Bazı Makrofungus İzolatlarının Antimikrobiyal, Antioksidan ve UV Koruyucu Aktivitelerinin Belirlenmesi

Mustafa Kemal Babayiğit

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Mayıs 2018

Scaning of Antimicrobial, Antioxidant and UV Protecting Activity Properties of Some Mushroom Isolates

Mustafa Kemal Babayiğit

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

May 2018

Bazı Makrofungus İzolatlarının Antimikrobiyal, Antioksidan ve UV Koruyucu Aktivitelerinin Belirlenmesi

Mustafa Kemal Babayiğit

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

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Yamaç

Mayıs 2018

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Mustafa Kemal Babayiğit'in YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Bazı Makrofungus İzolatlarının Antimikrobiyal, Antioksidan ve UV Koruyucu Aktivitelerinin Belirlenmesi" 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 : Doç. Dr. Buket Kunduhoğlu

Üye : Doç. Dr. Nalan Yılmaz Sarıözlü

Üye : Doç. Dr. İlknur Dağ

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Sevil Pilatin

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 klavuzuna göre. Prof.Dr. Mustafa Yamaç danışmanlığında hazırlamış olduğum "Bazı Makrofungus İzolatlarının Antimikrobiyal, Antioksidan ve UV Koruyucu Aktivitelerinin Belirlenmesi" başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalrında bilimsel etik ilke ve kurallarına uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik 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. 04/06/2018

Mustafa Kemal Babayiğit

İmza

ÖZET

Makromantarların antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri çok ilgi çeken bir araştırma konusu olup, araştırmacılar her geçen gün yeni bir aktivite keşfi yapmaktadır. Bu çalışmada 10 adet makrofungus örneğinin kültür sıvılarının etil asetat ekstraktlarının antioksidan, antimikrobiyal ve ultraviyole ışığa karşı koruma etkileri taranmıştır. Yapılan tarama sonucunda çalışılan makrofungus örneklerinin hiçbirinde antimikrobiyal aktiviteye rastlanmamış olmakla birlikte, fenolik madde içeriklerinde *Schizophyllum commune* için 5,28 mg Gae/g, redükleyici güç aktivitesinde *Schizophyllum commune* için 1mg/ml' de 0,557 absorbans ve metal şelatlayıcı aktivitede *Trametes hirsuta* için 8,87 mg/ml EC50 değeri hesaplanmıştır. Bunların haricinde ultra viyole ışığa karşı koruma etkileri araştırılan izolatlardan *Schizophyllum commune* ultraviyole ışığa karşı %64.6 koruma göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Makrofungus, Antioksidan aktivite, Antimikrobiyal aktivite, Ultraviyole koruyucu aktivite

SUMMARY

Very exiting studies were performed about antioxidant and antimicrobial activities of mushrooms, still scientists are discovering new antioxidant and antimicrobial activities of mushroom extracts. In this study, ethyl acetat extracts of 10 macrofungi samples were scanned for their antimicrobial, antioxidant and UV protecting abilities. After scanning for antimicrobial activity with disc diffusion method, no activity were found in any mushroom extract. The ethyl acetat extracts of *Schizophyllum commune* (D63) showed 5,28 mg GAE/g total phenolic content and 0,557 absorbance with 1mg/ml concentrations on reduction power ability. *Trametes hirsuta* showed 8,87 mg/ml IC50 of metal chelating ability. *Schizophyllum commune* (M131) showed 64.6 % protection against UV light.

Keywords: Macrofungus, Antioxidant activity, Antimicrobial activity, Ultraviolet protecting activity

TEŞEKKÜR

Tez danışmanlığımı üstlenerek çalışmalarımın planlanmasında ve yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen ve maddi ve manevi her türlü kolaylığı sağlayan sevgili danışmanım Prof. Dr. Mustafa YAMAÇ'a sonsuz teşekkür ederim.

Bana mikrobiyolojinin temellerini öğreten laboratuvar arkadaşlarım Dr. Ayşe Betül KARADUMAN ve Bilal DOĞAN'a, çalışmamın deney kısmında beni yalnız bırakmayan Bahar Gülce KORKMAZ ve Göksu CEYLAN başta olmak üzere bütün Fungikültür Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Bu süreçte benden desteğini asla esirgemeyen, maddi ve manevi her türlü kolaylığı sağlayan canım annem ve babam Sema BABAYİĞİT ve Mehmet Nazif BABAYİĞİT'e ve ablam Deniz BABAYİĞİT'e teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET……vi

SUMMARY……vii

TEŞEKKÜR……viii

İÇİNDEKİLER……ix

ŞEKİLLER DİZİNİ……xii

ÇİZELGELER DİZİNİ……xv

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ……xvi

1. GİRİŞ VE AMAÇ……1

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI……2

2.1. Oksidanlar ve Serbest Radikaller……2

2.2. Antioksidanlar……3

2.2.1. Antioksidan enzimler……5

2.2.2. Fenolik ve flavonoid maddeler……7

2.2.3 Diyete bağlı antioksidanlar……8

2.3. Antioksidan Tayin Yöntemleri……9

2.3.1. Hidrojen atom transferi (HAT) yöntemleri……9

2.3.1.1. Oksijen radikal absorbans kapasitesi tayini (ORAC)……10

2.3.1.2. Total radikal yakalayıcı aktivite tayini (TRAP)……10

2.3.1.3. Karotenoid (Krosin) ağartma yöntemi……10

2.3.2. Elektron transferi (ET) yöntemleri……11

2.3.2.1. Folin-Ciacalteu reaktifi kullanılarak total fenolik madde tayini……11

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.3.2.2. ABTS radikal giderici aktivite tayini (TEAC).....11

2.3.2.3.Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) süpürücü aktivite tayini.....11

2.3.2.4. Ferrik redükleyici antioksidan aktivite tayini (FRAP).....12

2.4. Makromantarların Antioksidan Önemi ve Yapılan Bazı Çalışmalar.....13

2.5. Antimikrobiyal Aktivite Belirleyici Yöntemler.....14

2.5.1. Agar disk difüzyon metodu.....15

2.5.2. Antimikrobiyal radiant yöntemi.....15

2.5.3. Diğer difüzyon yöntemleri.....16

2.6. Ultraviyole(UV) Koruyucu Aktivite.....17

3. MATERYAL VE YÖNTEM.....19

3.1. Materyal.....19

3.1.1. Makrofungus İzolatları 19

3.1.2. Antimikrobiyal Aktivite ve UV' ye Karşı Koruma Tayininde Kullanılan Test Mikroorganizmaları..... 20

3.1.3. Kullanılan besiyerleri ve çözeltiler.....21

3.2.Yöntem.....25

3.2.1. Makrofungus izolatlarının aktiflenmesi..... 25

3.2.2. İnokülant hazırlanması ve inkübasyon.....25

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2.3. Kültür Sıvısı ekstraksiyonu.....25

3.2.4. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları.....26

3.2.5. Antioksidan aktivite çalışmaları.....27

3.2.5.1. Total fenolik madde tayini.....27

3.2.5.2. DPPH radikal giderici aktivite.....28

3.2.5.3. Redükleyici güç tayini.....29

3.2.5.4. Beta karoten- linoleik asit antioksidan aktivite tayini.....29

3.2.5.5. Metal şelatlayıcı aktivite.....30

3.2.6. UV koruyucu aktivite çalışmaları.....31

4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....32

4.1. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları.....32

4.2. Antioksidan Aktivite Çalışmaları.....33

4.2.1. Total fenolik madde tayini.....33

4.2.2. DPPH radikal giderici aktivite.....37

4.2.3. Redükleyici güç tayini.....42

4.2.4. Beta karoten- linoleik asit antioksidan aktivite tayini.....45

4.2.5. Metal şelatlayıcı aktivite tayini.....47

4.3.UV Koruyucu Aktivite Tayini.....51

5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....54

KAYNAKLAR DİZİNİ.....55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil **Sayfa**

2.1. Oksidatif etkiye karşı geliştirilen savunma mekanizmaları.....4

2.2. SOD enzimlerinin çalışma mekanizması.....5

2.3. Peroksidaz enziminin GSH ile çalışma prensibi.....5

2.4. Katalazların Compound 1 ile girdikleri tepkime ile H_2O_2 yıkımı.....6

2.5. LMWA enzim grubunun etki mekanizması.....6

2.6. Flavonoid maddelerin sınıflandırılması.....7

2.7. Askorbik asitin indirgenmiş moleküler formları.....8

2.8. Tokoferolün hidroksil radikalleri üzerine etkisi.....9

2.9. HAT yöntemlerinde gerçekleşen tepkime.....9

2.10. DPPH 'ın yapısına hidrojen alması ile kararlı hale gelmesi.....12

2.11. Ferrik demirin elektron alarak $Fe^{+2'}$ ye indirgenmesi.....13

2.12. Sinerjetik etki değerlerinin hesaplanmasında MIC değerlerinin formülasyonu.....16

2.13. Farklı disk difüzyon yöntemlerinin karşılaştırılması A. Agar disk difüzyon yöntemi, B. Agar kuyu yöntemi, C. Agar dolgu difüzyon yöntemi.....17

3.1. İzolatların PDA besiyerinde morfolojileri.....20

3.2. Toplam fenolik madde miktarı tayininde kullanılan gallik asit standart eğrisi.....27

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil **Sayfa**

3.3. Askorbik asitin değişik konsantrasyonlarda verdiği renk değişimi.....28

3.4. EDTA standart eğrisi.....28

3.5. *Ganoderma japonica* türüne ait antimikrobiyal aktivite çalışması.....30

4.1 *Trametes hirsuta* türüne ait antimikrobiyal çalışma.....32

4.2. İzolatların gallik asit eşdeğerlerine göre karşılaştırılması.....33

4.3. Değişik izolatların Fenolik madde içeriklerine göre renk değişimleri.....34

4.4. İzolatların DPPH süpürücü aktivitelerinin karşılaştırılması.....35

4.5. M131 kodlu izolatın konsantrasyonlara göre renk değişimi.....37

4.6. D54 kodlu izolatın konsantrasyonlara göre renk değişimi.....38

4.7. SV19 kodlu izolatın konsantrasyonlara göre renk değişimi.....38

4.8. M88 kodlu izolatın konsantrasyonlara göre renk değişimi.....38

4.9. M133 kodlu izolatın konsantrasyonlara göre renk değişimi.....39

4.10. D63 kodlu izolatın konsantrasyonlara göre renk değişimi.....39

4.11. D43 kodlu izolatın konsantrasyonlara göre renk değişimi.....39

4.12. M96 kodlu izolatın konsantrasyonlara göre renk değişimi.....40

4.13. D33 kodlu izolatın konsantrasyonlara göre renk değişimi.....40

4.14. M105 kodlu izolatın konsantrasyonlara göre renk değişimi.....40

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil **Sayfa**

4.16. İzolatların değişik konsantrasyonlarda (0,1-1mg/ml) askorbik asit ve BHT ile karşılaştırılması.....42

4.17. D63 kodlu izolat ve BHT giderimleri.....43

4.18. Redükleyici güç yönteminde konsantrasyonlara göre renk değişimi.....43

4.19.İzolatların Beta karoten renk açılımın zamana bağlı grafikleri.....46

4.20. *Trametes versicolor* (M96) askorbik asit ve BHT ile karşılaştırılması.....47

4.21. İzolatların % inhibasyon değerlerine göre eğilim grafiği.....48

4.22. Metal şelatlama aktivitesinde çalışılan izolatların konsantrasyona göre verdiği renk değişimleri.....49

4.23. *Schizophyllum commune* (M131)' nin UV ışığa maruz kalma zamanına göre koruma aktivitesi.....51

4.24. *Schizophyllum commune* (M133)' nin UV ışığa maruz kalma zamanına göre koruma aktivitesi.....52

4.25. Askorbik Asit UV ışığa maruz kalma zamanına göre koruma aktivitesi.....52

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge **Sayfa**

3.1. Aktivite taraması için denenen makrofungus izolatları.....19

3.2. Makrofungus etil asetat ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesinin denendiği standart mikroroganizma suşları.....21

3.3. Çalışma kapsamında kullanılan çözeltiler ve kullanım amaçları.....23

3.4. Çalışma sırasında kullanılan cihazlar, marka ve modelleri.....24

4.1. İzolatların gallik asit eşdeğerlerine göre fenolik madde içerikleri.....34

4.2. Yüksek fenolik madde içerikli izolatların 1mg/ml konsantrasyonda bazı çalışmalar ile GAE bakımından karşılaştırılması.....36

4.3. Yüksek aktivite gösteren örneklerin bazı diğer çalışmalarla kıyaslanması.....45

4.4. İzolatların konsantrasyona bağlı % metal şelatlama aktivitleri.....48

4.5. *Trametes hirsuta* (D43) ve Edta için EC50 değerleri.....48

4.6. Yüksek aktivite gösteren D43 kodlu izolatın bazı diğer çalışmalarla kıyaslanması.....50

4.7. UV'ye maruz kalma saniyelerine göre *Saccharomyces cerevisiae* kültürlerindeki koloni sayısı.....52

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
O_2	Oksijen
H_20	Su
Cu	Bakır
Mn	Mangan
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
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
GSH	Glutatyon
GS	Tiyil radikali
ROO	Peroksil radikaller
H2O2	Hidrojen peroksit
Fe(III)	Ferrik demir
Fe(II)	Ferrus demir
SCN	Tiyosiyanat
AAPH	2,2-azobis (2- aminopropan) diklorit
SOD	Süperoksit dismutaz
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit
GSSG	Oksitlenmiş glutatyon
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Simgeler	Açıklama
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
HAT	Hidrojen atom transferi
ROS	Reaktif oksijen türleri
ET	Elektron transferi
EC50	Etkin konsantrasyon 50
g	Gram
ml	Mililitre

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Birçok kültür tarafından besin ve ilaç kaynağı olarak kullanılsa da, mantarların özellikle dünyanın doğu kesiminde sağlık ve besin kaynağı olarak kullanılmaları Çin'de M.Ö. 100 yılına kadar uzanır. Sadece besinsel ve medikal amaçlarla değil, bazı toniklerde, çay yapımında ve kullanılan bitkisel formülleri destekleyici olarak da kullanılmıştır. Bazı akciğer, böbrek ve soğuk algınlığı hastalıklarının tedavilerinde kullanılması çok eski zamanlara dayanır (Chang vd., 1996). Mantarların hipertansiyon, hiperkolesterol ve kansere karşı terapik etkilerinin olduğu da daha önce rapor edilmiştir (Bobek ve Galbavy, 1999) Bütün bu veriler ışığında makrofungusların antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla araştırmacılar sayısız çalışma yapmaktadır. Bu çalışmaların bir kısmı antimikrobiyal ve antioksidan çalışmalar olmakla birlikte, antitümör ve antikanser çalışmaları da mevcuttur. Makromantarların birçok çalışılmamış alanları olup, özellikle UV koruyucu aktivite alanında yapılan literatür taramasında bir sonuç elde edilememiştir. Bu çalışmanın amacı, bu çalışma kapsamında yer alan makrofungus izolatlarının antimikrobiyal, antioksidan ve UV koruyucu aktivitelerini belirleyip hangi aktivitelerinin daha iyi olduğunu belirlemek ve sorgulamaktır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Oksidanlar ve Serbest Radikaller

Reaktif oksidanlar zincirleme reaksiyonlara sebep olan radikal ve radikal olmayan oksijen formlarını tanımlayan genel bir terimdir. Serbest radikaller ise yörüngelerinde eşleşmemiş elektron barındıran ve bağ yapmaya müsait olan kimyasal moleküllerdir (Ke Cui vd., 2004).

Serbest radikaller normal metabolik sürecin sonunda açığa çıkabildiği gibi, sigara içmek, endüstriyel kimyasallar sonucu, atmosferdeki serbest radikallerin alımı, x-ray' e maruz kalma gibi nedenlerden dolayı da organizmaya etki edebilirler (Kumar, 2011).

Serbest radikaller temel olarak 3 ana grup altında incelenebilir;

a) Dahili kaynaklar
b) Çevresel kaynaklar
c) Psikolojik kaynaklar

Dahili kaynaklara solunum sistemi yoluyla, enzimatik reaksiyonlar yoluyla, fagositoz yoluyla ve sitokrom P_{450} sistemi sonucu açığa çıkan serbest radikaller örnek verilebilir (Kumar, 2011).

Çevresel kaynaklar oksijenin organik materyallerle enzimatik olmayan yollardan etkileşimi sonucunda açığa çıkarlar. Bunlara örnek olarak ise radyasyon, anestezik ve pestisit ilaçlar ve bütün çevre kirliliği yaratan faktörler verilebilir (Kumar, 2011).

Diğer bir kaynak olarak psikolojik sorunlar gösterilmiş olup, stres, duygusal bozukluk ve hastalıkların mental yan etkileri de metabolik olaylara etki ettiği için, serbest radikal açığa çıkmasında rol oynadığı söylenmiştir (Kumar, 2011).

Serbest radikaller 4 ana sınıf altında toplanmıştır.

a)Hidroperoksil Radikaller

Hidroperoksil radikaller, süper oksit radikallerin proton almış hali olup, kimyasal formülleri HO_2' dir. Bu tepkime oksijene bir proton bağlanması ile gerçekleşmektedir. HO_2 molekülleri doymamış yağ asitlerinden ve tokoferollerden hidrojen çalma eğiliminde olduğu için, yağ asitlerinin yapısının bozulması ve lipit peroksidasyonunda önemli rol oynarlar (Kumar, 2011).

b)Süperoksit Radikaller

Süperoksitler hem oksidan hem de redüktan olarak etki gösterirler. Sülfür, askorbik asit ve NADPH gibi molekülleri oksitleme yeteneğine sahipken sitokrom C ve metal iyonlarını redükleme özelliğine sahiplerdir. Yapılarına proton almış haldeyken oldukça etkili bir oksidan molekül haline gelebilirler (Gebicki ve Bielski, 1981)

c)Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit, süper oksitlerin bağ yapma yeteneğine sahip olan moleküllerinden ortaya çıkmakla birlikte, kararlı bir yapıda olduğu için serbest radikal olarak kabul edilmese de hücre membranından kolay geçmesi ve DNA' nın yapısını bozması gibi özellikleri nedeniyle güçlü bir radikaldir. Sayısız peroksidaz enzimi hidrojen peroksitleri substrat olarak kullanıp parçalayabilir fakat hidroperoksil radikallerin artışıyla birlikte artan hidrojen peroksit, sürekli maruz kalma durumlarında göze çarpan bir radikaldir (Kumar, 2011).

d)Oksijen Radikalleri

Bu tür oksidanlar tek halde dolaşan O veya bunun üç bağ yapmış hali olan O_3 gibi radikallerden oluşurlar. Etki mekanizmaları diğer oksidanlarla aynıdır (Kumar, 2011).

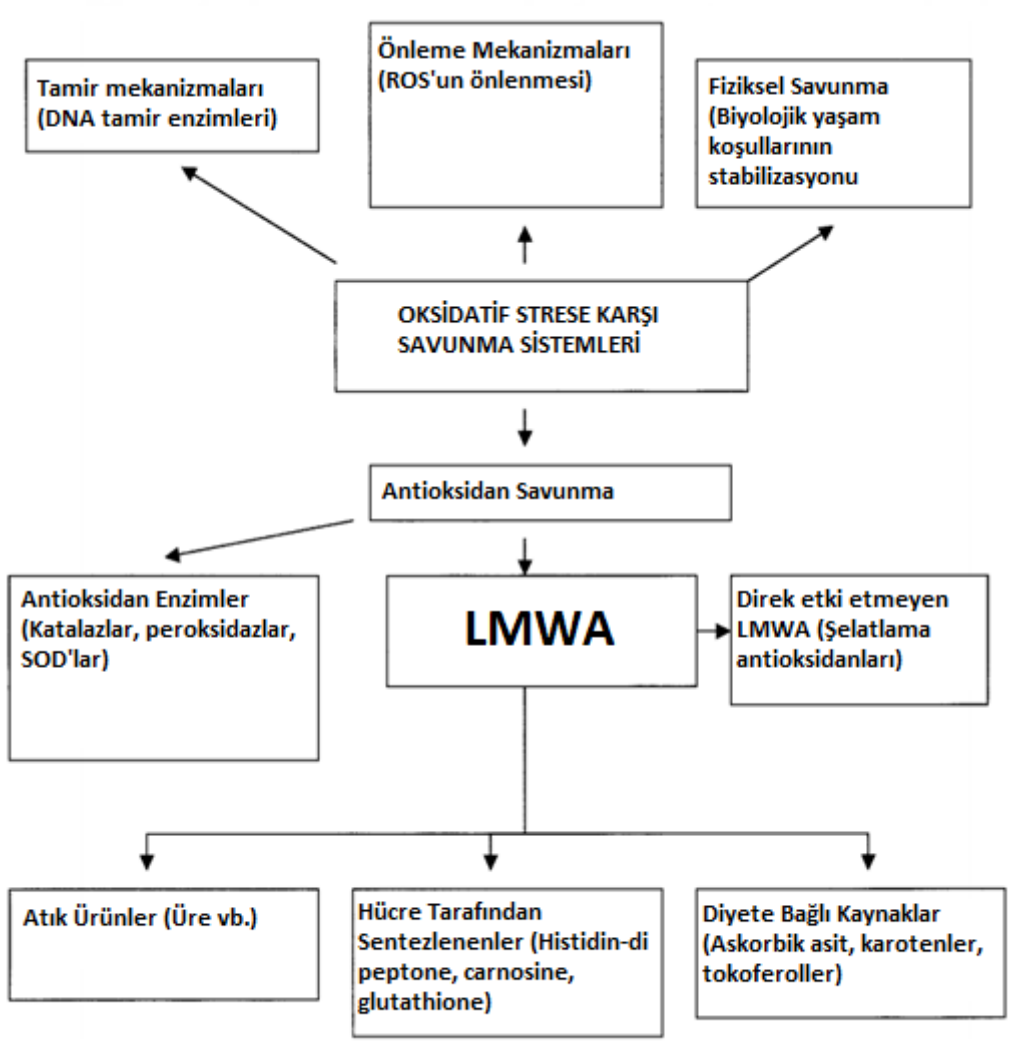
2.2. Antioksidanlar

Sayısız kaynaktan sürekli maruz kalınan oksidatif stres organizmaları bir savunma mekanizması oluşturmaya itmiştir. Oksidatif stresle baş edebilmek için her organizma ayrı bir savunma evrimi gerçekleştirmiştir. Antioksidanlar bu konuda organizmaların geliştirdiği en

önemli silahlardan birisidir. Çünkü direk olarak oksidanları ortadan kaldırma özelliğine sahiplerdir. Organizmaların antioksidan üretiminin, atmosferdeki oksijen konsantrasyonun sürekli değişiminden kaynaklı evrimsel bir süreçte geliştiği öngörülmektedir (Kohen ve Nyska 2002).

Antioksidanlar 2 ana grup altında toplanırlar. Bunlardan birisi antioksidan enzimleri, diğeri ise düşük molekül ağırlıklı antioksidanlardır (LMWA). Bundan sonraki düşük molekül ağırlıklı antioksidanları ifade etmek için "LMWA" kullanılacaktır.

Oksidatif strese karşı organizmaların geliştirdiği savunma sistemleri şekil 2.1.' de verilmiştir.



Şekil 2.1. Oksidatif etkiye karşı geliştirilen savunma mekanizmaları (Kohen ve Nyska 2002).

2.2.1. Antioksidan enzimler

Antioksidan enzimleri, süperoksit dismutaz (SOD) enzim ailesini içinde barındıran gruptur. SOD enzimleri protein yapıları ve kofaktörleri açısından diğer proteinlerden ayrılırlar. Örneğin Cu-Zn SOD enzimi ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında bol miktarda bulunan, aktif yapısında aktif bağlanma grubu bulunduran bir enzimdir. Mn SOD ise prokaryotik hücrelerde ve ökaryotik hücrelerin mitokondrisinde bulunan bir antioksidan enzim çeşididir. (Kohen ve Nyska 2002). SOD enzimlerinin etki mekanızması şekil 2.2. 'de sunulmuştur.

$$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Şekil 2.2. SOD enzimlerinin çalışma mekanizması

SOD enzimleri tarafından parçalanma tepkimesi sonunda açığa çıkan H_2O_2 moleküllerinin parçalanmasında bu sefer peroksidaz ailesine üye enzimler devreye girer. Peroksidaz enzimleri, LMWA ailesinden olan Glutamik asit sistein-glisin (GSH) ve bu molekülün oksijen almış hali GSSG ile birlikte çalışarak H_2O_2 yıkımında görev (Kohen ve Nyska 2002). Peroksidaz enzimlerinin GSH ve GSSG ile girdiği tepkime şekil 2.3. 'de verilmiştir.

$$2GSH + H_2O_2 \xrightarrow{Peroxidase} GSSG + 2H_2O$$

Şekil 2.3. Peroksidaz enziminin GSH ile çalışma prensibi

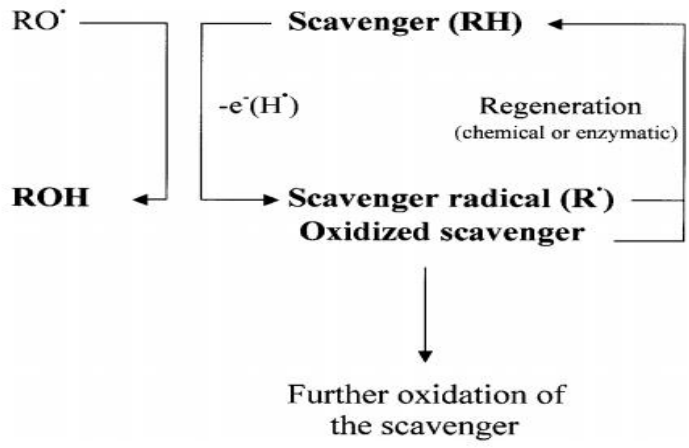
Bir diğer önemli antioksidan enzimi katalaz olarak gösterilmiştir. Katalaz enzimleri yapılarında bulunan Fe^{+4} grupları sayesinde yüksek derecede antioksidatif etkiye sahiptirler. Bu grup "Bileşik 1"(Compound 1) olarak adlandırılır ve aynı zamanda katalaz aktivitesi için substrat görevi görür (Kohen ve Nyska 2002). Katalazların Compound 1 ile girdikleri tepkime şekil 2.4. 'de verilmiştir.

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} \{\text{Compound 1}\}$$
$$\{\text{Compound 1}\} + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2H_2O$$
$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} O_2 + 2H_2O$$

Şekil 2.4. Katalazların Compound 1 ile girdikleri tepkime ile H_2O_2 yıkımı

Diğer destekleyici antioksidan enzimleri de hücre içinde yer alır. Örneğin bunlardan birisi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz' dır. Bu enzim peroksidaz tepkimelerinde NADPH vererek GSSG moleküllerinin GSH moleküllerine indirgenmelerini sağlar (Kohen ve Nyska 2002).

LMWA molekülleri ise düşük moleküler kütleli olup, basit fakat önemli bir role sahiptirler. Bu antioksidanlar düşük moleküler kütlelerinden ötürü hücre membranlarında çabuk geçerek hücre içinde ulaşılması zor olan biyolojik hedeflere daha kolay ulaşırlar. GSH bu gruba ait bir enzimdir. Bu tür enzimler elektron donörü olarak görev aldıklarından dolayı serbest oksijen radikallerine (ROS) çabuk etki mekanizmasına sahiptirler. Daha sonra kimyasal veya enzimatik yollarla aldıkları elektronu geri verip tekrar oksidatif tepkimeye girerler (Kohen ve Nyska 2002). Genel olarak bu grubun etki mekanizması şekil 2.5.' de verilmiştir.



Şekil 2.5. LMWA enzim grubunun etki mekanizması

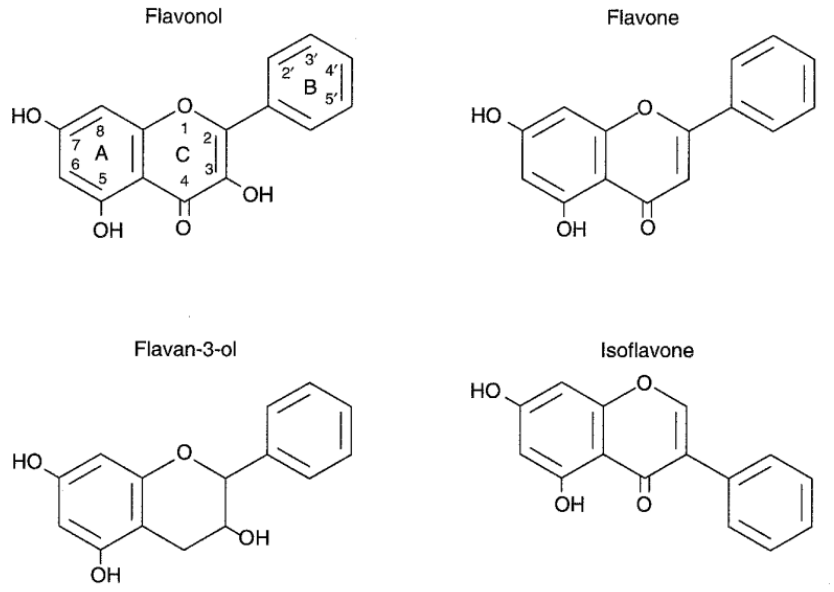
2.2.2. Fenolik ve flavonoid maddeler

Fenolik maddeler sekonder metabolitlerin büyük bir grubudur. Hidroksil gruplarının pozisyonu ve taşıdıkları yan gruplara göre sınıflandırılırlar. Bu grubun en büyük elemanı C6-C3-C6 yapısal iskeletine sahip olan flavonoid grubudur (Podsedek vd., 2005).

Fenolik maddeler, özellikle flavanoidler antioksidan aktiviteleri, kılcal damar koruyucu aktiviteleri ve antitümör aktiviteleri açısından oldukça zengin bir etkiye sahiptirler (Wenzel ve Daniel, 1999).

Fenolik maddelerin etki mekanizması taşıdıkları hidroksil gruplarının pozisyonuna göre değişiklik gösterse de elektron alma eğilimleriyle önemli bir antioksidan etkiye sahiplerdir.

Flavonoid maddeler temel olarak 4 grup altında toplanırlar. Bunlar flavonoller, flavoneler, flavanoller ve isoflavonoller olarak adlandırılmıştır (Rice-Evans vd., 1997). Bu grupların yapısı şekil 2.6. 'da verilmiştir.

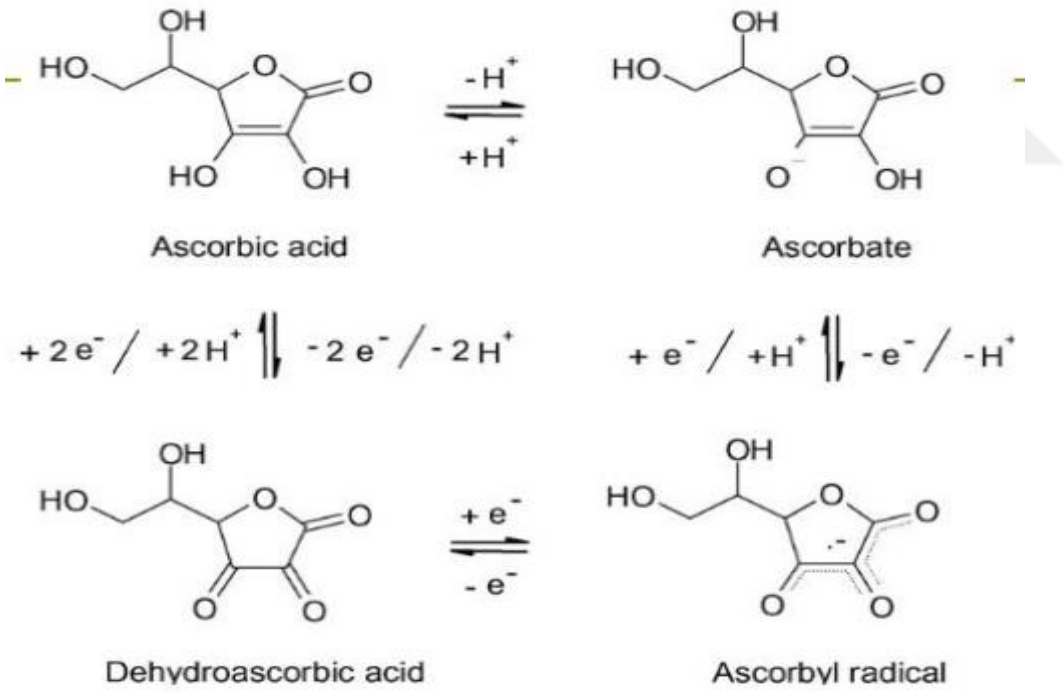


Şekil 2.6. Flavonoid maddelerin sınıflandırılması

2.2.3. Diyete bağlı antioksidanlar

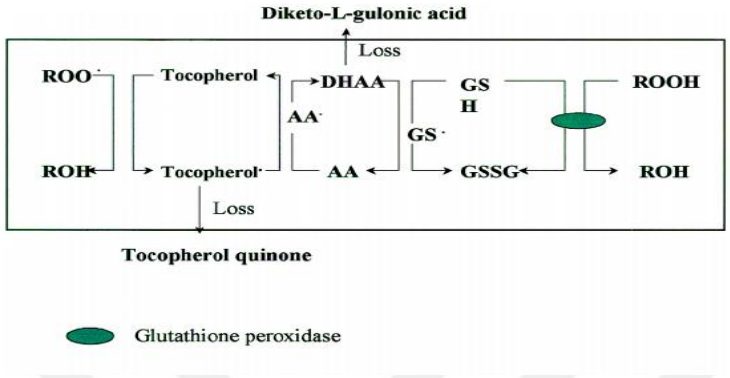
Bu gruptaki antioksidanlar insanlar tarafından üretilemeyip, sadece bitkiler, mantarlar bazı hayvanlar tarafından üretilebilen ve dışarıdan alınmasından başka bir şekilde tedarik edilemeyen antioksidanlardır.

Bu grupta verilebilecek en iyi örneklerden biri askorbik asittir. Askorbik asit suda çözülebilen bir yapıya sahip olup, çoğu enzim için kofaktör görevi oynar. Askorbik asit 2 elektron verebilme yapısında olup, 1 elektron verdiğinde askorbil, 2 elektron verdiğinde dehidroaskorbata indirgenir. Daha sonra GSH ve NADPH gibi elektron vericilerden elektron alarak, eski haline yükseltgenir. Askorbik asit yüksek elektron verme özelliğine sahip bir molekül olduğu için çok güçlü bir antioksidan aktiviteye sahiptir (Kohen ve Nyska 2002). Askorbik asitin indirgenmiş molekül yapıları şekil 2.7. 'de verilmiştir.



Şekil 2.7. Askorbik asitin indirgenmiş moleküler formları

Diyete bağlı antioksidanların bir diğeri E vitaminini de içinde barındıran tocoferol ailesi antioksidanlarıdır. Genel olarak lipit peroksidasyonunu inhibe etmek üzere hidroksil radikalleri (ROO) üzerinde etki gösterirler. Bu etkinin gösterildiği bir bağıntı şekil 2.8. 'de verilmiştir.



Şekil 2.8. Tokoferolün hidroksil radikalleri üzerine etkisi

2.3. Antioksidan Tayin Yöntemleri

Antioksidan tayin yöntemleri genel olarak 2 kategori altında toplanmıştır. Bunlardan ilki hidrojen atom transferine dayanan HAT yöntemi, diğeri elektron transferine dayanan ET yöntemidir (Karadağ vd., 2009). Bundan sonraki bölümlerde bu kısaltmalar kullanılacaktır.

2.3.1. Hidrojen atom trasnferi (HAT) yöntemleri

HAT yöntemi kullanılan metodlarda antioksidan moleküllerin hidrojen vererek serbest radikali kararlı hale getirmesine dayanır (Karadağ vd., 2009). Bu bağlamda genel olarak gerçekleşen tepkime şekil 2.9. 'da verilmiştir.

$$AH + X^{\bullet} \rightarrow XH + A^{\bullet}$$

Şekil 2.9. HAT yöntemlerinde gerçekleşen tepkime

2.3.1.1. Oksijen radikal absorbans kapasitesi tayini (ORAC)

ORAC peroksil radikallerden kaynaklı oksidasyonların, antioksidan inhibisyonunu ölçmek için kullanılır ve hidrojen atom transferine dayalı inhbisyon değerlerini yansıtır (Ou vd., 2001). Yöntemde diklorit (AAPH) veya Cu^{+2}-H_2O_2'den çıkan hidroksil radikalleri, kullanılan florasan solüsyondan açığa çıkan oksitlenebilir protein substratı ile tepkimeye girerek florosan özellikte olmayan bir son ürün üretir. Bu da florasan solüsyonun renginin gitgide azalmasıyla ortaya ölçülebilecek bir değer çıkarır. Deney 37 C°' de gerçekleştirilir. (Karadağ vd., 2009).

2.3.1.2. Total radikal yakalayıcı aktivite tayini (TRAP)

TRAP deneylerinde serbest radikal sağlayıcısı olarak yine AAPH kullanılır. ORAC deneylerinden farkı, florasan solüsyonu olarak B-phycoerythrin yerine R-phycoerythrin kullanılmasıdır. Bu yöntem antioksidan içerikli maddelerin serbest radikal ve florosan probu arasındaki aktiviteyi engelleme kapasitesine dayanır. Sonuçlar yine florometrik olarak 495 nm ve 575 nm aralığında gözlenir (Karadağ vd., 2009).

2.3.1.3. Karotenoid (Krosin) ağartma yöntemi

Karotenoidlerin oksidasyon yoluyla renkleri açılır. Oksidasyon ışık veya ısı yoluyla veya peroksil radikalleri ile gerçekleştirilebilir . Bu yöntemde karotenidlerin bu renk açılması antioksidan maddelerin varlığında önlenmesi ya da yavaşlatılması hedef alınır. Genellikle beta karotenin kullanıldığı yöntem, kullanılan antioksidanın ortamdaki serbest radikallere hidrojen vermesiyle onları kararlı hale getirmesi ve oksidatif stresi ortadan kaldırması amacıyla yapılır (Karadağ vd., 2009).

2.3.2. Elektron transferi (ET) yöntemleri

HAT yöntemi kullanılan metodlarda antioksidan moleküllerin hidrojen vererek serbest radikali karalı hale getirmesine dayanır (Karadağ vd., 2009).

2.3.2.1. Folin-Ciacalteu reaktifi kullanılarak total fenolik madde tayini

Folin-Ciacalteu çözeltisinin kimyasal yapısı tam olarak bilinmemekle birlikte phosphomolybdic/phosphotungstic asit kompleksi içerdiği düşünülmektedir. Yöntemin çalışma prensibi olarak alkali ortamda fenolik bileşikler ve molibdenum arasında bir elektron alışverişi olduğu düşünülmektedir. Bu tepkime de ortaya spektrofotometrik olarak 750 nm' de ölçülebilecek bir renk değişimi çıkarmaktadır (Magalhaes vd., 2008). Fenolik maddeler, Folin-Ciacalteu reaktifi ile sadece bazik ortamda renk vermektedir.

2.3.2.2. ABTS radikal giderici aktivite tayini (TEAC)

TEAC yöntemi ilk olarak Miller (1993) tarafından bulunmuş olup, zamanla geliştirilmiş ve yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. ABTS bir peroksidaz substratı olup, H2O2 varlığında serbest peroksil radikalleri ortaya çıkarır ve bu aşamada renk verir. Bu renk değişimi spektrofotometrik yöntemlerle 600-750 nm aralığında okunabilir.

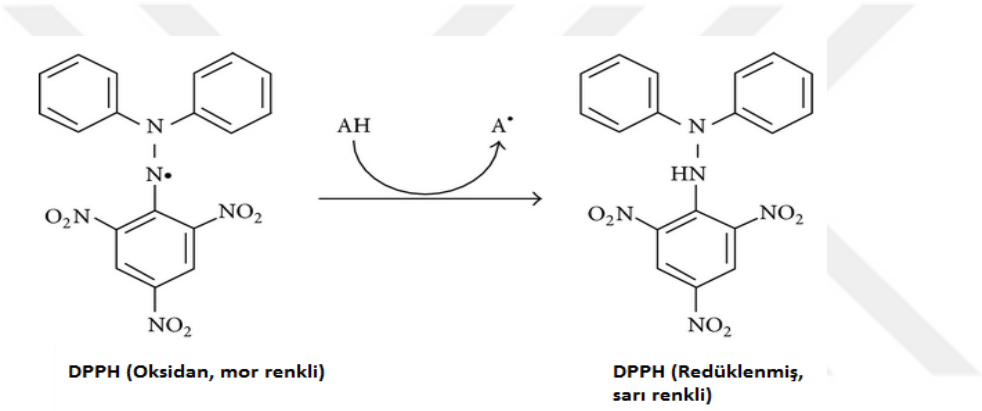
ABTS radikalinin suda ve organik materyallerde çözünebilir olması suda ve lipofilik yapıda çözünen maddelerin çalışılmasında kolaylık sağlamaktadır (Arnao 2000).

2.3.2.3. Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) süpürücü aktivite tayini

Son zamanlarda DPPH süpürücü aktivite, antioksidan aktivite tayininde çok popüler bir yer almıştır. Bunun nedeni deneyin kolay ve duyarlı olmasından kaynaklanmaktadır. Deney, antioksidan maddelerin hidrojen donöru olarak kullanılmasına dayanır. DPPH molekülü yörüngesine 1 adet hidrojen alarak kararlı hale gelir. DPPH kendine özgü mor bir renk verir ve 517 nm dalga boyunda yüksek absorblama yeteneğine sahiptir. Bu nedenle spekterofotometrik çalışmalarda oldukça fazla kullanılır. DPPH yapısına hidrojen kabul

ettikten sonra etkisiz hale gelerek sarı renk vermeye başlar. Hidrojen donörü antioksidanların yoğunluğu ortamda ne kadar fazla ise DPPH' ın renk giderimi o kadar fazla olur (Shibamoto vd., 2009). DPPH' ın yapısına hidrojen aldıktan sonra moleküler değişimi şekil 2.10.'da verilmiştir.

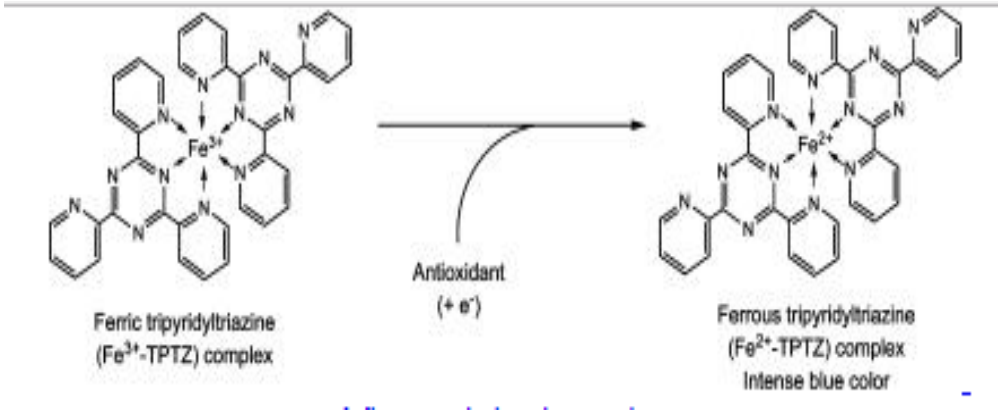
Yöntem, Blois (1958) tarafından geliştirilen DPPH radikal süpürücü aktivite protokolüne göre yapılmıştır. Bu yöntem antioksidan içerikli maddelerin serbest radikallere bağlanma eğilimi üzerine kurulmuştur. Bu doğrultuda da α-diphenyl-β- picrylhydrazyl stabil bir radikal olarak bilinir. Kolay ve kısa sürede yapılabildiği için yaygın olarak tercih edilir (Contreras-Guzman ve Strong., 1982).



Şekil 2.10. DPPH 'ın yapısına hidrojen alması ile kararlı hale gelmesi

2.3.2.4. Ferrik redükleyici antioksidan aktivite tayini (FRAP)

Bu yöntem antioksidanların ferrik demiri redükleme gücüne dayanan bir yöntemdir. İlk olarak kan ve plazmadaki askorbik asit miktarını ölçmek için kullanılmıştır. Ferrik demir (Fe^{+3}-TPTZ) bir antioksidan tarafından asidik ortamda Fe^{+2}' ye indirgendiği zaman ortaya 593 nm' de absorbans veren mavi bir renk çıkar. Ferrik demirin elektron alarak Fe^{+2}' ye indirgenmesi, şekil 2.11' de verilmiştir (Apak vd., 2007).



Şekil 2.11. Ferrik demirin elektron alarak Fe^{+2}' ye indirgenmesi

2.4. Makromantarların antioksidan önemi ve yapılan bazı çalışmalar

Makromantarlar çok uzun zamandır besin kaynağı olarak tercih edilmektedir. Günümüzde ise besin değerlerinin yanı sıra aktif biyolojik molekülleri ve medikal değerleri ile vazgeçilemez bir kaynak olmuştur (Breene, 1990). Mantarlar çok çeşitli sekonder metobolik içeriğini sahip organizmalar olup, türlere göre barındırdıkları fenolik, poliketid ve steroid miktarları oldukça fazladır. Bulunan bu sekonder metabolitlerin antioksidan aktiviteleri yüksek çıkarken, mutajenik olmayışları da pozitif bir etki yaratmaktadır (Ishikawa vd., 1984).

Makromantarlar ile yapılan bir çok antioksidan çalışma vardır. Biz bunlardan çalıştığımız türlere ve yöntemlere yakın olmaları ile birkaç örneklendirme yapacağız.

Cilerdzic vd., (2016) *Ganoderme lucidum, Ganoderma applanatum ve Ganoderma carnosum* ile yaptıkları antioksidan taramasında, bu türlerin metanolik ekstraktlarının DPPH ve total fenolik aktivitelerini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışma sonunda DPPH aktivite kapsamında *Ganoderma lucidum* türüne ait ekstraktlarda % 57.12' ye varan giderim gözlemlemişlerdir. *Ganoderma applanatum* ve *Ganoderma carnosum* türleri için ise sırasıyla %20.53 ve %17.04 giderim olduğunu ortaya koymuşlardır. Gösterilen bu aktivitenin fenolik madde ile paralel bir artış gösterdiğini vurgulamışlardır.

Ganoderma lucidum ile başka bir antioksidan taraması Özparlak vd., (2016) tarafından yapılmış olup, toplam fenolik ve flavonoid içerikleri, DPPH süpürücü aktiviteleri ve metal

şelatlama aktiviteleri açısından yabani ve kültür formları karşılaştırılmıştır. Elde edilen verilere göre Fenolik içerikler, kültür formları ve yabani formları için sırasıyla, 21µg/g ve 25.58µg/g, DPPH süpürücü aktiviteleri %16.17 ve 17.67, metal şelatlama aktiviteleri 8.02µg ve 14.45 µg/g olarak sunulmuştur. Bu çalışma bize suş farklılıklarının yanı sıra yabani formdaki makromantarlar ile kültüre alınmış makromantarlar arasındaki farkın bile ne kadar değişebileceğini göstermektedir.

Başka bir çalışmada *Trametes gibbosa'* nın antioksidan aktiviteleri taranmıştır. Fenolik ve flavanoid içeriklerine bakılan *Trametes gibbosa'* nın madder içerikleri 23.8 ve 16.98 µg/g olarak kayıt edilmiştir. Aynı zamanda DPPH, redükleyici güç ve metal şelatlama aktivitesi yöntemlerinde de taranan ekstratlardan sırasıyla 1mg/ml konsantrasyonlarda %91.47 DPPH giderici aktivite, 0,546 absorbans redükleyici güç aktivite ve %93.3 şelatlama aktivitesi olduğu gözlemlenmiştir.(Johnsy vd., 2011) Verilen oranlar oldukça yüksek olmasıyla birlikte, makromantarların antioksidan akitivite konusunda ne kadar güçlü birer kaynak olduklarını da gözler önüne sermektedir.

Yine başka bir çalışma *Schizophyllum commune* ekstraktlarının total fenolik ve DPPH aktivilerinin hesaplanması üzerine yapılmıştır. Bu çalışmada da ekstraksiyon yöntemine göre ekstrelerin verimliliği konusuna değinilmiştir. Etil asetat ve diklorometan ile yapılan ekstraksiyonların sırasıyla DPPH verimleri 0,219 mg/ml (EC50) ve 0.641 mg/ml (EC50), fenolik içerikleri ise etil asetat içi 0.79 GAE/ml ve dikolorometan için 0.45 GAE/ml olarak hesaplanmıştır (Mirfat vd., 2010). Yapılan çalışma bize suş farkından kaynaklanan aktivite miktarından farklı olarak, ekstraksiyon metodunun da oldukça önemli bir etken olduğunu göstermektedir.

2.5. Antimikrobiyal Aktivite Belirleyici Yöntemler

Bu yöntemler, agar disk difüzyon metodu, antimikrobiyal gradient metodu (ETEST) ve diğer difüzyon metodu olarak 3 ana grup altında toplanmıştır (Balouiri vd., 2016).

2.5.1. Agar disk difüzyon metodu

Bu yöntem ilk olarak 1940 yılında geliştirilmiş olup, şu an hala klinik laboratuvarların antimikrobiyal test taramalarında yaygın olarak kullandığı bir yöntemdir. Bazı nazlı organizmaların antimikrobiyal testlerinde snuç almak zor olsa da, bu organizmaların çalışılmasında besiyeri optimizasyonu, inkübasyon optimizasyonu gibi yöntemler geliştirilerek, bu zorluğu üstesinden gelinmiştir (Balouiri vd., 2016).

Yöntemde test mikroorganizmaları agar üzerine ekilerek, 6mm yarıçapında istenilen miktar ve konsantrasyonda denenecek madde emdirilen filtre kağıtlarından çıkarılmış diskler agar yüzeyine yerlerştirilir ve inhibasyon zonları ölçülür. Çıkan sonuçlar maddeye karşı duyarlı, nötr ve duyarsız olarak kategorilendirilir. Çıkan sonuçlar her ne kadar bakteriyal ve fungal zonların büyümesini engelleyici olabilse de, bu yöntem sidal aktivite ve statik efekt sonuçları için kullanılamaz. Ayrıca MIC konsantrasyonunu belirlemek için de yetersiz bir yöntemdir. Yöntemin en büyük dezavantajı da budur (Karon vd., 2012).

2.5.2. Antimikrobiyal radiant yöntemi

Antimikrobiyal aktivitede kullanılan dilüsyon yöntemleri ve agar difüzyon yöntemini birleştiren bir metod olan antimikrobiyal radiant yöntemi, MIC değerinin belirlenmesi gereken durumlarda tercih edilir. Yöntem agar disk difüzyon ile aynı olsa da yerleştirilen disklerdeki maddelerin konsantrasyon aralıkları değişim gösterir. Etkin gözlendiği konsantrasyon MIC değeri olarak belirlenir. Her ne kadar basit bir yöntem gibi denenen maddelerin ve test mikroorganizmalarının miktarına göre maliyet olarak oldukça yüklü bir yöntemdir (Jorgensen vd., 2009).

Bu yöntem özellikle sinerjetik etki çalışılan deneylerde oldukça yaygın kullanılmaktadır. Sinerjetik etki MIC değerinin düşürülmesi açısından oldukça önemlidir. Bu bağlamda çalışılan maddelerde fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu indeksi (FICI) hesaplanıp, MIC değerlerinin karşılaştırılması şekil 2.12 'de verilen bağıntıya göre hesaplanır (Balouiri vd., 2016).

$$\sum FICI = FIC(A) + FIC(B)$$

$$FIC(A) = \frac{MIC(A)\ \textbf{Kombinasyon}}{MIC(A)\ \textbf{Yalnız}} \quad \textbf{ve} \quad FIC(B) = \frac{MIC(B)\ \textbf{Kombinasyon}}{MIC(B)\ \textbf{Yalnız}}$$

Şekil 2.12. Sinerjetik etki değerlerinin hesaplanmasında MIC değerlerinin formülasyonu

2.5.3. Diğer difüzyon yöntemleri

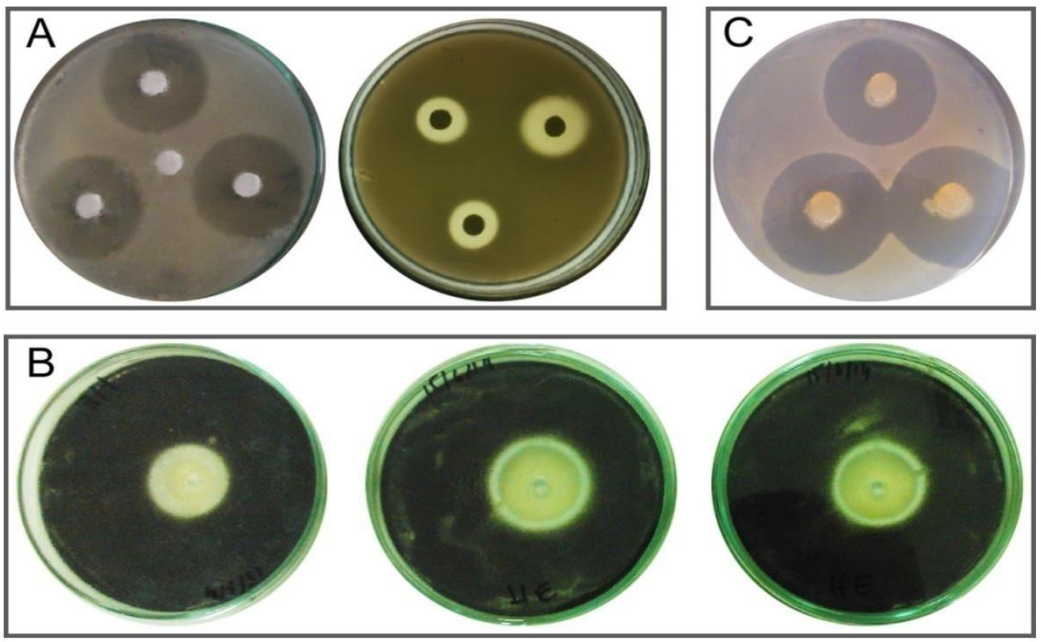
Bu yöntemler agar kuyu difüzyon yöntemi, agar dolgu difüzyon yöntemi, çapraz çizgi yöntemi ve zehirli besiyeri yöntemi olmak üzere 4 grupta incelenebilir.

Agar kuyu difüzyon yöntemi, bitkiler ve mikrobiyal ekstraktların antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde yaygınca kullanılan bir yöntemdir. Yöntem agar difüzyon yöntemiyle aynı olup, farklı olarak agarlara test mikroorganizmaları yayıldıktan sonra agar yüzeyine 6-8 mm çapında delikler açılır ve denenecek ekstraktlar bu deliklere enjekte edilir (Balouiri vd., 2016).

Zehirli besiyeri yöntemi, daha çok antifungal çalışmalarda kullanılır. Bu yöntemde önceden erimiş olan agara denenmek istenen ekstrakt dilenen konsantrasyonlarda eklenir ve perilere dökülür. Daha sonra donan agarlar alınarak üzerlerine 2-5 mm diskler halinde misel ekimi yapılır. Misel ekimi yapılan mantarın inkübasyon süresi kadar inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda % antifungal aktivite aşağıdaki formüle göre hesaplanır (Balouiri vd., 2016).

$$\text{Antifungal activite (\%)} = (Dc - Ds) / Dc * 100$$

Formülde Dc ekstrakt içermeyen kontrol grubunun zon yarıçapı iken, Ds ekstrakt içeren besiyerine ekim yapılmış mantarın zon yarıçapıdır.



Şekil 2.13. Farklı disk difüzyon yöntemlerinin karşılaştırılması A. Agar disk difüzyon yöntemi, B. Agar kuyu yöntemi, C. Agar dolgu difüzyon yöntemi

2.6. Ultraviyole (UV) koruyucu aktivite

Ultraviyole ışınları UVA(320-400 nm), UVB(290-320 nm) ve UVC(200-290 nm) olmak üzere 3 kısımda incelenir.

UVA'nın dalga boyu uzun olduğundan dolayı atmosferik koşullar ve yükseklikten daha az etkilenir ve UVB' ye oranla deride daha iyi nüfuz edebilir. Yeryüzüne erişen UV spektrumunun %96,5 gibi bir oranını oluşturur. UVA cam tarafından engellenemediği gibi, gölge veya kapalı ortamlarda da etkili olabilmektedir. UVB' ye kıyasla pigmentlerin koyulaşmasını daha çabuk indükleyerek erythema sentezini engeller. UVA'nın ışık yaşlanması, deri kanseri ve oküler hasara yol açtığı araştırmacılar tarafından gözlemlenmiştir.

UVB, UVA'nın sadece 20/1 oranında yeryüzüne ulaşabilir ve atmosferik olaylardan çok daha çabuk etkilenir. Yeryüzüne erişen UV spektrumunun %3.5 gibi bir oranını oluşturur. Güneş yanıkları ve immun sistem baskılayıcı özellikleri araştırmacılar tarafından ortaya koyulmuştur.

UVC ise ozon tabakası tarafından etkili bir biçimde bloke edilebilir olup, biyolojik olarak herhangi bir etkisi görülmemiştir.

İnsan vücudunun UV ışınlara karşı verdiği tepkiler arasında erythema ve edema oluşumu ve pigment kararması sayılabilir. Bunları takiben epidermis ve dermiste kalınlaşma ve D vitamini sentezi gözlenen tepkiler arasındadır. UVB kaynaklı erythema oluşumu 4 saat maruz kalma sonunda oluşurken, etkisi haftalar boyunca sürebilir. UVA' nın aynı oranda erythema oluşumunu tetiklemesi için, maruz kalma süresinin yaklaşık 1000 kat artması gerekir, bu da UVA'yı aynı derecede tehlikeli kılar.

UVA' nın ve UVB'nin bu zararlı etkilerine karşı bitki ekstraktlarının kullanımı oldukça yaygın olsa da makromantar ekstraktları ile UV koruyucu aktivite çalışmalarına literatür taramasında rastlanamamıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Makrofungus İzolatları

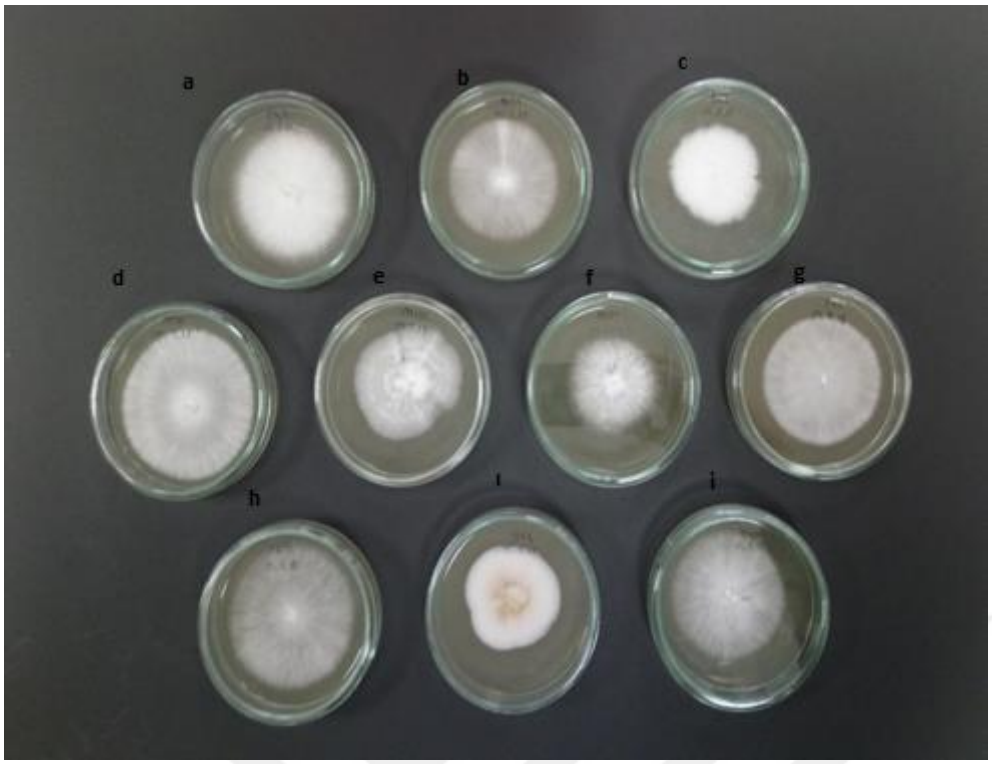
Çalışmada toplam 10 adet makrofungus izolatının kültür sıvısına ait etil asetat ekstraktlarının antimikrobiyal, antioksidan ve UV'ye karşı koruma etkisi test edilmiştir.

Denenen izolatlara ilişkin bilgiler, çizelge 3.1.' de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Aktivitesi araştırılan makrofungus izolatları

Tür adı	**İzolat kodu**	**Kaynak**
Ganoderma carnosum	M88	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Fungikültür Laboratuvarı
Trametes versicolor	M96	
Ganoderma applanatum	M105	
Schizophyllum commune	M131	
Schizophyllum commune	M133	
Ganoderma resinaceum	D33	
Trametes hirsuta	D43	
Trametes versicolor	D54	
Schizophyllum commune	D63	
Ganoderma resinaceum	Sv19	

Çalışılan izolatların PDA besiyerindeki koloni morfolojileri şekil 3.1.' de sunulmuştur.



Şekil 3.1. İzolatların PDA besiyerinde morfolojileri, a. *Trametes hirsuta (*D43), b. *Ganoderma carnosum* (M88), c. *Schizopyllum commune* (D43), d. *Trametes versicolor* (M96), e. *Schizophyllum commune* (M133), f. *Schizophyllum commune* (M133), g. *Ganoderma resinaceum* (D33), h. *Ganoderma resinaceum* (SV19), ı. *Trametes versicolor* (D54), i. *Ganoderma applanatum* (M105)

3.1.2. Antimikrobiyal Aktivite ve UV' ye Karşı Koruma Tayininde Kullanılan Test Mikroorganizmaları

Makrofungus izolatlarının kültür sıvılarından elde edilen etil asetat ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesini belirlemek üzere 3 gram negatif ve 3 gram pozitif bakteri olmak üzere 6 adet test mikroorganizması kullanılmıştır.Kullanılan mikroorganizma suşları ve temin edildikleri kaynaklar çizelge 3.2. 'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Makrofungus etil asetat ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesinin denendiği standart mikroroganizma suşları

Test Mikroorganizması	**Suş adı**	**Suş no**	**Kaynak**
Gram (+) Bakteri	*Micrococcus luteus*	NRRL 1018	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Fungikültür Laboratuvarı
	Bacillus subtilis	NRRLB 744	
	Staphylococcus aureus	NRRLB 767	
Gram (-) Bakteri	*Escherichia coli*	ATCC 25922	
	Pseudomonas aeruginosa	ATCC 27853	
	Cronobacter sakazakii	LMG 2766	
Maya	*Saccharomyces cerevisiae*	NRRLY 12632	

3.1.3. Kullanılan besiyerleri ve çözeltiler

A. Besiyerleri

Çalışma kapsamında kullanılan besiyeri içerikleri distile su eklenip kaynatılarak çözünmeleri sağlanmış, daha sonra 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Potato Malt Peptone (PMP)

Pepton from meat	1,0 g
Malt extract	5,0 g
Potato dextrose broth	10,0 g
Distile su	1000 ml

PMP besiyeri makrofungus izolatlarının üretilmesi için kullanılmıştır.

Potato Dekstroz Agar (PDA)

Ticari hazır besiyerinden (Merck) 39 g/l oranında tartılarak hazırlanmıştır. Üretilecek makrofungus izolatlarının aktiflenmesi için kullanılmıştır.

Müller Hinton agar (MHA)

Ticari hazır besiyerinden (Merck) 34 g/l oranında tartılarak hazırlanmıştır. Antimikrobiyal aktivite çalışmasında kullanılmıştır

Müller Hinton Broth (MHB)

Ticari hazır besiyerinden (Merck) 21 g/l oranında tartılarak hazırlanmıştır. Antimikrobiyal aktivite çalışmasında kullanılan test mikroorganizmalarının aktiflenmesi amacı ile kullanılmıştır.

YPD Agar

Pepton from meat	20	g
Yeast extract	10	g
Glukoz	20	g
Agar	15	g
Distile su	1000	ml

YPD Agar besiyeri UV survival aktivite çalışmasında kullanılmıştır.

YPD Broth

Pepton from meat	20	g
Yeast extract	10	g
Glukoz	20	g

Distile su 1000 ml

YPD Broth besiyeri UV survival aktivite çalışmasında kullanılan mayaların aktiflenmesi için kullanılmıştır.

B.Çözeltiler ve kimyasallar

Çalışma kapsamında kullanılan çözeltiler çizelge 3.3. 'de sıralanmıştır.

Çizelge 3.3. Çalışma kapsamında kullanılan çözeltiler ve kullanım amaçları

Çözelti	Kullanıldığı Çalışma
%10 ' luk Folin-Ciocalteu Reaktifi % 20'lik Na_2CO_3 çözeltisi	Total fenolik
%5 'lik DPPH çözeltisi	DPPH
% 1'lik $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisi % 10'luk TCA çözeltisi % 0.1'lik $FeCl_3$ çözeltisi 200mM'lık fosfat tamponu (pH: 6.6)	Redükleyici güç
Oksijenlendirilmiş saf su %20' lik β-karoten (Çalışmada 1ml kloroform içinde 0.2 mg β-karoten çözülerek hazırlanmıştır.) Tween 80 Linoleik asit, Kloroform	Beta Karoten
2 mM $FeCl_2$ çözeltisi 5 mM Ferrozin çözeltisi	Metal şelatlama
Ringer çözeltisi	UV koruyucu aktivite

C. Cihazlar

Çalışma sırasında kullanılan cihazlar ve markaları çizelge 3.4.' te sunulmuştur.

Çizelge 3.4. Çalışma sırasında kullanılan cihazlar, marka ve modelleri

Cihazın adı	Marka ve modeli
Spektrofotometre	Shimadzu UV-2450 UV-VIS
Santrifüj	Hettich Zentrifugen UNIVERSAL 320
Güvenlik kabini	Thermo Electron Corporation Hera Safe
Homojenizatör	Heidolph SilentCrusher M
Manyetik karıştırıcı	Heidolph MR Hei-Tec D-91126 Scwabach
Su banyosu	Adventec LD-220 Water Bath
Etüvler	Invova 44 New Brunswick Scientific, Memmert

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Makrofungus izolatlarının aktiflenmesi

Denenen makrofungus izolatları ilk olarak PDA besiyerinde 27 °C' de karanlık ortamda aktiflenmiştir. İzolatlar 250 ml' lik erlenlerde 100 ml PMP besiyerine 5 mm çapında misel diskleri halinde inoküle edilerek pellet oluşumu beklenmiştir. Bu aşamada erlen başına 5 disk olacak şekilde inokülasyon yapılarak 100 rpm çalkalama hızında ve karanlık koşullarda 7 gün inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.2. İnokülant Hazırlanması ve İnkübasyon

PMP besiyerinden 7 günlük inkübasyon sonunda elde edilen izolat pelletleri steril ortamda besiyerinden süzülerek arındırılmış ve elde edilen pelletler 2 defa steril saf su ile yıkanmıştır. Besiyerinden tamamen arındırılan pelletlere 100 ml saf su eklenmiş ve homojenizatör (Heidolph Silent Crusher M) yardımı ile homojenize edilmiştir. Homojenize edilen süspanse haldeki miseller manyetik karıştırıcı (Heidolph MR Hei-Tec D-91126 Scwabach) yardımı ile 150 rpm' de karışır vaziyetteyken 2 L' lik erlenlerde bulunan 1 L PMP besiyerine %5 oranında inoküle edilmiştir.

Üretim besiyerine alınan izolatlar karanlık ortamda oda sıcaklığında ve statik koşullarda 10 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.3. Kültür Sıvısı Ekstraksiyonu

On gün statik koşullarda inkübe edilen izolatların kültür sıvılarını toplamak amacı ile kurutma kağıdı kullanılarak kaba süzümleri yapıldıktan sonra Whatman No:1 filtre kağıdından geçirilerek misellerden arındırılması sağlanmıştır. Bu aşamada süzümleri zor olan bazı izolat türlerinin misellerinin ayrılması için 6000 rpm' de 10 dakika santrifüj yapılmıştır ve süpernatant tabakası 5 ml' lik pipet yardımıyla toplanmıştır.

İzolatların süzümleri tamamlandıktan sonra elde edilen kültür sıvıları 500 ml' lik ayırma hunilerine alınarak hacimce 1/1 oranda etil asetat ile muamele edilmiştir. Bu aşamada

yüzey hacim oranını artırarak maksimum ekstraktı elde edebilmek amacıyla her 250 ml' lik kültür sıvısı için 3 aşamada etil asetat eklenerek iyice çalkalanmıştır.

Çalkalanan etil asetat - kültür sıvısı karışımı faz ayrılana kadar beklenmiş, daha sonra altta kalan kültür sıvısı ayırma hunisinin vanası açılarak alınmıştır. Üstte kalan etil asetat fazı ayrı bir şişede toplanmıştır. Toplanan etil asetat ekstraktlarının içinde kalan suyu ortamdan uzaklaştırmak için şişenin dibini kaplayacak kadar sodyum karbonat eklenmiş ve iyice çalkalanmıştır. Sodyum karbonat dibe çökünceye kadar beklenmiş ve tekrar filtre kağıdından süzmek suretiyle sudan arındırılmış etil asetat ekstraktları ayrı bir kapta toplanmıştır.

Toplanan etil asetat ekstraktları evaporatör kullanılarak uçurulmuş, yapılacak olan çalışmalarda kullanılmak üzere 1 mg/ml konsantrasyonlarda ve metanolde çözülerek -20 °C' de muhafaza edilmiştir.

3.2.4. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları

Antimikrobiyal aktivite çalışmaları kapsamında ekstraktların belirlenen test mikroorganizmaları üzerine antimikrobiyal bir aktivitesi olup olmadığı sorgulanmıştır. Metod, üzerine denenmek istenen test mikroorganizması ekilmiş agar besiyeri üzerine ekstrakt emdirilmiş disklerin difüze olmasıyla bir zon oluşturmasına dayanır (Tendencia vd., 2004).

Fungal ekstraktlar 5 mm çapında Whatman No:1 filtre kağıt disklere 50µg ekstrakt içerebilecek biçimde emdirilerek steril ortamda kurumaya bırakılmıştır.

Test organizması olarak kullanılacak olan bakteriler MHB besiyerine inoküle edilerek 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda sıvı besiyerlerinde üreyen test mikroorganizma kültürlerinin bulanıklığı spektrofotometrik olarak McFarland 0,5 standardının bulanıklık düzeyine ayarlanmak üzere ringer çözeltisi ile seyreltilmiştir. Seyreltilen test mikroorganizmalarından MHA besiyerine, her petriye 100 µl olacak biçimde ekim yapılarak iyice yayılmış, kültürlerin üzerlerine ekstrakt emdirilmiş ve kurutulmuş diskler yerleştirilmiştir. İnoküle edilen tüm petri kapları 24 ve 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Pozitif kontrol olarak eritromisin, vankomisin ve basitromisin antibiyotiklerini içeren diskler kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise, ekstrakt hazırlanmasında kullanılan çözücü olan etil asetat emdirilmiş diskler kullanılmıştır.

İnkübasyon süresi sonunda diskler etrafında ortaya çıkan zonlar, iki farklı düzlemde ve milimetrik olarak ölçülmüş ve elde edilen değerler kaydedilmiştir.

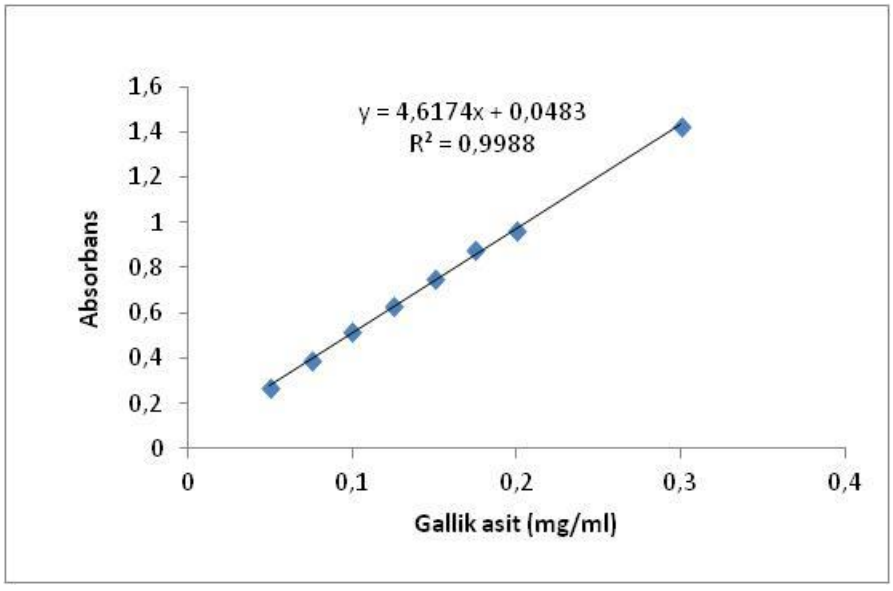
3.2.5. Antioksidan aktivite çalışmaları

3.2.5.1. Total fenolik madde tayini

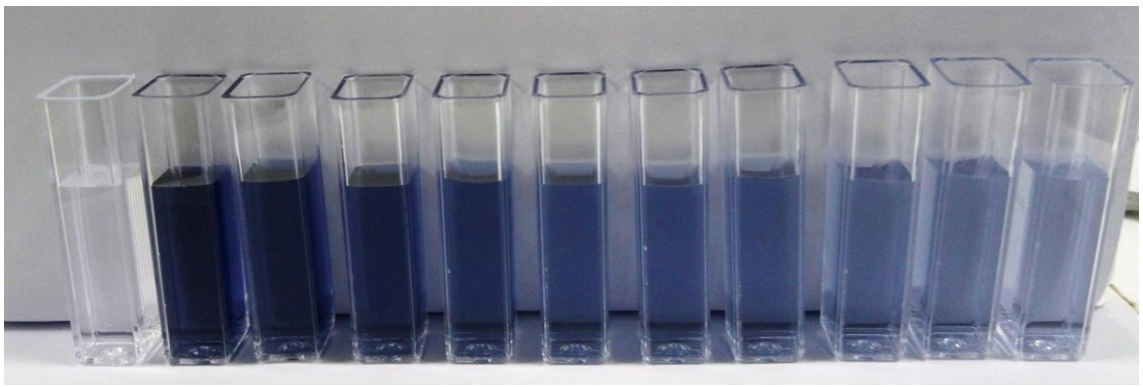
Total fenolik madde tayininde Folin–Ciocalteu yöntemi esas alınmıştır (Singleton vd., 1999). Yöntem Folin–Ciocalteu çözeltisinin fenolik maddeler ile redoks tepkimesine girerek mavi renk vermesine dayanır.

Yöntemde kültür sıvısı ekstraktları 1 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde metanolde çözülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan örneklerin her birine Folin–Ciocalteu reaktifi eklenmiştir. Karışım 3 dakika bekletildikten sonra üzerine Na_2CO_3 eklenmiş ve karanlık ortamda 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda spektrofotometrede 750 nm' de absorbansları ölçülmüştür.

İzolatlar gallik asit eşdeğerlerine göre değerlendirilmiş olup, gallik asit standart eğrisi ve farklı konsantrasyonlara göre verdiği renk değişimi şekil 3.2. ve şekil 3.3 'de verilmiştir



Şekil 3.2. Toplam fenolik madde miktarı tayininde kullanılan gallik asit standart eğrisi

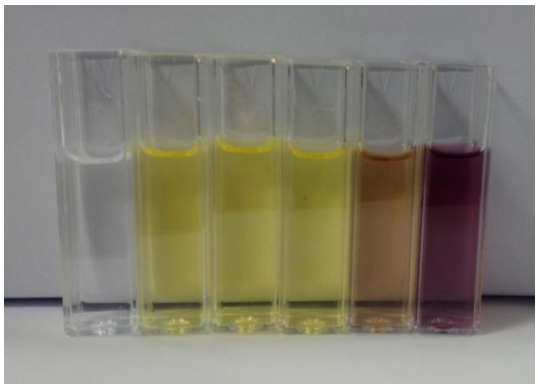


Şekil 3.3. Gallik asit standart eğrisi için hazırlanan gallik asit konsantrasyon serisi

3.2.5.2. DPPH radikal süpürücü aktivite

Yöntemde ekstraktlar 1mg/ml konsantrasyonlarda ayarlanmış olup, deney tüplerine dağıtılmışlardır. Üzerlerine metanolde çözülmüş %5' lik DPPH çözeltisi eklenerek karanlık ortamda 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örnekler 517 nm' de spektrofotometrede okunmuştur. Pozitif kontrol olarak BHT ve askorbik asit kullanılmıştır.

Askorbik asitin konsantrasyonlara göre verdiği renk değişimler şekil 3.6' da verilmiştir.



Şekil 3.4. Askorbik asitin değişik konsantrasyonlarda verdiği renk değişimi (Solda kör olmak üzere sırasıyla 0,5-0,4-0,3-0,2-0,1 mg/ml konsantrasyonlarında)

3.2.5.3. Redükleyici güç tayini

Bu yöntem Chang ve ark. (2002)' nin belirttiği protokole göre yapılmıştır. Esasında 3 değerlikli demirin (Fe^{3+}), iki değerlikli demire (Fe^{2+}) indirgenmesine dayanan bir yöntemdir. Demir indirgendikten sonra oluşan mavi rengin absorbansı ölçülerek, redükleme gücüne bakılmıştır.

bir mg/ml olarak hazırlanan ekstraktların üzerlerine sırasıyla $K_3[Fe(CN)_6]$ ve fosfat tamponu eklenmiştir. Tüpler iyice vortekslendikten sonra 50 °C' de 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan alınan örneklere TCA eklenip, santrifüj edilmiştir. Santrifüj bittikten sonra tüpün üst tabakasında 5 ml toplanarak distile su seyreltilmiş ve karıştırılmıştır. Son olarak üzerlerine $FeCl_3$ eklenen örnekler 700 nm' de spektrofotometrik yöntemle okunmuştur. Pozitif kontrol olarak BHT ve askorbik asit kullanılmıştır.

3.2.5.4. Beta karoten- linoleik asit antioksidan aktivite tayini

Bu yöntem Mi-Yae vd. (2003) tarafından önerildiği biçimi ile uygulanmıştır. Yöntem β-karoten'in linoleik asitten çıkan serbest radikallerle ağarması ve buna ortamda bulunan antioksidan maddelerin etkisine dayanır.

Çalışmaya başlamadan bir gün önce, çalışmada kullanılacak distile su hava pompasına bağlanarak oksijenlendirilmiştir. β-karoten kloroform içinde çözülerek üzerine linoleik asit ve tween 80 eklenmiştir**.** Bu karışım iyice karıştırılarak içindeki kloroform uçana kadar beklenmiştir. Ardından karışıma oksijenlendirilmiş saf su eklenerek çalışmada kullanılacak olan emülsiyon hazırlanmıştır. Spektrofotometrik yöntemle okunacak örneklerin koyulacağı su banyosu önceden 50 °C' ye ayarlanmıştır.

Hazırlanan emülsiyon tüplerine aktarılmıştır. Her örneğin körü için β-karoten içermeyen emülsiyondan, aynı prosedür kullanılarak hazırlanan tüpler de aynı şekilde hazırlanmıştır. Üzerine hazırlanan ekstraktlardan eklenerek iyice vortekslenmiş ve hemen 0. dakika absorbansları spektrofotometrede 470 nm' de okunmuştur. Daha sonra 20, 60, 80, 100

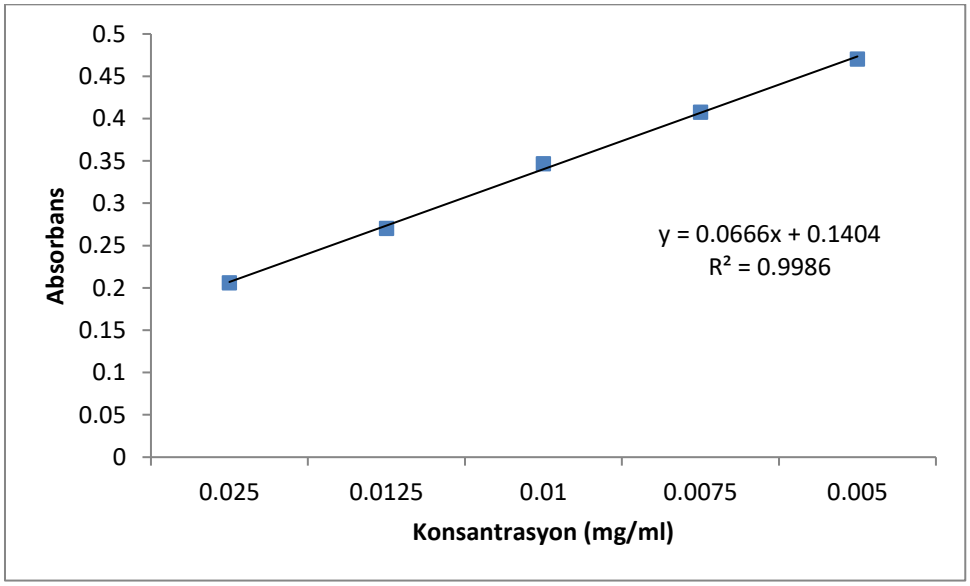
ve 120. dakikalarda aynı işlem tekrarlanmıştır. Pozitif kontrol olarak BHT ve askorbik asit kullanılmıştır.

3.2.5.5. Metal şelatlayıcı aktivite

Bu yöntem ekstrakt sıvılarının ferrozin ile bir bağlanma yarışına tabi tutulmasına dayandırılmaktadır. Eğer demir iyonları ferrozine daha hızlı bağlanırsa ortaya çıkacak mor renk, spektrofotometrik bir renk değişimi gösterir. Burada beklenen ekstraktın demir iyonlarına daha erken bağlanmasıyla mor rengin oluşumunu önlemektir (Orhan ve Üstün 2011).

Yöntemde 1mg/ml olacak şekilde hazırlanmış ekstraktlar deney tüplerine dağıtılmış ve üzerlerine $FeCl_2$ eklenmiştir. Daha sonra ferrozin koyularak metanolle 5 ml' ye tamamlanmıştır. Deney tüpleri her aşamada vortekslenmiştir. Körlere ferrozin koyulmamakla birlikte, körlerin ve negatif kontrolün üzeri sadece metanolle 5 ml' ye tamamlanmıştır. Absorbans, 10 dakikalık inkübasyon süresinden sonra 562 nm' de okunmuştur. Pozitif kontrol olarak EDTA kullanılmıştır.Metal şelatlayıcı aktivite aşağıdaki formüle göre belirlenmiştir;

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



Şekil 3.5.EDTA standart eğrisi

Bütün deneyler 3 tekrar olarak çalışılmıştır.

3.2.6. UV Koruyucu aktivite çalışmaları

UV koruyucu aktivite çalışmasında, değişik zaman aralıklarıyla UV ışığa maruz bırakılan maya hücrelerinin korunmasında, izolatların ekstrelerinin bir etkisi olup olmadığı sorgulanmıştır.

YPDB besiyerine inoküle edilen *Saccharomyces cerevisiae* örnekleri 2 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İkinci günün sonunda alınan örnekler ringer çözeltisi ile 10^{-3} oranında seyreltilerek, 1 mg/ml olarak hazırlanan izolat ekstraktlarından eklenmiştir. Daha sonra gruplara ayrılarak petri kaplarına aktarılmış, 15, 30 ve 60 saniye olmak üzere 3 grupta UV ışığa maruz bırakılmıştır. UV ışığa maruz bırakılan *S. cerevisiae* hücrelerini içeren petri kaplarına YPDA besiyeri dökülerek iyice yayılması sağlanmış, karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. 2 gün sonra petrilerdeki *Saccharomyces cerevisiae* kolonileri sayılarak ekstraktların UV koruyucu aktiviteleri belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak askorbik asit, negatif kontrol olarak ekstrakt çözücüsü olan metanol ilave edilmiş ve edilmemiş besiyerleri kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları

Yapılan çalışmalar sonunda hiçbir izolat ekstresinde antimikrobiyal aktivite belirlenmemiştir. Bu nedenle bu bölümde diğer antimikrobiyal çalışma aktiviteleri üzerinde durulmuş ve çalışmamızda neden bir etki görülemediği konusunda fikir yürütülmüştür.

Hu vd., (2009) ' un *Ganoderma japonica* esensiyal yağları ile yaptığı bir çalışmada disk difüzyon yöntemi ile bazı test mikroorganizmaları ile denenmesi sonucu oldukça başarılı sonuçlar elde ettikleri görülmektedir. Yaptıkları çalışma sonucu elde ettikleri veriler şekil 4.1 'da sunulmuştur.

TEST MİKROORGANİZMALARI	GJ ESENSİYAL YAĞLARI		Levofloxacin	
	DD[a]	MIC[b]	DD[c]	MIC[d]
Escherichia coli AB90054	24	2.05	30	2.44
Proteus vulgaris AB91103	20	4.11	34	0.61
Salmonella typhi AB94010	23	2.05	33	1.22
Staphylococcus aureus AB203010	27	1.03	31	0.61
Bacillus subtilis AB92068	25	2.05	32	NT

Şekil 4.1 *Ganoderma japonica* türüne ait antimikrobiyal aktivite çalışması a. 1.2 mg/disk değerleri, b. mg/ml değerleri, c. 5 µg/ml değerleri, d. µg/ml değerleri, DD. Disk difuzyon değerleri (mm), NT. Test edilmemiş, (Hu vd., 2009).

Başka bir çalışmada Sridhar vd., (2011) *Trametes hirsuta*' nın fruktifikasyon organlarının metanolik ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesini kuyu disk difüzyon yöntemine göre çalışmışlardır. Çalışma sonunda elde ettikleri veriler şekil 4.2 ' de verilmiştir.

Test mikroorganizmaları	Methanol extract (mg)		
	50	100	200
Escherichia coli	10 ± 1.4	12 ± 2.4	19 ± 3.7
Pseudomonas aeruginosa	13 ± 3.7	15 ± 2.4	21 ± 1.4
Salmonella typhi	06 ± 1.4	11 ± 2.4	19 ± 3.7
Staphylococcus aureus	07 ± 2.8	10 ± 2.8	21 ± 2.4
Streptococcus mutans	09 ± 2.8	13 ± 2.8	15 ± 3.7

Şekil 4.2 *Trametes hirsuta* türüne ait antimikrobiyal çalışma, (Sridhar vd., 2011).

Yine başka bir çalışmada Acharya vd., (2012) içinde bizimde çalışmış olduğumuz *Schizophyllum commune* ve bir çok makromantar türünü antimikrobiyal zon oluşturup oluşturmadığı açısından taramış olup, *Schizophyllum commune*' nin, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterileri için 1mg/ml konsantrasyonda antimikrobiyal aktivitesi olduğunu vurgulamışlardır.

Bütün bu verilerden yola çıkarak bizim çalışmamızda sonuç alınamamasının birincil nedeni olarak disk başına emdirilen madde miktarının az olduğu düşünülebilir. Bahsedilen çalışmalarda en düşük konsantrasyon olarak 1mg/ml çalışılırken, bizim yaptığımız çalışmada disk başına 50µg/ml ekstrakt emdirilmiştir.

Diğer bir bakış açısı ise suş farkının buna yol açabileceğidir. Suş farklılıklarının bu tip sonuç verebileceğine ilişkin veriler bölüm 2.4' te sunulmuştur.

4.2. Antioksidan Aktivite Çalışmaları

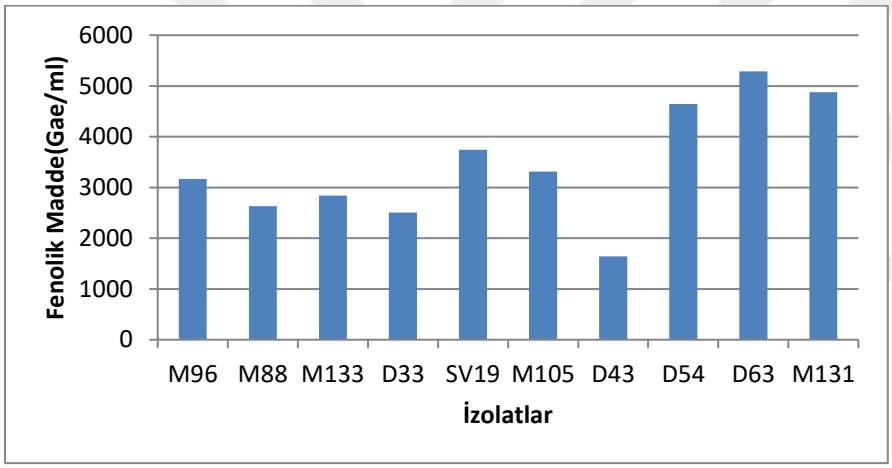
4.2.1. Total fenolik madde tayini

Total fenolik içerik tayininde, maddelerin gallik asit eşdeğerine göre hesap yapılmıştır. Buna göre eğilim grafiği çıkarılan gallik asit konsantrasyonlarındaki denkleme göre absorbanslar yerine konulup, gallik asit eşdeğerleri belirlenmiştir(Singleton vd., 1999).

Gallik asit eşdeğerlerine göre belirlenen izolatların fenolik madde içeriği çizelge 4.1.ve şekil 4.3.’ de verilmiştir.

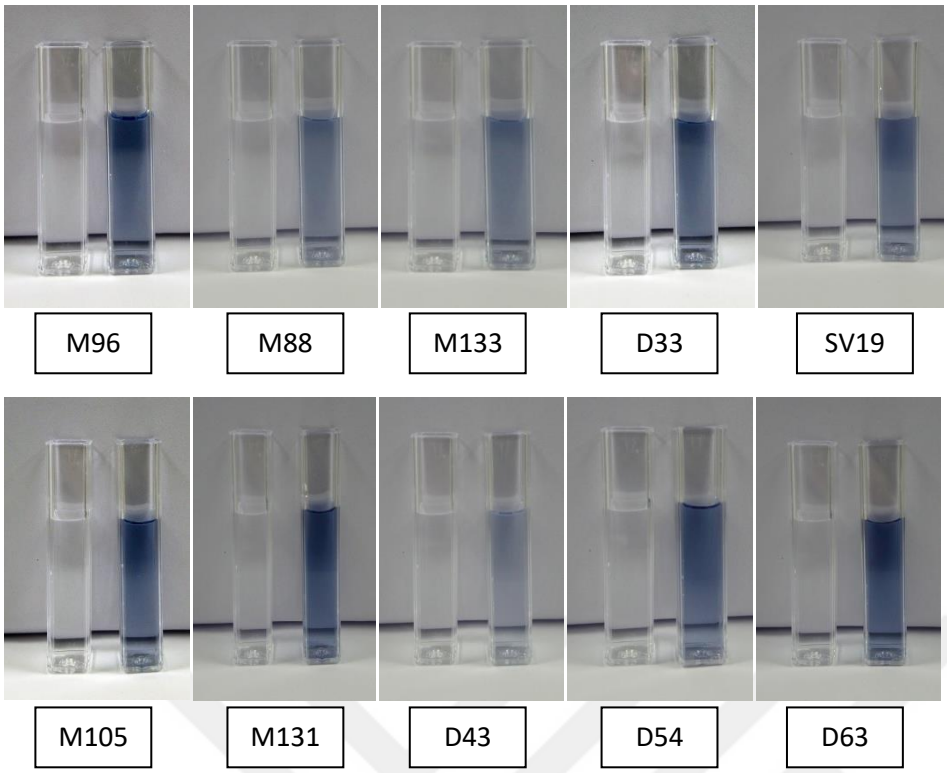
Çizelge 4.1. İzolatların fenolik madde içerikleri

İzolat Kodu	Gallik Asit Eşdeğerleri (mg GAE/ml ekstrakt)
M96	3166,6
M88	2632,4
M133	2841,8
D33	2508,5
SV19	3743,5
M105	3316,2
D43	1641,1
D54	4641,1
D63	5286,3
M131	4876,1



Şekil 4.3. İzolatların gallik asit eşdeğerlerine göre karşılaştırılması

Değişik izolatların fenolik madde içeriğine göre renk değişimlerinin körleriyle birlikte çekilmiş fotoğrafları şekil 4.4.'de sunulmuştur.



Şekil 4.4. Değişik izolatların fenolik madde içeriklerine göre renk değişimleri

Total fenolik içerik ile antioksidan aktivite arasında doğrusal bir ilişki olduğu ifade edilmektedir (Velioglu vd., 1998).

Cheung vd. (2003) *Lentinus edodes* ve *Volvariella volvacea* izolatları ile çalışmış, metanol ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarlarını belirlemişlerdir. Bu çalışmada ayrıca etil asetat ve metanol gibi değişik çözücülerin kullanımının, total fenolik madde miktarına olan etkisini de araştırmışlardır. Yaptıkları çalışma sonucunda elde ettikleri verilerde *Lentinula edodes'* in total fenolik madde miktarını 0,03 GAE/g ekstrakt , *Volvariella volvacea* 'nin total fenolik miktarını ise 0,21 GAE/g ekstrakt olarak rapor etmişlerdir.

Yapılan bir diğer çalışmada *Agaricus bisporus, Pleurotus ostreatus, Pleurotus eryngii* ve *Grifola frondosa* mantarlarının total fenolik madde miktarı araştırılmıştır (Dubost vd. 2007). Fakat bu çalışmada mantarların fruktifikasyon yapılarının etanolik ekstraktları kullanılmıştır.

Her iki çalışma için fenolik madde miktarları ve bunların çalıştığımız en iyi izolatlarla karşılaştırılması çizelge 4.2.' de vurgulanmıştır.

Çizelge 4.2. Farklı çalışmalarda elde edilen toplam fenolik madde miktarı değerleri a. Dubost vd., 2007, b. Cheung vd. 2002, c. Bu çalışmada kullanılan örnekler

Çalışılan İzolatlar	Total Fenolik Madde (mg GAE/g ekstrakt)
Agaricus bisporus, Whitebutton (a)	8,00±0,48
Agaricus bisporus, Crimini (a)	9,89±0,43
Agaricus bisporus, Portobella (a)	10,65±0,61
Grifola frondosa (a)	4,17±0,06
Lentinula edodes (a)	4,32±0,27
Pleurotus ostreatus (a)	4,27±0,69
Lentinula edodes (b)	4,79±1,20
Volvariella volvacea (b)	15,00±1,91
Trametes versicolor,D54 (c)	4,64±0,008
Schizopyhllum commune ,D63 (c)	5,28±0,03
Schizophyllum commune, M131 (c)	4,88±0,02

Sonuçlara bakılacak olursa, Cheung vd (2002)' nin yaptığı fenolik içerik taramasında *Volvariella volvacea* 15 mg GAE/g ekstrakt ile en çok fenolik madde içeriğine sahip mantar olarak göze çarpmaktadır. Daha sonra Dubost vd (2007)' nin yaptığı çalışmada *Agaricus bisporus*' un değişik suşları arasındaki total fenolik madde miktarı oldukça yüksektir.

Diğer örnekler arasından 5,28 mg GAE/g ekstrakt ile D63 kodlu *Schizophyllum commune* kayda değer bir fenolik madde içeriğine sahip olup, tıbbi bir mantar olduğu için önemli bir fenolik madde kaynağı olarak düşünülebilir.

Maddelerin suşa bağlı fenolik madde içerikleri farkını gösteren çizelge Çizelge 4.2. 'ye bakılacak olursa *Agaricus bisporus* suşları arasında yaklaşık 1 mg GAE/g kadar fark olması dikkat çekmektedir. Yine aynı şekilde *Schizopyhllum commune* suşları 0,4 mg GAE/g fark göze çarpmaktadır. Buradan çıkarılacak sonuç, aynı coğrafya veya farklı coğrafyada bulunan örneklerin suşları arasındaki farkların büyük bir aktivite farkı yaratabileceği olabilir.

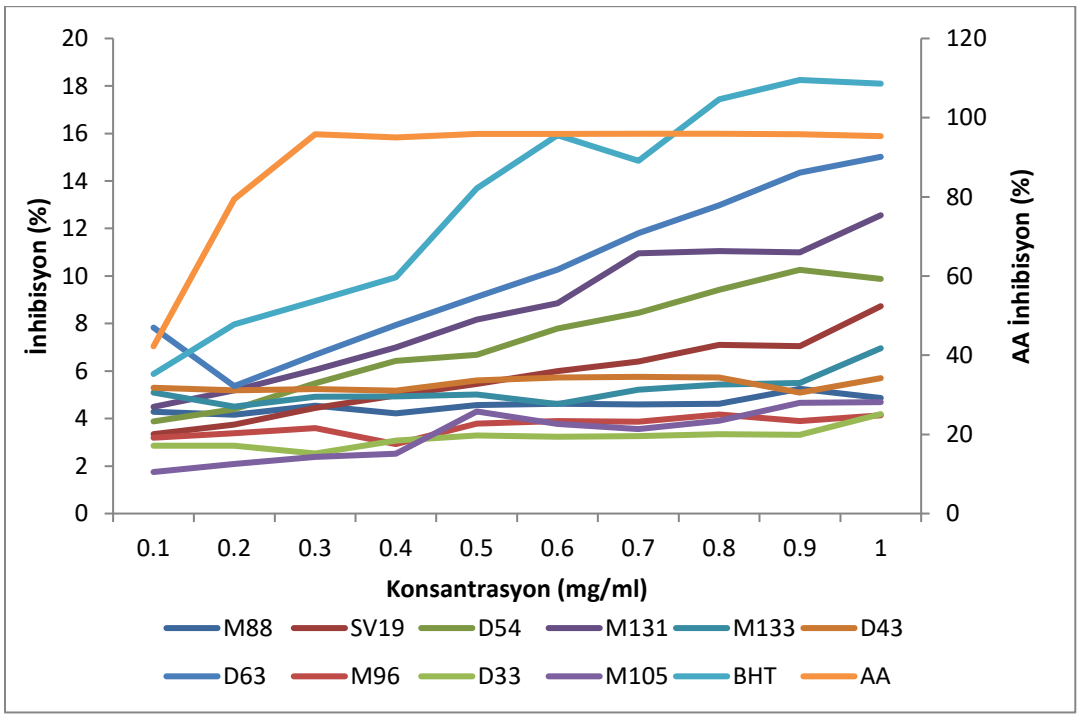
4.2.2. DPPH Radikal süpürücü aktivite

DPPH metodu diğer metodlara göre çok yaygın kullanılan ve kısa sürede sonuç veren, DPPH molekülünün kolayca hidrojen verme eğilimine dayalı bir metodtur (Baumann vd., 2002). DPPH stabil bir radikal olup, bir elektron veya hidrojen alarak kararlı bir diamanyetik molekül oluşturmaya eğilimlidir (Soares vd., 1997). Bu nedenle DPPH bir substrat olarak kullanılıp antioksidan çalışmalarında yapılan ölçümlerde yaygın olarak kullanılır (Duh vd., 1999, Chang vd., 2002).

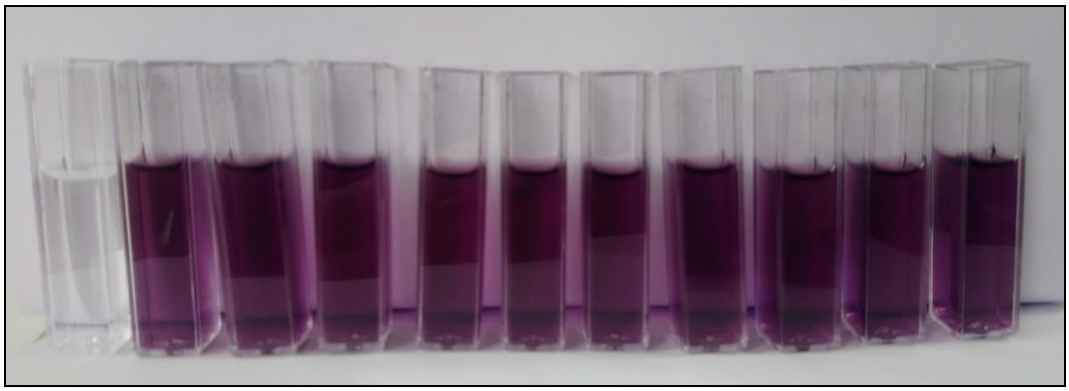
DPPH radikal süpürücü aktivite çalışmasında çalışılan ekstraktlar 0,1-1 mg/ml aralığında toplam 10 konsantrasyonda çalışılmıştır. Fakat ekstraktların hiçbirinde beklenen aktivite görülememiştir. Bu nedenden dolayı EC50 değerleri hesaplanamamıştır.

DPPH Radikal süpürücü aktivitenin pozitif kontrolü olarak BHT ve Askorbik asit kullanılmıştır.

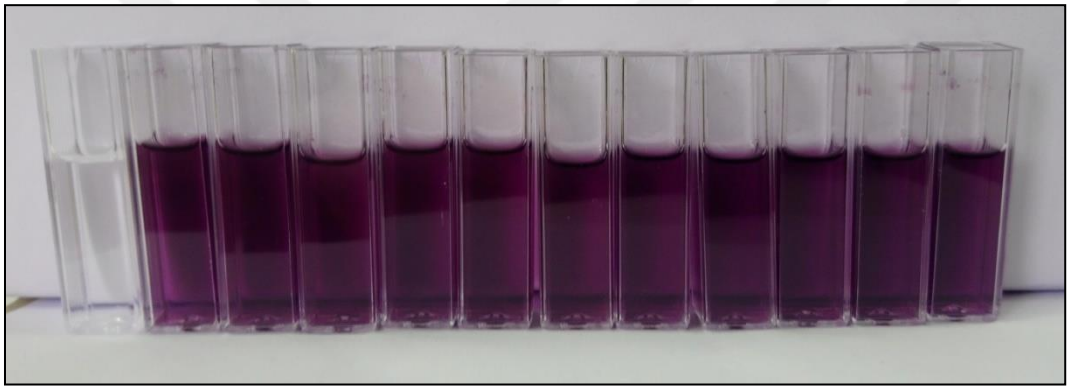
İzolatlara ait grafikler ve konsantrasyona bağlı fotoğraflar şekil 4.5. ' de verilmiştir.



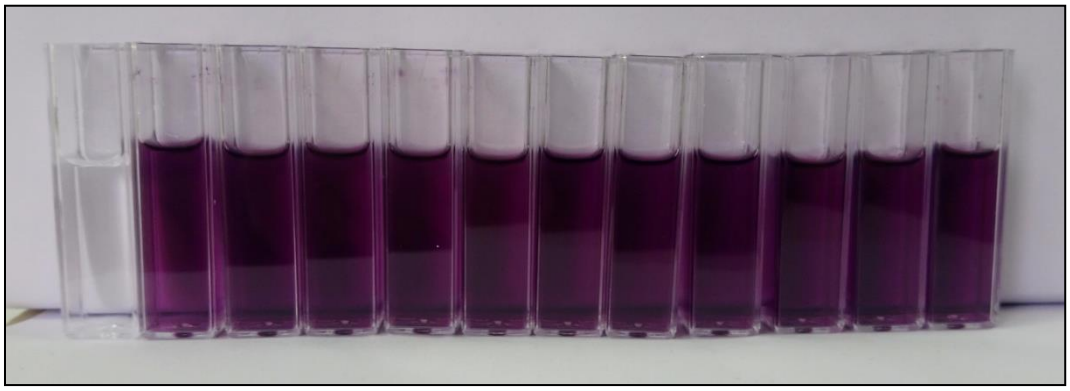
Şekil 4.5. İzolatların DPPH süpürücü aktivitelerinin karşılaştırılması (AA: Askorbik asit)



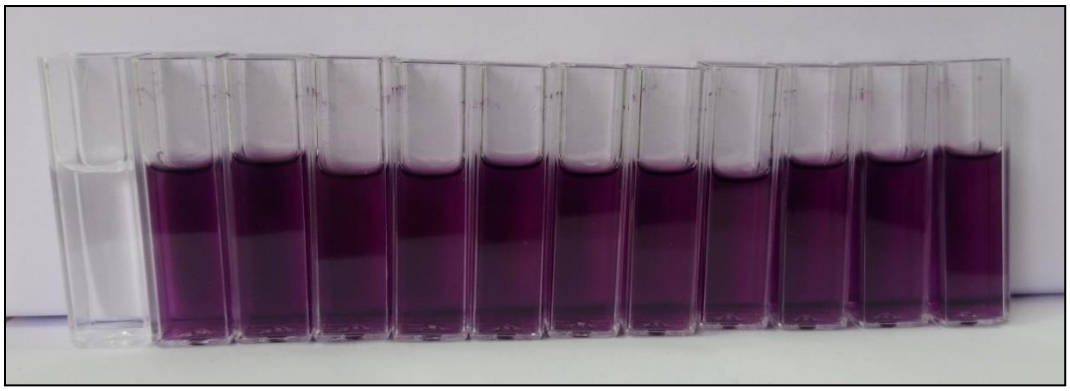
Şekil 4.6. M131 kodlu izolatın konsantrasyonlara göre renk değişimi (Solda kör olmak üzere 1mg/ml-0,1mg/ml aralığında)



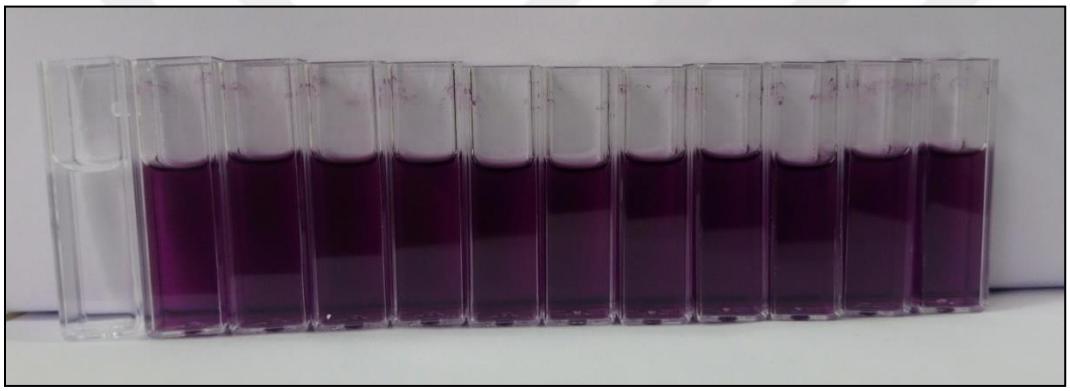
Şekil .4.7. D54 kodlu izolatın konsantrasyonlara göre renk değişimi (Solda kör olmak üzere 1mg/ml-0,1mg/ml aralığında)



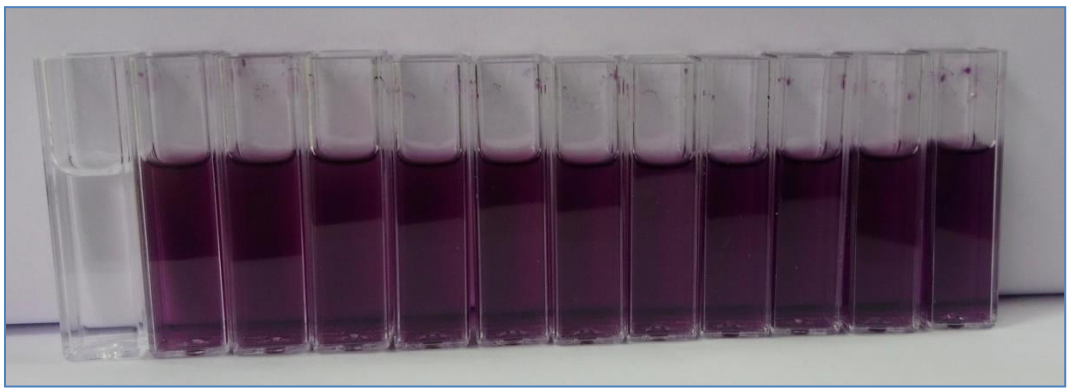
Şekil 4.8. SV19 kodlu izolatın konsantrasyonlara göre renk değişimi (Solda kör olmak üzere 1mg/ml-0,1mg/ml aralığında)



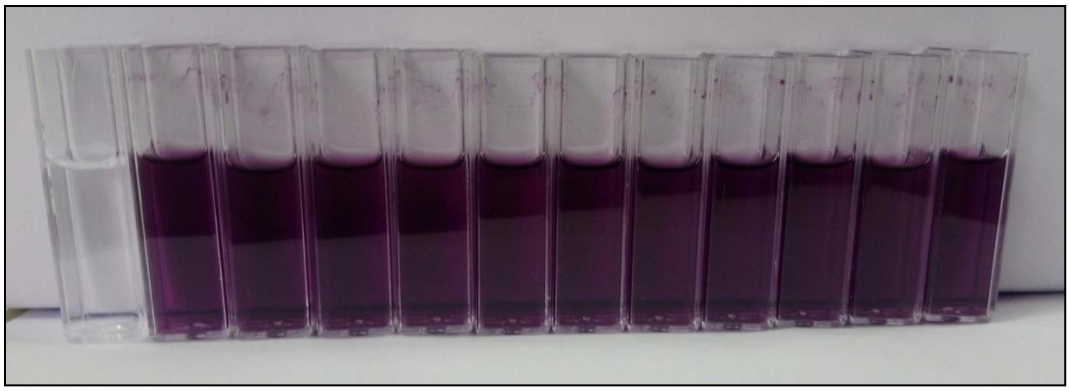
Şekil 4.9. M88 kodlu izolatın konsantrasyonlara göre renk değişimi (Solda kör olmak üzere 1mg/ml-0,1mg/ml aralığında)



Şekil 4.10. M133 kodlu izolatın konsantrasyonlara göre renk değişimi (Solda kör olmak üzere 1mg/ml-0,1mg/ml aralığında)



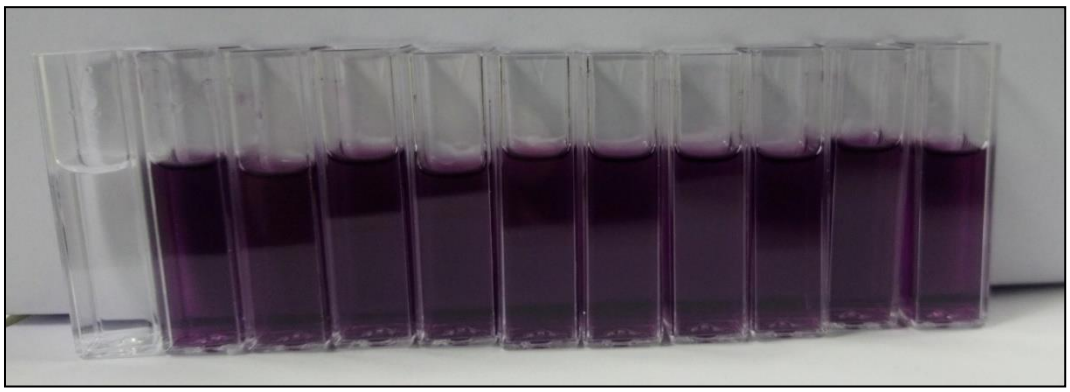
Şekil 4.11. D63 kodlu izolatın konsantrasyonlara göre renk değişimi (Solda kör olmak üzere 1mg/ml-0,1mg/ml aralığında)



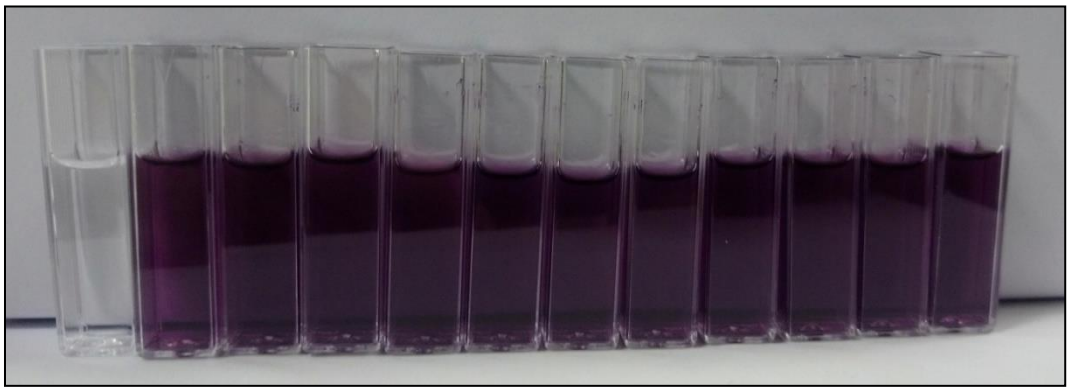
Şekil 4.12. D43 kodlu izolatın konsantrasyonlara göre renk değişimi (Solda kör olmak üzere 1mg/ml-0,1mg/ml aralığında)



Şekil 4.13. M96 kodlu izolatın konsantrasyonlara göre renk değişimi (Solda kör olmak üzere 1mg/ml-0,1mg/ml aralığında)



Şekil 4.14. D33 kodlu izolatın konsantrasyonlara göre renk değişimi (Solda kör olmak üzere 1mg/ml-0,1mg/ml aralığında)



Şekil 4.15. M105 kodlu izolatın konsantrasyonlara göre renk değişimi (Solda kör olmak üzere 1mg/ml-0,1mg/ml aralığında)

DPPH metodu bugüne kadar birçok araştırmacı tarafından yaygınca kullanılan bir yöntemdir ve makromantarların DPPH süpürücü aktivitesi üzerine yoğun çalışmalar yapılmıştır.

Fu vd. (2001) yaptıkları çalışmalarda *Agaricus bisporus , Hypsizigus marmoreus , Volvariella volvacea , Flammulina velutipes , Pleurotus eryngii , Pleurotus ostreatus , Hericium erinaceus ve Lentinula edodes* mantarlarının DPPH radikal süpürücü aktivitelerine bakmış olup, *Agaricus bisporus* izolatının DPPH gideriminin 800 µg/ml konsantrasyonda % 86.3±2.1 giderim yaptığını belirlemiştir. Bu kadar fazla giderimin sebebi olarak *Agaricus bisporus'* un fenolik aminoasit gruplarının fazla olmasının neden olduğu düşünülmektedir (Choi ve Sapers 1994).

Başka bir çalışmada *Lepista nuda, Russula delica, Polyporus squamosus* gibi makromantarların DPPH giderimine bakılmış olup, 180 µg/ml konsantrasyonlarda sırasıyla, % 91.3, % 86.1 ve % 82.8 giderim yaptığı kaydedilmiştir (Elmastas vd., 2006).

Yaptığımız çalışmalarda hiçbir izolatın DPPH aktivitesi bu oranda yüksek çıkmamakla birlikte, en yüksek giderim 1mg/ml' de % 15 giderim ile *Schizophyllum commune* (D63) tarafından gözlemlenmiştir. Bu durum, D63 kodlu *S. commune* izolatının çalışmada kullanılan diğer makrofungus izolat ekstraktlşarından daha yüksek fenolik madde içeriğine sahip olması ile uyumludur. Bu doğrultuda DPPH değerleri diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında çok

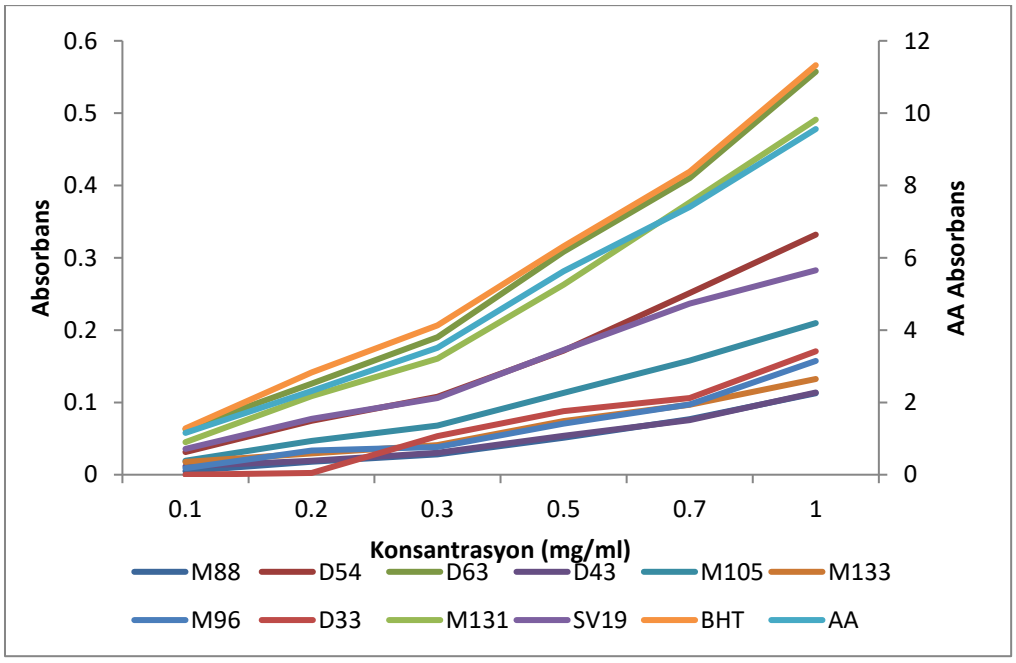
düşük olup, gelecek çalışmalar için bu suşların DPPH aktivitesinde başarılı sonuç vermeyeceği düşünülebilir.

4.2.3. Redükleyici güç tayini

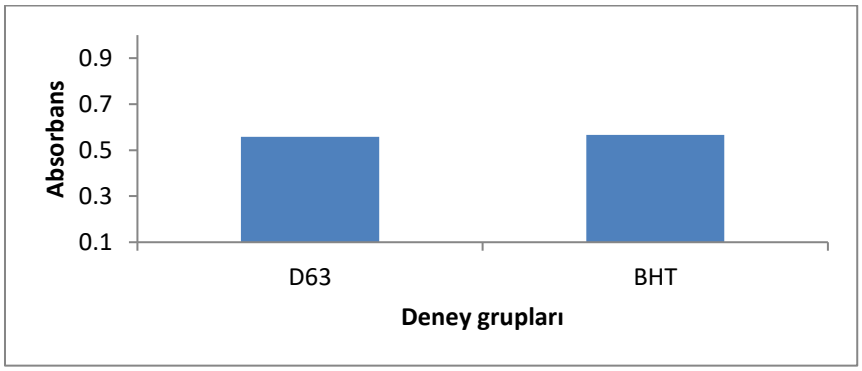
Redükleyici güç antioksidan çalışmalarında total inhibisyon aktivitesinin yüksek çıkması potansiyeli hakkında önemli ip uçları verir (Meir vd., 1995). Bu deneyde Chang ve ark. (2002)' nin önerdiği üzere Fe^{+3}-Fe^{+2} transformasyonunun mantar ekstraktları varlığındaki değişimi gözlenmiştir. En yüksek absorbans veren ekstraktlar en iyi sonucu göstermektedir.

Redükleyici güç çalışmalarında antioksidan maddeler, moleküllerde zincirleme reaksiyonun önlenmesi, metal iyon katalizörlerinin bağlanma noktalarının bloke edilmesi, peroksidazların parçalanması ve karşılıklı hidrojen çalma reaksiyonlarının önlenmesi gibi bir çok etki mekanizmasına sahiptir (Diplock vd., 1997, Gülçin vd., 2003).

Redükleyici güç çalışmasında, D63 kodlu izolat BHT ile yarışacak kadar iyi bir sonuç vermiştir. İzolatların BHT ve askorbik asitle birlikte çizgi grafikleri şekil 4.14.' te verilmiştir. D63 kodlu izolatın BHT ve askorbik asit ile karşılaştırılması şekil 4.15.' te ifade edilmiştir.

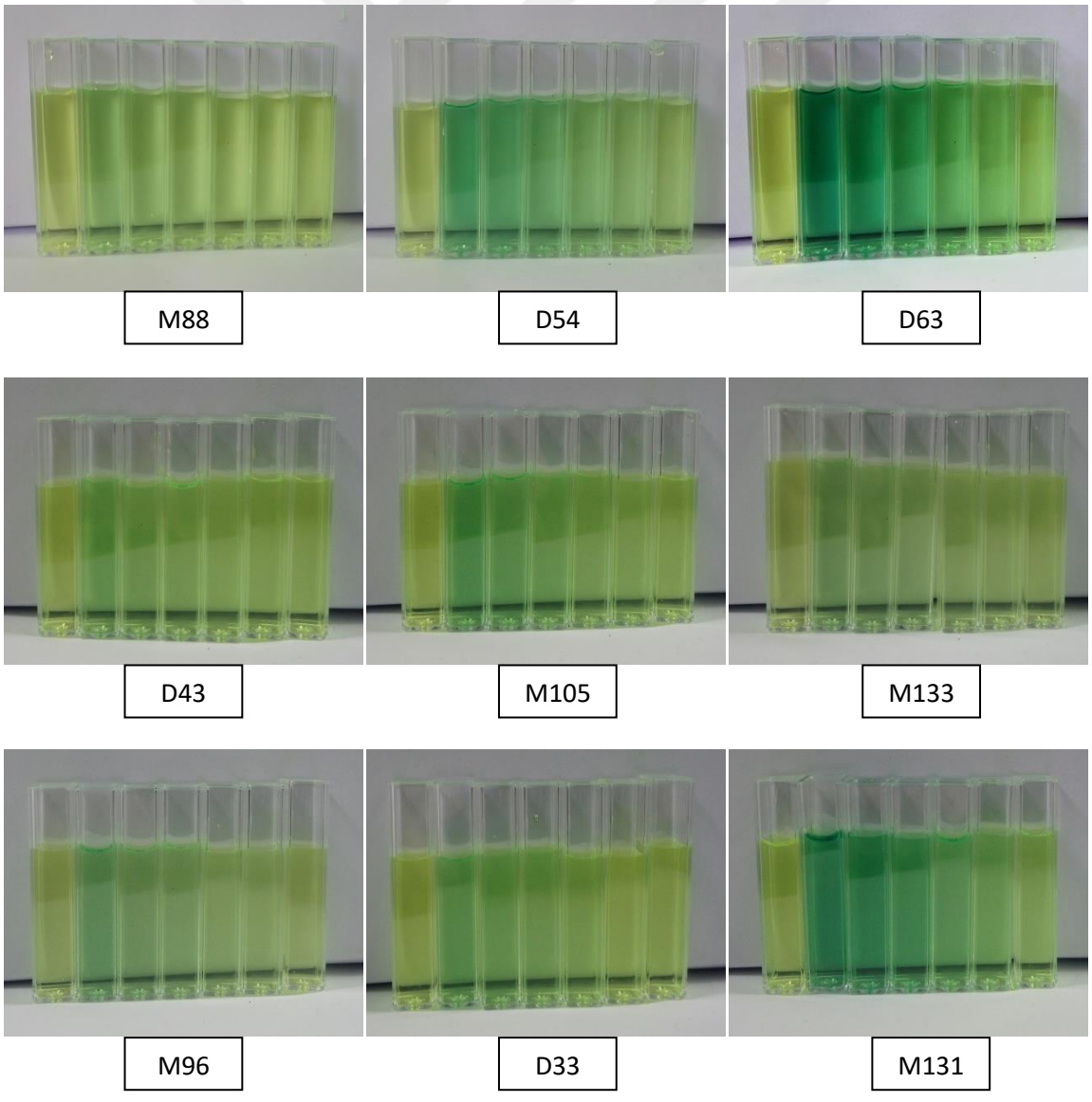


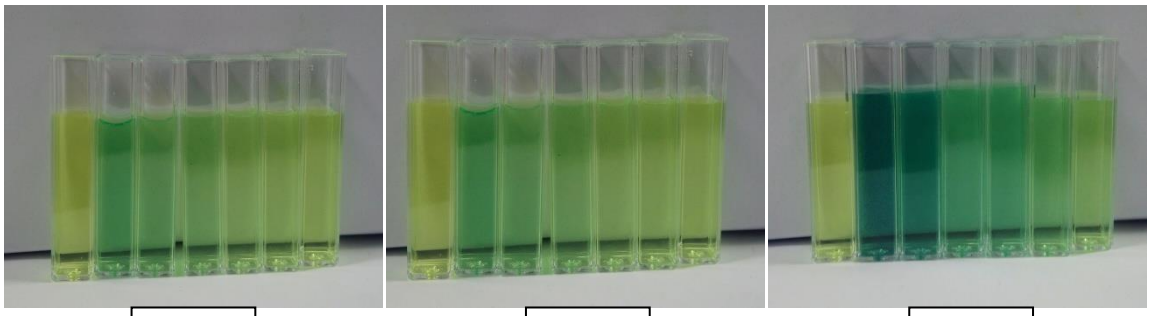
Şekil 4.16. İzolatların değişik konsantrasyonlarda (0,1-1mg/ml) askorbik asit ve BHT ile karşılaştırılması



Şekil 4.17. D63 kodlu izolat ve BHT giderimleri

Absorbansların konsantrasyonlara göre verdiği renk değişimleri şekil 4.16' da verilmiştir.





Şekil 4.18. Redükleyici güç yönteminde konsantrasyonlara göre renk değişimi (Solda kör olmak üzere 1mg/ml-0,1mg/ml aralığında)

Daha önce birçok araştırmacı tarafından makromantarlar ile redükleyici güç kapasitesi ölçülmüştür. Bu çalışmalardan birisi olan Ferreira vd. (2005) tarafından yapılan çalışmada *Lactarius deliciosus* ve *Tricholoma portentosum* makromantarlarının redükleyici güç kapasitesi sorgulanmıştır. Çalışmada 1 mg/ml konsantrasyonda *Lactarius deliciosus* için 0.006 absorbans ölçülürken, *Tricholoma portentosum* için 0.22 absorbans ölçüldüğü kaydedilmiştir.

Bir başka çalışmada Chye vd., (2008), *Schizophyllum commune, Pleurotus porrigens, Hygrocybe conica, Polyporus tenuiculus* ve *Xerula furfuracea* makromantarlarının redükleyici güç aktivitesine bakmış olup, en yüksek değer olarak *Schizophyllum commune'* nin 20 mg/ml konsantrasyonda 0,152 absorbans verdiğini belirtmiştir.

Yine bir başka çalışmada Mau vd., (2004), *Ganoderma tsugae* ile yaptıkları deneylerde 1mg/ml konsantrasyonda 0.48 absorbans yakaladıklarını kaydetmişlerdir.

Bizim yaptığımız redükleyici güç çalışmalarındaki giderimler ile diğer bazı çalışmaların karşılaştırılmaları çizelge 4.3.' te ifade edilmiştir.

Çizelge 4.3. Yüksek aktivite gösteren örneklerin bazı diğer çalışmalarla kıyaslanması a. Ferreira vd 2005 b. Mau vd., 2004, c. Chye vd. 2008, d. Bu çalışmada kullanılan örnekler

Çalışılan İzolatlar	Ekstrakt konsantrasyonu (mg/ml)	Absorbans (700nm)
Tricholoma portentosum (a)	1	0,22
Lactarius deliciosus (a)	1	0,006
Ganoderma tsugae (b)	1	0,48
Pleurotus porrigens (c)	20	0,080
Hygrocybe conica (c)	20	0,076
Xerula furfuracea (c)	20	0,036
Polyporus tenuiculus(c)	20	0,043
Schizophyllum commune (c)	20	0,152
Trametes versicolor,D54 (d)	1	0,33
Schizophyllum commune,D63 (d)	1	0,56
Ganoderma resinaceum,SV19 (d)	1	0,28
Askorbik asit	1	0,95
BHT	1	0,56

Sonuçlara bakılacak olunursa, askorbik asit en yüksek redükleme gücüne sahip madde olarak göze çarpmaktadır. Fakat diğer makromantarlar arasında *Schizophyllum commune*, kayda değer oranda yüksek bir redükleme gücüne sahiptir.

Çizelge 4.3' de görülmektedir ki başka çalışmalarda yapılan redükleyici güç tayininde *Schizophyllum commune* 0,152 absorbans verirken, bu çalışmada 0,56 absorbans vermiştir. Bu da suşlar arasındaki antioksidan aktivite farkını gözler önüne koymaktadır.

4.2.4. Beta karoten- linoleik asit antioksidan aktivite tayini

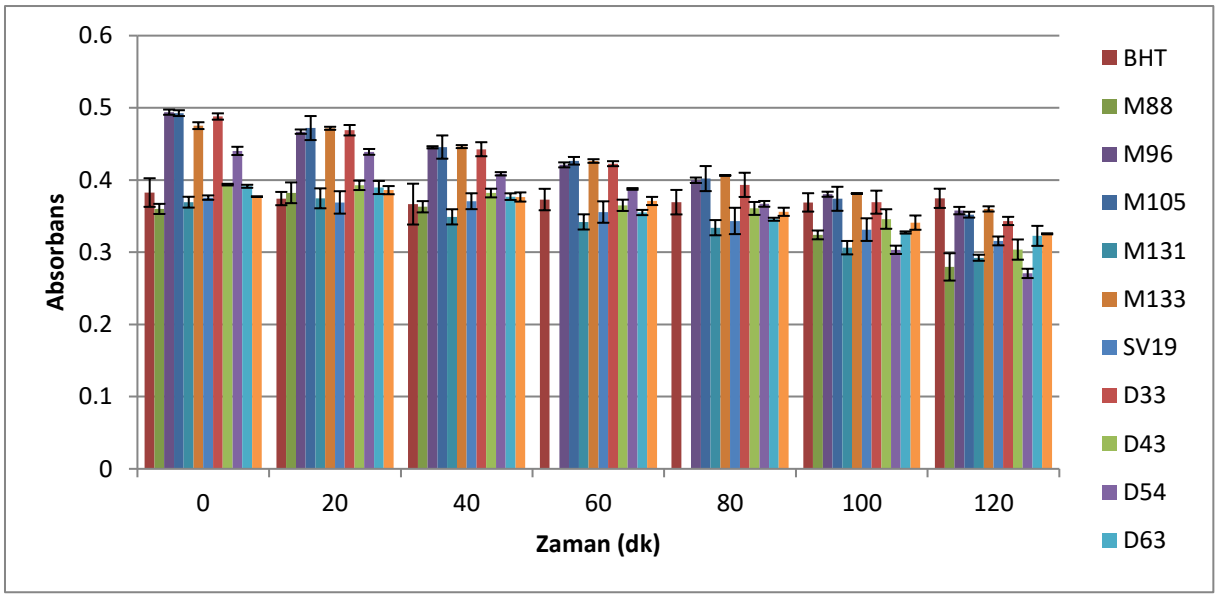
β- karoten/linoleik asit yöntemi, beta karotenin renginin, linoleik asitin oksidasyonu sonucu çıkan serbest radikallerden kaynaklı ağarmasına dayalı bir yöntemdir. Eğer ortamda antioksidan maddeler mevcut ise, serbest radikallere bağlanarak beta karotenin reniginin açılmasını önleyecektir (Lu vd., 2014).

Daha önce yapılan bazı çalışmalarda birkaç tıbbi ve ticari mantar örneğinin metanolik ekstraktlarının lipit peroksidasyonunda yüksek aktiviteye sahip olduğu kaydedilmiştir (Yang

vd. 2002; Mau vd., 2004). Fakat yaptığımız çalışmada çok yüksek bir aktiviteye rastlanılmamıştır.

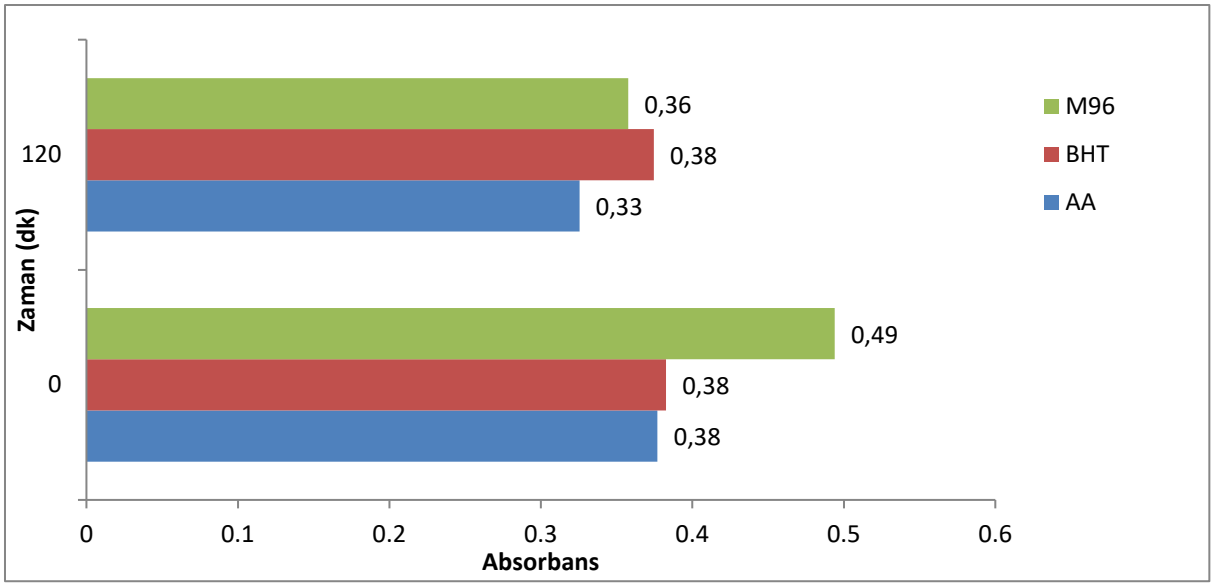
M96 kodlu *Trametes versicolor* beta karotenin korunmasında absorbans olarak askorbik asitten daha iyi bir sonuç vermiştir. Yapay bir antioksidan olan BHT ise sabit bir absorbans eğrisi göstermiş, renk açılımını kararlı bir şekilde korumuştur.

Şekil 4.19.' de izolatların renk açılımını önleme bakımından dakikaya bağlı grafikleri verilmiştir.



Şekil 4.19.İzolatların Beta karoten renk açılımın zamana bağlı grafikleri

Başarılı sonuş veren *Trametes versicolor* (M96)' nın askorbik asit ve BHT ile karşılaştırlması şekil 4.20. de verilmiştir.



Şekil 4.20. *Trametes versicolor* (M96) askorbik asit ve BHT ile karşılaştırılması

4.2.5. Metal şelatlayıcı aktivite tayini

Demir iyonları Fenton reaksiyonu ile peroksidasyona yol açmaktadır ve bazı lipit peroksidazlarını, peroksil ve alkoksil radikallerine dönüştürerek lipid peroksidasyonunda önemli rol oynamaktadır (Halliwell, 1991; Chang vd., 2002).

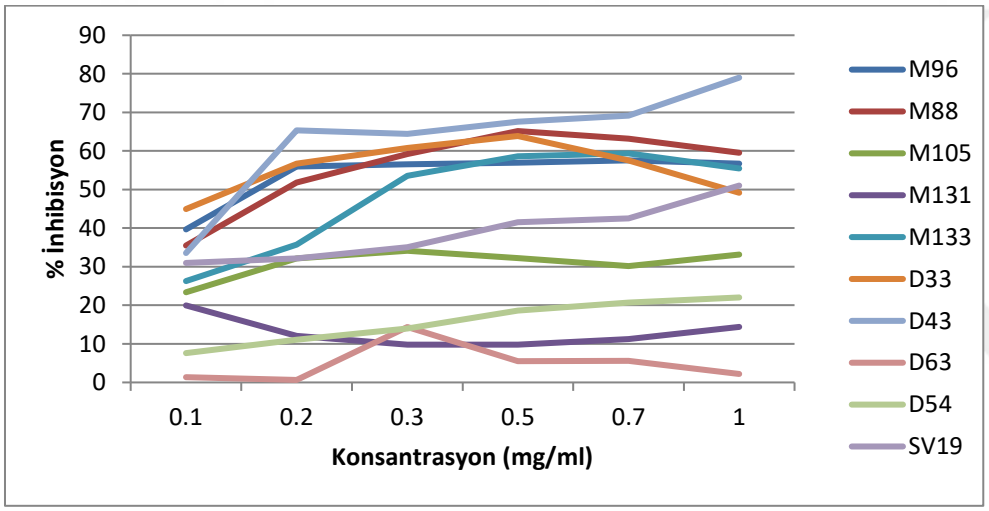
Metal şelatlama aktivitesinde ferrozin, Fe^{+2} ile bağlanmaya eğilimlidir. Eğer ortamda şelatlama ajanları mevcut ise, bu bağın oluşumunu, dolayısıyla kırmızı rengin oluşumunu önleme davranışı gösterir. Bu renk değişimi de spektrofotometrik yöntemlerle okunacak bir absorbans değişimi meydana getirir (Yamaguchi vd., 2000).

Metal şelatlama aktivitesi için pozitif kontrol olarak EDTA kullanılmıştır. EDTA'nın derişimleri 0,025-0,005 mg/ml aralığında ayarlanmıştır. Yüzde inhibisyon değerlerini hesaplamak için negatif kontrol ile ekstraktlar arasında bölüm 3.2.5.5.'de verilen bağıntı kullanılmıştır.

Çalışılan izolatların metal şelatlama aktivitesi bölüm 3.2.5.5.'de verilen denklem ile hesaplanmış, çizelge 4.4. ve şekil 4.19’ da verilmiştir.

Çizelge 4.4. İzolatların konsantrasyona bağlı % metal şelatlama aktivitleri

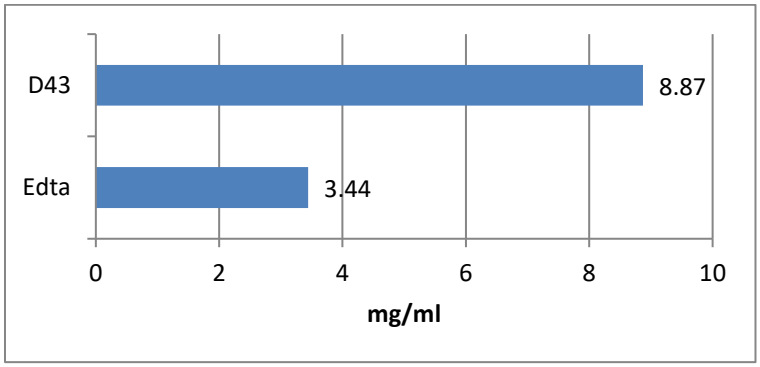
	M96	M88	M105	M131	M133	D33	D43	D63	D54	SV19
1	56,73	59,56	33,16	14,42	55,44	49,19	79,00	2,18	22,02	51,03
0,7	57,56	63,16	30,13	11,20	59,36	57,50	69,15	5,60	20,66	42,53
0,5	56,92	65,16	32,26	9,78	58,59	63,87	67,54	5,53	18,60	41,56
0,3	56,53	59,17	34,12	9,78	53,57	60,78	64,45	14,35	13,97	35,09
0,2	55,95	51,83	32,13	12,10	35,73	56,72	65,32	0,643	11,07	32,13
0,1	39,66	35,47	23,37	19,96	26,27	44,94	33,54	1,35	7,59	30,97

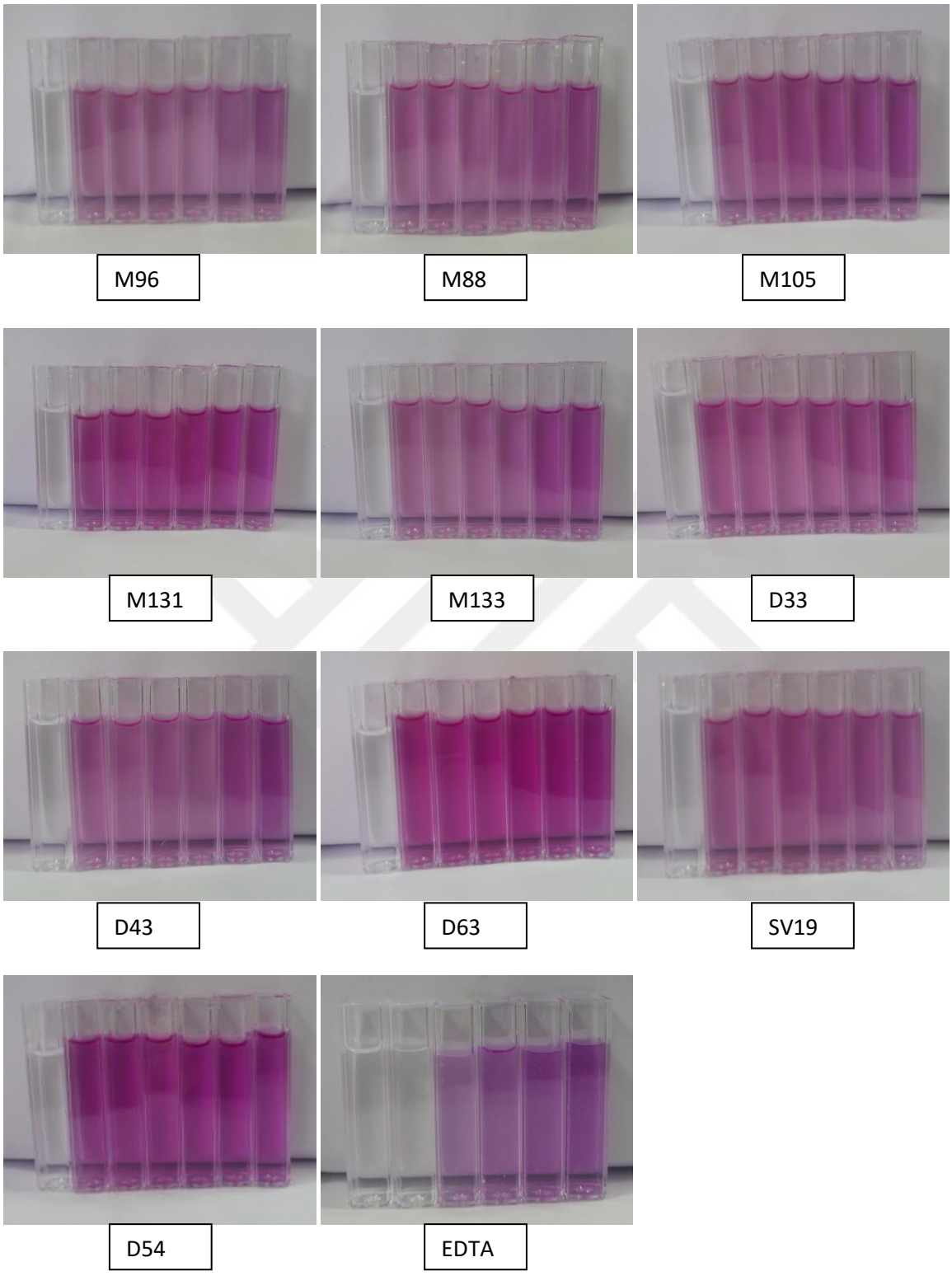


Şekil 4.21. İzolatların % inhibasyon değerlerine göre eğilim grafiği

İzolatların en başarılı olanı *Trametes hirsuta* (D43) olarak belirlenmiş olup, EC50 değeri Çizelge 4.5.' de verilmiştir.

Çizelge 4.5. *Trametes hirsuta* (D43) ve Edta için EC50 değerleri





Şekil 4.22. Metal şelatlama aktivitesinde çalışılan izolatların konsantrasyona göre verdiği renk değişimleri (Solda kör olmak üzere sırasıyla 1-0,7-0,5-0,3-0,2-0,1 mg/ml aralığında)

Daha önce Elmastaş ve ark. (2006)' nın yaptığı metal şelatlama aktivisi çalışmasında *Russula delica, Boletus badius, Agaricus bisporus, Polyporus squamosus, Pleurotus ostreatus, Lepista nuda ve Verpa conica* makromantarları çalışılmış olup, 100 µg/ml konsantrasyonlarda sırasıyla, 83.2%, 77.6%, 58.5%, 74.2%, 62.5%, 85.0%, 99.1% giderim olduğu rapor edilmiştir.

Kozarski vd., (2012) *Ganoderma applanatum, Ganoderma lucidum, Lentinus edodes* and *Trametes versicolor* ile yaptıkları çalışmalarda elde ettikler polisakkaritlerden metal şelatlama aktivitesini 0,1-20 mg/ml aralığında denemişlerdir. Elde ettikleri verilere göre EC50 değerleri açısından karşılaştırılan mantarlar *Ganoderma lucidum* için 7.34 mg/ml, *Lentinus edodes* için 8.26 mg/ml, *Ganoderma applanatum* için ise 3.58 mg/ml olarak sunulmuştur. Bizim çalıştığımız suşlar arasında *Trametes hirsuta* (D43) en verimli örnek olup EC50 değeri 8.87 mg/ml olarak belirlenmiştir.

Yapılan bazı çalışmalarda araştırmacılar, şelatlama aktivitesinin fenolik maddeyle doğrudan bir ilşkisi olup, organizmaların yapısındaki kendilerine has fenolik bileşiklerinin ve hidroksil gruplarının yerleri ve oranına göre aynı oranda artış gösterdiğini savunmuşlardır (Khokhar ve Apenten, 2003).

İzolatlardan başarılı çıkan *Trametes hirsuta* (D43) ve diğer çalışmalardan bazı makrofungus örneklerinin karşılaştırılması, çizelge 4.6.' de sunulmuştur.

Çizelge 4.6. Yüksek aktivite gösteren D43 kodlu izolatın bazı diğer çalışmalarla kıyaslanması [a. Kozarski vd., 20012(a), b. *Trametes hirsuta* (D43)]

Çalışılan İzolatlar	EC50 değeri (mg/ml)
Ganoderma applanatum (a)	3,58
Lentinus edodes (a)	8,26
Ganoderma lucidum (a)	7,34
Trametes hirsuta , D43(b)	8,87

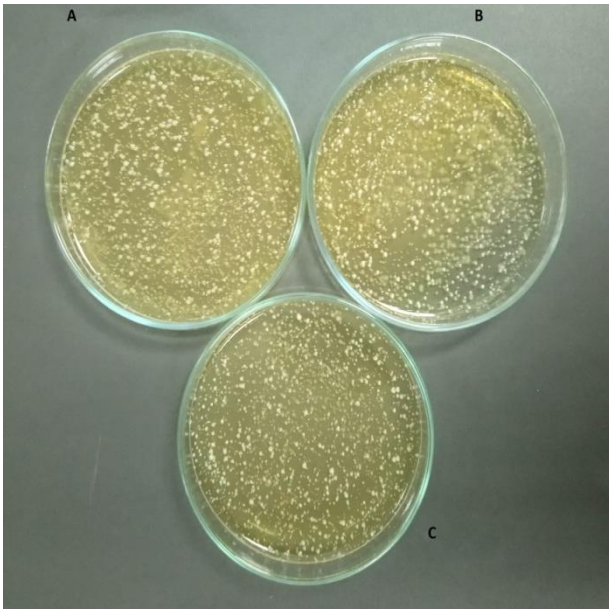
Genel olarak bakıldığında 3,44 mg/ml EC50 değeri ile EDTA en başarılı metal şelatlayıcı aktiviteye sahiptir. Kozarski ve ark. (2012)' nın yaptığı çalışmada *Ganoderma applanatum* neredeyse EDTA kadar yüksek sonuç vermiştir. Bu çalışmada en yüksek değeri

veren *Trametes hirsuta* ise EDTA ve *Ganoderma applanatum* ile yarışamayacak kadar yüksek bir değer göstermiş olsa da 1mg/ml konsantrasyonda verdiği %79 giderim ile iyi bir şelatlayıcı aktiviteye sahip olduğu söylenebilir.

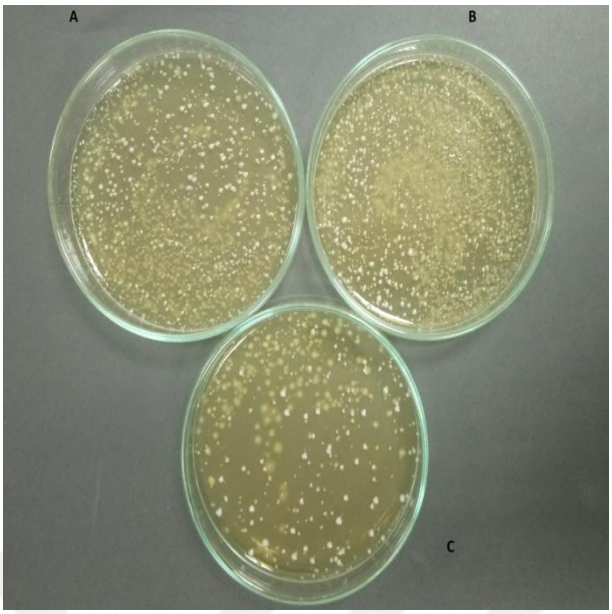
4.3.UV Koruyucu Aktivite Tayini

Ultraviyole (UV) ışınların aeorbik koşullarda derideki doymamış yağ asitlerinde süper oksit ve peroksit radikallerin açığa çıkmasında rol oynadığı bilinmektedir. UV'nin biyolojik olarak lipit peroksidasyonu, protein polimerizasyonu ve bazı enzimlerin inaktivasyonuna yol açtığı araştırmacılar tarafından gözlemlenmiştir. Bu nedenle antioksidan ilaç ve takviyelerin önemi gün geçtikçe artmaktadır (Dumont vd., 1992). Antioksidan aktivite gösteren izolatların UV' ye karşı koruyucu aktiviteleri taranması bu nedenlerden dolayı uygun görülmüştür.

Grafikten de görüldüğü üzere bazı izolat ekstraktları UV ışığa karşı kolonileri korurken, bazılarının korumada başarılı olmadığı tespit edilmiştir. Çalışılan izolatlarda en yüksek koruma aktivitesine sahip *Schizophyllum commune* (M131) ve en düşük koruma oranına sahip *Schizophyllum commune* (M133) kodlu izolatlar arasındaki karşılaştırma şekil 4.21 ve şekil 4.22’ de gösterilmiştir.

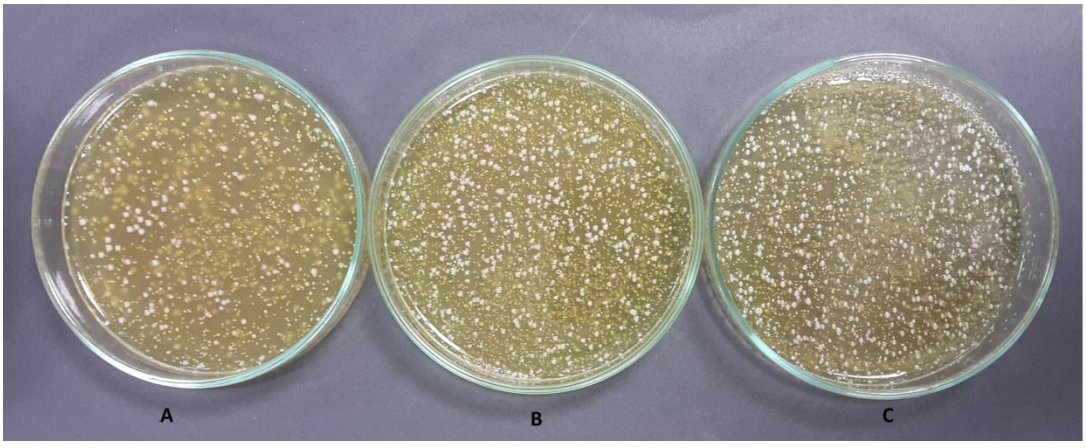


Şekil 4.23. *Schizophyllum commune* (M131)' nin UV ışığa maruz kalma zamanına göre koruma aktivitesi A.15 Saniye, B. 30 Saniye, C. 60 saniye



Şekil 4.24. *Schizophyllum commune* (M133)' nin UV ışığa maruz kalma zamanına göre koruma aktivitesi A.15 Saniye, B. 30 Saniye, C. 60 saniye

UV koruma aktivite çalışması sonucunda elde edilen koloni sayıları çizelge 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.25. Askorbik Astin UV ışığa maruz kalma zamanına göre koruma aktivitesi A.15 Saniye, B. 30 Saniye, C. 60 saniye

Çizelge 4.7. UV'ye maruz kalma saniyelerine göre *Saccharomyces cerevisiae* kültürlerindeki koloni sayısı

İzolat kodları	UV' ye maruz bırakılma süresi (saniye)		
	15	30	60
SV-19	2894	1085	1178
D33	2067	2171	1343
D43	1592	1872	1170
D54	2866	1755	1291
D63	2777	1729	1126
M88	2292	2335	1508
M96	3232	1891	1729
M105	2556	2760	1811
M131	2946	2587	1906
M133	1397	2379	342
AA	1282	3348	3330

Literatür taramasında mantar ekstraktlarının UV' ye karşı koruma etkisi hakkında herhangi bir kaynak bulunamamıştır. Çizelge 4.6. ve şekil 4.21' de sunulan verilere göre *Schizophyllum commune* (M131) kodlu izolat UV' ye karşı korumada %64 oranında bir koruma sağlayarak kayda değer bir antioksidan olduğunu göstermiş. İlerleyen zamanlarda bu çalışmaların artmasıyla belki de çok daha yüksek oranda koruyucu aktiviteye sahip izolatların bulunması oldukça mümkündür.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada 10 adet makrofungus izolatı değişik antioksidan yöntemlerle denenmiş, antimikrobiyali antioksidan ve UV koruyucu aktiviteleri *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak antioksidan aktivite çalışmalarında en yüksek total fenolik madde içeriğini 5,23 mg GAE/g ile *Schizophyllum commune* (D63), en yüksek redükleyici güç aktivitesini 0,56 absorbans ile *Schizophyllum commune* (D63), en yüksek beta karoten koruyucu aktiviteyi 0,49-0,36 absorbans aralığında *Trametes versicolor* (M96), en yüksek metal şelatlayıcı aktiviteyi 8,87 mg/ml EC50 değeri ile *Trametes hirsuta* (D43) göstermiştir. DPPH süpürücü aktivitede beklenen sonuç alınamamakla birlikte en yüksek sonuç 1mg/ml' de % 15 giderim ile *Schizophyllum commune* (D63) tarafından gözlemlenmiştir.

Yapılan antimikrobiyal aktivite taramasında hiçbir örnek aktivite göstermemekle birlikte, herhangi bir sonuç elde edilememiştir.

UV koruyucu aktivitede ise *Schizophyllum commune* (M131) türünün yapmış olduğu %64 oranında korunum göze çarpmaktadır. Bu konudaki çalışmaların eksikliği ve literatür araştırmalarında geçmemesi, makromantarların UV koruyucu aktivite gerçekleştirebildiği ve ileriki çalışmalarda bu konu üzerine yoğunlaşılması gerektiği yorumunu düşündürebilir.

Bütün bu veriler ışığında, makromantarların antioksidan aktivitelerinden çok yüksek veriler alınabilmekte olduğu ve suşlar arası farkın antioksidan kapasiteyi büyük oranda etkilediği söylenebilir. Bu sebepten dolayı ileride yapılacak çalışmalarda değişik suşların antioksidan aktivitesi ile birlikte, değişik ekstraksiyon yöntemlerinin de bu suşlar üzerinde denenmesi önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Acharya, S., Saha, A. K., Roy, A., 2012, Antioxidant level ofwild edible mushroom: Pleurotus djamor (Fr.) Boedijn, Journal of Agricultural Technology, 8, 4, 1343-1351

Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, B., Çelik, S., Bektaşoğlu, B., Berker, I., Özyurt, D., 2007, Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay, Molecules, 12, 7, 1496-1547

Arnao, B., 2000, Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case, Trends in Food Science & Technology, 11, 11, 419-421

Blois, M., 1958, Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical, Nature, 181, 1199–1200

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

Bobek, P., Galvaby, S., 1999, Hypocholesterolemic and antiatherogenic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rabbits, Molecular Nutriation Food Research, 43, 5, 339-342

Breene, W., 1990, Nutritional and Medicinal Value of Specialty Mushrooms, Journal of Food Protection, 53, 10, 883-894

Chang, C., Chung, Y., Chao, W., Lin, C., Chou, S., 2002, Antioxidative Activity and Safety of the 50 Ethanolic Extract from Red Bean Fermented by Bacillus subtilis IMR-NK1, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 8, 2454-2458

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

Cheung, L., Cheung, P., Ooi, V., 2003, Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts, Food Chemistry, 81, 2, 249-255

Choi, S., Sapers, G., 1994, Effects of washing on polyphenols and polyphenol oxidase in commercial mushrooms (Agaricus bisporus), Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42, 10, 2286-2290

Chye, F., Wong, J., Lee, J., 2008, Nutritional Quality and Antioxidant Activity of Selected Edible Wild Mushrooms, Food Science and Technology International, 14, 4

Cilerdzic, J., Kosanic, M., Stajić, M., Vukojević J., Ranković, B., 2016, Species of Genus *Ganoderma* (Agaricomycetes) Fermentation Broth: A Novel Antioxidant and Antimicrobial Agent, International Journal of Medicinal Mushrooms, 18, 397-404

Contreras-Guzman, E., Strong, F., 1982, Determination of total tocopherols in grains, grain products, and commercial oils, with only slight saponification, and by a new reaction with cupric ion, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 30, 6, 1109-1112

Cui, K., Luo, X., Xu, K., Murthy, V., 2004, Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants, Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 28, 5, 771-799

Diplock, A., Collis, C., Yang, M., Hallinan, T., Rice-Evans, 1994, C., Effects of Co-Supplementation of Iron with Ascorbic Acid on Antioxidant—Pro-Oxidant Balance in the Guinea Pig, Free Radical Research, 27, 1, 113-121

Dubost, N., Ou, B., Beelman, R., 2007, Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity, Food Chemistry, 105, 2, 727-735

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

Duh, P., Tu, Y., Yen, G., 1999, Antioxidant Activity of Water Extract of Harng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat), LWT - Food Science and Technology, 32, 5, 269-277

Dumont, E., Petit, E., Tarrade, T., Nouvelot, A., 1992, UV-C irradiation-induced peroxidative degradation of microsomal fatty acids and proteins: Protection by an extract of *Ginkgo biloba* (EGn 761), Free Radical Biology and Medicine, 13, 3, 197-203

Elmastas, M., Isıldak, O., Turkekul, I., Temur, N., 2006, Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms, Journal of Food Composition and Analysis, 20, 337-345

Ferreira, M., Lima, C., Andrade, P., Seabre, R., Pereira-Wilson, C., 2005, The drinking of a *Salvia officinalis* infusion improves liver antioxidant status in mice and rats, Journal of Ethnopharmacology, 97, 2, 383-389

Fu, H., Shieh, D., Ho, C., 2001, Antıoxıdant and Free Radıcal Scavengıng Actıvıtıes of Edıble Mushrooms, Journal of Food Lipids, 9, 1, 35-43

Gebicki, J., Bielski, B., 1981, Comparison of the capacities of the perhydroxyl and the superoxide radicals to initiate chain oxidation of linoleic acid, journal of the amerıcan chemıcal socıety, 103, 23, 7020-7022

Giri, S., Biswas, G., Pradhan, P., Mandal S., Acharya, K., 2012, Antimicrobial Activities Of Basidiocarps Of Wild Edible Mushrooms Of West Bengal, India, International Journal of PharmTech Research, 4, 4, 1554-1560

Gülçin, İ., Küfrevioğlu, İ., Oktay, M., 2003, Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts, LWT - Food Science and Technology, 36, 2, 263-271

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

Halliwell, B., Aruoma, O., Gajewski, E., Dizdaroglu, M., 1991, Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide, Biochemical Journal, 273, 3, 601-604

Hu, L., Hu, Q., Liu, J., Dong, Z., 2003, DPPH Radical Scavenging Activity of Ten Natural *p*-Terphenyl Derivatives Obtained from Three Edible Mushrooms Indigenous to China, Chemistry and Biodiversty, 1, 4, 601-605

Islam, T., Noor, A., Karon, B., Freitas, R., 2012, *In vitro* antimicrobial and brine shrimp lethality of *Allophylus cobbe* L., Ayu, 33, 2, 299-302

Johnsy, G., Kaviyarasana, V., 2011, Antimicrobial and antioxidant properties of Trametes gibbosa (pers) Fr, Journal of Pharmacy Research, 4, 11, 3939-3942

Jorgensen, J., Reller, L., Weinstein, M., Ferraro, M., 2009, Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices, Clinical Infectious Diseases, 49, 11, 1749-1755

Karadağ, A., Özçelik, B., Saner, S., 2009, Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities, Food Analytical Methods, 2, 1, 41-60

Ke C., Luo, X., Xu, K., Ven Murthy, M., 2004, Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants, Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 28, 5, 771-799

Kohen, R., Nyska, A., 2002, Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification, Toxicologic Pathology, 30, 6, 620-650

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

Khokkar, S., Owusu Apenten, R., 2003, Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure–activity relations, Food Chemistry, 81, 1, 133-140

Kozarski, M., Klaus, A., Niksic, M., Vrvic, M., Todorovic, N., Jakovljevic, D., Van Griensven, J., 2012, Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*and *Trametes versicolor*, Journal of Food Composition and Analysis, 26, 1-2, 144-153

Kumar, S., 2011, Free Radicals and Antioxidants: Human and Food System, Pelagia Research Library Advances in Applied Science Research, 2, 1, 129-135

Kuntz, S., Wenzel, U., Daniel, H., 1999, Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines, European Journal of Nutrition, 38, 3, 133-142

Liu, D., Hu, Z., Liu, Z., Yang, N., Tu, W., Li, L., 2009, Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil isolated from the cultured mycelia of *Ganoderma japonicum*, Journal of Nanjing Medical University, 23, 3, 168-172

Magalhães, L., Segundo, M., Reis, L., Lima, J., 2008, Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties, Analytica Chimica Acta, 613, 1, 1-19

Mau, J., Chang, C., Huang, S., Chen, C., 2004, Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia, Food Chemistry, 87, 1, 111-118

Mau, J., Yang, J., Tseng, Y., 2007, Antioxidant properties of polysaccharides from *Ganoderma tsugae*, Food Chemistry, 107, 2, 732-738

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

Meir, S., Kanner, J., Akiri, B., Philosoph-Hadas, S., 1995, Determination and Involvement of Aqueous Reducing Compounds in Oxidative Defense Systems of Various Senescing Leaves, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 7, 1813-1819

Miller, J.K., Brezezinska-Slebodzinska, E., Madsen, S.C., 1993, Oxidative Stress, Antioxidants, and Animal Function, Journal of Dairy Science, 76, 9, 2812-2823

Mirfat, A.H.S., Noorlidah, A., Vikineswary, S., 2010, Journal of Tropical Agriculture and Food Science, 38, 2, 231-238

Mi-Yae, S., Tae-Hun, K., Nak-Ju, S. 2003, Antioxidants and free radical scavenging activity of Phellinus baumii (Phellinus of Hymenochaetaceae) extracts. Food Chemistry, 82, 593– 597.

Moon, J., Shibamoto, T., 2009, Antioxidant Assays for Plant and Food Components, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57, 5, 1655-1666

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

Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R.L., 2001, Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 10, 4619-4626

Özparlak, H., Zengin, G., Kaşık, G., 2016, Türkiye'den Yabani ve Kültüre Alınmış Ganoderma lucidum'un Sulu Ekstraktlarının Antioksidan Özelliklernin Karşılaştırılması, Mantar Dergisi, 7, 102-109

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

Podsedek, A., 2005, Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review, LWT - Food Science and Technology, 40, 1, 1-11

Reller, B., Weinstein, M., Jorgensen, J., Ferraro, M., 2009, Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices, *Clinical Infectious Diseases, 49, 11, 1749-1755*

Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G., 1997, Antioxidant properties of phenolic compounds, Trend in Plant Science, 2, 4, 152-159

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

Shibamoto, T., Moon, J., 2009, Antioxidant Assays for Plant and Food Components, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57, 5, 1655-1666

Sridhar, S., Balakumar, R., Sivaprakasam, E., Kavitha, D., Kumar, J., 2011, Antibacterial and antifungal activity of fruit bodies of Phellinus mushroom extract, International Journal of Biosciences, 1, 3, 72-77

Sivaprakasam, E., Kavitha, D., Balakumar, R., Sridhar , S., Kumar, S., 2011, Antimicrobial Activity of Whole Fruiting Bodies of Trametes hirsuta (Wulf. Fr.) Pil. Against Some Common Pathogenic Bacteria and Fungus, International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research, 3, 3, 219-221

Tendencia, E., Peña, M., Fermin, A., Lio-Po, G., ChorescaJr., C., Inui, Y., 2004, Antibacterial activity of tilapia *Tilapia hornorum* against *Vibrio harveyi, 232, 1-4, 145-152*

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

Velioglu, Y., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B., 1998, Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 10, 4113-4117

Wenzel, U., Daniel, H., Kuntz, S., 1999, Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines, European Journal of Nutrition 38, 3, 133-142

Yang, J., Lin, H., Mau, J., 2002, Antioxidant properties of several commercial mushrooms, Food Chemistry, 77, 2, 229-235

Yamaguchi, F., Ariga, T., Yoshimura, Y., Nakazawa, H., 2000, Antioxidative and Anti-Glycation Activity of Garcinol from Garcinia indica Fruit Rind, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 2, 180-18