.

Bu çalışmada ilk olarak 132 fungal izolatın antioksidan aktiviteleri ve fenolik bileşenlerini belirleyerek, yüksek antioksidan aktiviteye sahip fungusların seçilmesi amacıyla kolay ve hızlı sonuç alınan bir yöntem olan DPPH radikal süpürücü aktivite yöntemi ve total fenolik içerik tayini yapılmıştır. DPPH yönteminde farklı kaynaklarda farklı reaksiyon karışımı kullanılması, alınan sonuçların farklı olması nedeniyle çalışma öncesi DPPH reaksiyon karışım oranının belirlenmesi amacıyla bir optimizasyon çalışması uygulamıştır. OBCC 1047, 1056 ve 1060 izolatları ile yapılan çalışmada reaksiyon karışımında konsantrasyon antioksidan aktivitenin arttığı görülmüştür. Yapılacak tarama çalışmasında amaç izolatları doğru bir şekilde ayrıştırmak ve gerçek yüksek aktivite gösteren izolatları belirlemek olduğundan en düşük konsantrasyon oranı 0,1:2,9 ile çalışmanın devam edilmesine karar verilmiştir.

Antioksidan aktivitenin belirlenmesi için nasıl ki DPPH yönteminde bir standart yoksa, kültür tipi ve besi yeri hakkında da bir standart bulunmamaktadır. Bu nedenle kültür tipini belirlemek amacıyla tasarlanan çalışmada farklı kaynaklarda yer alan Czapek Dox 1, Czapek Dox 2, HAGEM ve PMP besiyerleri kullanılmış, statik ve çalkalamalı kültür tipinde büyütülen organizmaların antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir.

Elde edilen istatiksel analiz verilerine göre statik kültür tipinde ve PMP besiyerinde DPPH radikali % giderim ve toplam fenolik madde (gallik asit eşdeğeri mg/ml) değerleri açısından istatistiksel anlamda daha yüksek değerlere sahip olduğunu belirlendiğinden çalışmaya PMP besiyeri ile devam edilmiştir.

Çalışmada 132 fungal izolat hem kültür sıvılarının hemde hücre kitleleri antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Makrofungus hücre kitlelerinin antioksidan aktiviteden sorumlu hücre içi metabolitlerinin ya da yapısal bileşenlerinin aktivitelerinin değerlendirilebilmesi için öncelikle bu bileşenlerin uygun çözücü ve / veya yöntemlerle ekstrakte edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle çeşitli kaynaklarda farklı araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen maserasyon, mikrodalga ve ultrases yöntemlerinin antioksidan aktiviteye etkisi araştırılmıştır. Ultrases yönteminin antioksidan aktiviteden sorumlu hücre içi bileşenlerin ekstraksiyonu amacı ile kullanılan diğer yöntemlere göre oldukça düşük verime sahip olduğu ve maserasyon ve mikrodalga uygulamalarından elde edilen verilerin ise istatistiksel anlamda farklı olmadığı belirlendiğinden, çalışmaya mikrodalga yöntemi ile devam edilmiştir.

Yapılan ön çalışmalarda alınan veriler kullanılarak 132 fungal izolatın DPPH radikali giderimi (%) ve toplam fenolik madde içeriği (mg/ml gallik asit eşdeğeri) belirlenmiştir. Hücre kitlelerinde yapılan çalışmada 1128, 2002, 2003, 5049, 5501, 5502 izolatlar pozitif kontrollerler rekabet edecek seviyede bulunmuşlardır (Şekil 4.3). Ancak genel olarak tüm deney sonuçları incelendiğinde hücre kitlesi ekstraktlarının tamamından elde edilen DPPH radikal giderim aktiviteleri, kültür sıvılarından elde edilenlere oranla daha düşük değerlerdedir. Bu anlamda bu çalışmada kullanılan tüm izolatların hücre dışı sekonder metabolitlerinin hücre kitlelerine göre daha yüksek antioksidan aktivite potansiyeline sahip olduğu söylenebilir. Deneye alınan fungal izolatların kültür sıvılarının önemli kısmının pozitif kontrollerden yüksek inhibisyon değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Ancak OBCC 1047 kodlu izolat diğer organizmalara kıyasla en yüksek aktiviteyi göstererek daha sonraki çalışmalara devam etmek üzere seçilmiştir. Mantarlarda yapılan antioksidan aktivite çalışmalarında genellikle karpafor külttür sıvılarının değişik çözücülerle ekstraktları kullanılmıştır. Hücre kitlesi kullanılan çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle çalışamamızın hücre kitlesi kısmı gelecek çalışmalar kaynak olması bakımından önemlidir.

Antioksidan aktivite tayini amacıyla geliştirilen birçok yöntem vardır ve genellikle antioksidan aktivite tayinlerinde birlikte kullanılırlar. Farklı analiz yöntemleri, reaksiyon mekanizmaları, oksidan türleri, reaksiyon koşulları ve nihai sonuçların ifade edilme biçimi açısından birbirinden farklı olduklarından tercih edilirler (Koleva vd.,2002). Bu nedenle seçilen OBCC 1047 kodlu izolatın antioksidan aktivitesi beta karoten – linoleik asit yöntemi ile toplam antioksidan aktivite, redükleyici güç, ABTS radikal katyon renksizleştirme, metal şelatlayıcı aktivite, ferrik tiyosiyanat yöntemi ile lipid peroksidasyonu yöntemleri ile de sorgulanmıştır.

İlk olarak 1047'nin DPPH radikal giderim aktivitesi hesaplanmıştır ve EC50 değeri 0,15mg/ml bulunmuştur. Beta karoten linoleik asit yönteminde ise 120 dakika boyunca absorbanslar izlenmiş kontrolun absorbansı hızla düşerken, BHT ve 1047 nin absorbansında ki düşüş yavaş ilerlemiştir. BHT ve 1047 betakaroteni lipit peroksidazların oksidatif etkisinden koruyarak rengini kaybetmemesini sağlamış ve sırasıyla % 86,12 ve % 83 toplam antioksidan aktivite göstermişlerdir. ABTS radikal katyon renksizleştirme yönteminde sırasıyla, OBCC 1047 %98,44, BHT %99,08, askorbik asit %99,05 oranında % radikal katyon giderimlerimi göstermişlerdir. Ayrıca sonuçlar güçlü bir antioksidan olduğu bilinen tokoferol eşdeğeri olarak hesaplanmış ve 3,38 mg/ gr ekstrakt bulunmuştur. OBCC 1047'nin % metal şelatlayıcı aktivitesi % 83,5 BHT ve askorbik asitin sırayla 89,53ve 80,1 bulunmuştur. EDTA eşdeğeri metal şelatlayıcı akivite ise 4,59 EDTA eşdeğeri mg/g ekstaktdır. Redükleyici güç deneyinde ise OBCC 1047 ve senetik antioksidanların EC50 değerleri OBCC 1047 1,34 mg/ml, BHT 3,03 mg/ml, askorbik Asit 0,80 mg/ml'dir. OBCC nin lipit peroksidasyon reaksiyonlarını inhibisyonundaki etkisi ferrik tiyosiyanat ve tiyobarbitürik asit kullanılarak hesaplanmıştır. Yapılan 120 saatlik çalışmada kontrol absorbansı 0,73 e ulaşırken, OBCC 1047 absorbansı 0,06 da kalmıştır. BHT ve askorbik asitin absorbans değerleri sırasıyla 0,10 ve 0,27 dir. Bu sonuçlara göre 120. saatteki yüzde inhibisyonlar hesaplandığında sırasıyla OBCC1047 % 90,78, BHT % 75,99 ve askorbik asit %77,06 bulunmuştur. Tiyobarbiturik asit yönteminde ise % inhibisyonlar OBCC 1047 % 60,41, BHT %99 ve askorbik asit % 65,55 olarak elde edilmiştir. Yapılan fenolik ve flavonoid içerik tayinlerinde ise OBCC 1047 nin fenolik içerği 1,9 mg gallik asit eşdeğeri/g ekstrakt ve total flavonoid içeriği 0,97 mg rutin eşdeğeri/g ekstrakt olarak bulunmuştur.

132 gibi sayıca fazla fungal izolata ait kültür sıvıları ve hücre kitleleri ile yaptığımız çalışma sonuçları mantarlarda antioksidan aktivite konusunda geniş bir bilgi kaynağı olmuştur. Literatürde hücre kitleleri ile yapılan çalışma sayısı çok azdır. 132 izolata ait antioksidan aktivite ve fenolik içerik sonuçları hücre kitleleriyle çalışacak araştırıcılara yol gösterecektir. Bu organizmalar arasından seçilen her bir organizmanın farklı antioksidan aktivite yöntemleri ile aktivitelerinin doğrulanması gelecekte yapılcak çalışmalar arasında olacaktır. OBCC 1047 nin ise yüksek antioksidan aktivite gösterdiği diğer yöntemlerle de kanıtlanmıştır. Fenolik ve flavonoid içerik bakımından yüksek aktivite göstermediği belirlenmiştir. OBCC 1047'de antioksidan aktiviteye neden olan biyoaktif bileşikler kuvvele muhtemeldir ki fenolik asit ya da flavonoidler değildir. Bu nedenle gelecekte yapılacak çalışmalarla OBCC 1047 de antioksidan aktiviteye neden olan biyoaktif bileşenin belirlenmesi ve optimizasyonu gerekmektedir. OBCC 1047 ile yapılan moleküler çalışamalar ile OBCC 1047 nin *Epicocum nigrum*'a filogenetik olarak yakın olduğu belirlenmiştir. Literatürde *Epicocum nigrum* ile yapılmış tek bir antioksidan aktivite çalışması bulunduğundan yaptığımız antioksidan aktivite çalışmaları literatüre bu yönde katkı sağlayacaktır.

Bilindiği gibi antioksidanların çok geniş bir kullanım alanları vardır. OBCC 1047' nin biyoaktif bileşeni belirlendikten sonra gerekli optimizasyonlar yapılarak ilk olarak küçük ölçekli fermentörlerde denemelerle endüstriyel prosesler ön hazırlık niteliğinde çalışmalar yapılması öncelikli olmalıdır. Çünkü BHT, BHA gibi sentetik antoksidanların antikanserojen oldukları literatür de kanıtlanmştır ve İngiltere' nin bebek mamalarında BHT ve BHA kullanımı kesinlikle yasaklanması gibi birçok Avrupa ülkesi sentetik katkı maddeleri konusunda yeni yasal düzenlemeler getirmiştir. Doğal kaynaklı ve sağlıklı beslenmenin önemli hale geldiği günümüzde optimizasyon ve fermentör ölçekli çalışmalarla alınan verimlere doğru orantılı olarak doğal kaynaklı gıda koruyucuları, kozmetik katkı maddeleri ya da gıda takviyeleri elde edilmesi mümkündür. Bunların dışında antioksidan aktivitenin antikanser, antiproliferatif aktivitele korelasyon gösterdiği çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Grigalius ve Petrikaite 2017). Bu bilgiden yola çıkılarak OBCC 1047 nin antikanser ve antiproliferatif etkinliğinin belirlenmesi üzerine çalışmalar tasarlanabilir. OBCC 1047 nin antioksidan aktivitesi gelecek çalışmalar için umut vaad etmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Akata, I., Ergönül B., Kalyoncu F. 2012, Chemical compositions and antioxidant activities 16 wild edible mushroom species grown in Anatolia, International Journal of Pharmacology, 8(2), 134-8

Albayrak, S., Sağdıç ,O., Ahmet, A., 2010, Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 26(4): s 401-409

Ames, B., Mark, KS., Hagen, TM., 1993, Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States, Vol. 90, p. 7915-7922.

Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Öxyürek, M., Çelik, SE., Bektaşoğlu, B., Berker, KI., Özyurt, D., 2007, Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay, Molecules, 12, 1496-1547

Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, KM., Özyürek, M., Güçlü, K., 2013, Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report), Pure and Applied Chemistry, Vol. 85, No. 5, pp. 957–998.

Arora, DS., Chandra, P., 2011, Antioxidant activity of *Aspergillus fumigatus*, International Scholarly Research Network Volume, p:1-11

Bast, A., Haenen, G., Goelmen. JA., 1991, Oxidants and antioxidants: State of the art. American Journal of Medicine, 91(3 Suppl 3), 2-13.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Bag, GC., Devi, PG., Bhaigyabati T., 2015, Assessment of total flavonoid content and antioxidant activity of methanolic rhizome extract of three Hedychium species of Manipur Valley, International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, Article No. 28, Pages: 154-159.

Benzie, IFF., Strain, JJ., The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay, Analytical Biochemistry Volume 239, Issue 1, 15, p:70-76

Blois, SM., 1958, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, Nature volume 181, pages 1199–1200

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, Food Science and Technology, 28: p 25-30.

Cemeroğlu, B., Acar, J., 1986, Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi, Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No:6

Büyüktuncel, E., 2013, Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler, Marmara Pharmaceutical Journal 17: 93-103, 2013.

Chang, ST., 1997, World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes (Berk.)* sing. in China, International Journal of Medicinal Mushrooms, 1: p. 291-300.

Chang, LW., Yen, WJ., Huang, SC., Duh, P.D. 2002. Antioxidant activity of sesame coat". Food Chem., 78, 347-54.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Chang, ST., Wasser SP., 2012. The role of culinary-medicinal mushroom on human welfare with a pyramid model for human health". Int. J. Med. Mushrooms, 12, 95-134.

Cheung, L.M., Cheung P.C.K., Ooi V.E.C., 2003, Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts, Food Chemistry, 81, 249–55.

Ciz, M., Cˇízˇová, H., Denev, P., Kratchanova, M., Slavov, A., Lojek, A., 2010, Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables, Food Control 21, p 518–523.

Dimitrova, DZ., Nedialkov, P., Kitanov G., 2010, Radical scavenging and antioxidant activities of methanolic extracts from Hypericum species growing in Bulgaria, Pharmacognosy Magazine 6(22): 74–78.

Dündar, Y., Aslan, R., 1999, Hücre moleküler statüsünün anlaşılması ve fizyolojik önem açısından radikaller, antioksidanlar, İnsizyon Cerrahi Tıp Bilim Dergisi, 2(2): 134-142.

Dündar, A., Yesil O.F., Acay H., Okumus V., Ozdemir S., Yildiz A. 2012. "Antioxidant properties, chemical composition and nutritional value of Terfezia boudieri (Chatin) from Turkey", Food Science and Technology International, 18(4), 317- 28.

Erdoğan, SS., Soylu, MK., Başer, KHC., 2017, Bazı Yabani Mantarların Antioksidan Özellikleri, Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi, Cilt 6, 254-260 2017

Ghasemzadeh, A., Ghasemzadeh, N., 2011, Flavonoids and phenolic acids: role and biochemical activity in plants and human, Journal of Medicinal Plants Research Vol. 5(31), pp. 6697-6703, 23

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Gökbulut, A., Şarer, E., 2008, Karotenoitler ve sağlık, Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi, 37 (3) 235 - 256.

Gülçin, İ., 2006, Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid), Toxicology 217, p:213–220

Gürkan, AS., Dündar,OB., (2005), Coenzyme Q10, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 34 (2), 129-155.

Helle, R.A., Jesper, B.N., Fleming, N., 1997, Antioxidative enzyme activities in human erithrocytes, Clinical Chemistry, 43 (4): 562-68.

Jorge, E., Wong-Paz, Contreras-Esquivel, C., Muñiz-Marquez D., Belmares R., Rodriguez, R., Flores, P., Aguilar, N. 2014. Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidants from semiarid plants, American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 9 (3), 299-310

Kalyoncu, F., Oskay,M., Kalmış, E., 2010, Bazı yabani makrofungus misellerinin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi, The Journal of Fungus, 1(1) s:1-8

Karabulut,H., Gülay, MŞ., 2016, Antioksidanlar, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 1 (1): 65-76.

Karadağ, A., Özçelik, B., Saner, S., 2009, Review of methods to determine antioxidant capacities, Food Analytical Methods, 2:41–60.

Kedare, SB., Singh, RP., 2011, Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay, Journal of Food Science and Technology, 48(4):412–422

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kızıl G., Kızıl,M., Yavuz, M., Emen, S., Hakimoğlu F., 2008, Antioxidant Activities of Ethanol Extracts of Hypericum triquetrifolium. and Hypericum scabroides, Pharmaceutical Biology ,Vol. 46, No. 4, pp. 231–242

Koca, N., Karadeniz, F., 2003, Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. Gıda Mühendisliği Dergisi, 32-37.

Kolaç, T., Gürbüz, P., Yeriş, G., 2017, Doğal ürünlerin fenolik içeriği ve antioksidan özellikleri, İ.Ü. Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi, Cilt 5, Sayı 1 1-17.

Kozarski, M., Klaus, A., Jakovlijevic, D., Todorovic, N., Vunduk, J., Petrovic, P., Niksic, M., Vrvic, Mm., Griensven L., 2015, Antioxidants of edible mushrooms, *Molecules*, *20*(10), 19489-19525.

Kumar, S., 2014, The importance of antioxidant and their role in pharmaceutical science - a review, Asian Journal of Research in Chemistry and Pharmaceutical Sciences, 1(1), 27 - 44.

Lussignoli, S., Fraccaroli, M., Andrioli, G., Brocco, G., Bellavite, P., 1999, A microplate-based colorimetric assay of the total peroxyl radical trapping capacity of human plasma. Anal Biochem 269:38–44

Malpure, PP., Shah AS., Juvekar, AR., 2006 Antioxidant and anti-inflammatory activity of extract obtained from Aspergillus candidus MTCC 2202 broth filtrate, Indian Journal of Experimental Biology, vol. 44, no. 6, pp. 468–473,

Mohan, SC., Balamurugan V., Salini, ST., Rekha, R., 2012, Metal ion chelating activity and hydrogen peroxide scavenging activity of medicinal plant Kalanchoe pinnata, Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 4(1):197-202.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Molyneux, P., 2004, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, Songklanakarin Journal of Science and Technology, Vol. 26 No. 2 p: 211-219

Nimse, SB., Pal, D., 2015, Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms The Royal Society of Chemistry Advances, 5, 27986–28006.

Nizamlıoğlu, NM., Nas, S., Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler; yapıları ve önemleri, 2010, Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi Cilt:5, No: 1, 2010 (20-35)

Orhan I., Üstün O., Determination of total phenol content, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition in selected mushrooms from Turkey, Journal of Food Complimental Analyse. 24. 386–90, (2011).

Padayatty, SJ., Katz A., Wang, Y., Eck, P., Kwon O., Lee, J., Chen, S., Corpe,C., Dutta, A., Dutta, SK., Levine, M., 2003, Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease pevention, Journal of the American College of Nutrition, Vol. 22, No. 1, 18–35.

Prior R.L., Wu X., Karen S., 2005, Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements, Journal of Agriculture. Food Chemistry, 53:4290-4302

Prieto, MA., Vázquez. JA., Murado, MA., 2015, Crocin bleaching antioxidant assay revisited: application to microplate to analyse antioxidant and pro-oxidant activities, Food Chemistry, 167:299-310.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Sarıkürkcü, C., Tepe, B., Yamaç M. 2008, Evaluation of the antioxidant activity of four edible mushrooms from the Central Anatolia, Eskisehir - Turkey: Lactarius deterrimus, Suillus collitinus, Boletus edulis, Xerocomus chrysenteron", Bioresource Technology, 99, 6651–5.

Shekhar, TC., Anju, G., 2014, Antioxidant activity by dpph radical scavenging method of *Ageratum conyzoides* Linn. Leaves, American Journal of Ethnomedicine, Vol. 1, No. 4, 244-249

Temel, Y., Bozkuş, T., Karagözoğlu, Y., Çiftci, M., 2017, Gutatyon redüktaz (gr) enziminin japon bıldırcın (*Coturnix coturnix japanica*) eritrositlerinden saflaştırılması ve karakterizasyonu, Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 7(3): 143-150.

Tetikçok, R., Özçetim, M., Çeltek, NY., Oktay, G., Ünlü, MŞ., 2015, Lipoik asit, Çağdaş Tıp Dergisi, 5(3): 206-209

Throat, ID., Jagtap, DD., Mohopatra, D., Joshi, DC., Sutar, RF., Kapdi, SS., 2013, Antioxidants, their properties, uses in food products and their legal implications, International Journal of Food Studies Volume 2 pages 81-104

Townsend, DM., Tew, KD., Tapiero, H., 2003, The importance of glutathione in human disease, Biomed Pharmacother, 57(3-4): 145- 155.

Trıpathı, A.M., Tiwary, BN. 2013, Biochemical constituents of a wild strain of *Schizophyllum commune* isolated from Achanakmar-Amarkantak Biosphere Reserve (ABR) , India, World J Microbiol Biotechnol. 29,1431–42.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Türkoglu, A., Kıvrak, I., Mercan, N., Duru, M.E., Gezer, K., Turkoglu H. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of *Morchella conica* Pers., African Journal of Biotechnology, 5 (11), 1146-50.

Vamanu, E., Nita, S. 2013, Antioxidant capacity and the correlation with major phenolic compounds, anthocyanin, and tocopherol content in various extracts from the wild edible *Boletus edulis* mushroom, Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International, Article ID 313905, 11 pp

Wang, R., Leohr, C., Fischer, K., Dashwood, W., Greenwood, J., Ho, E., David E. Ashktorab, H., Dashwood M., Dashwood, R. 2013. Epigenetic inactivation of endothelin-2 and endothelin-3 in colon cancer, International Journal of Cancer, 132, 1004–12

Zhao, H., Dong, J., Lu, J., Chen, J., Li, Y., Shan, L., Lin, Y., Fan, W., Gu, G., 2006, Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (Hordeum vulgare L.), Journal of Agriculturel Food Chemistry, 20;54(19):7277-86.

Zohri, AA., Moharram, AM., El-Ghani, OAA., 2017, Antioxidant potentialities of some strains belonging to endophytic, entomopathogenic and saprophytic fungi, European Journal of Biological Research 7 (1): 76-85