

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ



Bazı Mantar Türlerinin Antimikrobiyal, Antioksidan Aktivitelerinin ve Kitozan Üretimlerinin Belirlenmesi
Proje No: TSA-11-3580

Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. GÖKCEN YUVALI ÇELİK

Eczacılık Fakültesi/Eczacılık Teknolojisi

Araştırmacının Adı Soyadı

Yrd. Doç. Dr. DİLŞAD ONBAŞLI

Eczacılık Fakültesi/Eczacılık Teknolojisi

Yrd. Doç. Dr. HAKAN ALLI

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi

Fen Edebiyat Fakültesi/Biyoloji Bölümü

Araş. Gör. BERRAK ALTINSOY

Eczacılık Fakültesi/Eczacılık Teknolojisi

Mart 2014

KAYSERİ

TEŞEKKÜR: Bu proje kapsamında ülkemiz için ekonomik anlamda öneme sahip bazı makrofunguslara ait özütlerin biyolojik aktivitelerini araştırmak üzere çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Böyle bir çalışmanın gerçekleştirilmesi için araştırmacılara maddi destek sağlayan ERÜ BAP Birimine ve antioksidan çalışmalarında bilgi ve desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Belma ASLİM' a sonsuz teşekkürlerimizi sunarız.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	1-2
ABSTRACT	3-4
1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM	5-8
2. GENEL BİLGİLER	9-20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21-30
4. BULGULAR	31-42
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	43-48
6. KAYNAKLAR	49-60

ÖZET

Tıbbi bitkilerin tarihi insanlık tarihi kadar eskidir. Bugün mevcut ilaçların çoğunun bitkisel kaynaklı olduğu söylenebilir. Doğal farmasötik kaynak olarak yüksek bitkilerin kullanımlarına alternatif bazı makrofunguslarında anti-enfeksiyon ve antioksidan özellikleri bakımından, biyolojik aktivitelerinin araştırılmasının gerekli olduğu düşünülmektedir. Bu bağlamda proje kapsamında bazı makrofungus türleri olan *Ganoderma lucidum*, *Pisolithus arrhizus*, *Tricholoma sp.*, *Sarcosphaera crassa*'nın antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Mantarlar toplanıp kurutulduktan sonra etanol ve metanol ile özüt edilmiştir. Mantar özütlerinin antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon metoduna göre tanımlanmıştır. Özütlerin antimikrobiyal aktivitesi *Bacillus subtilis* RSKK 244, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 04019 mikroorganizmalarına karşı test edilmiştir. *C. albicans* ve *C. glabrata* üzerine çalışılan tüm makrofunguslar etki gösterirken *P. arrhizus* ve *Tricholoma sp.* makrofungusu türleri referans antibiyotikğin neden olduğu etkiden daha yüksek etki göstermişlerdir. *E. coli* üzerine *P. arrhizus*, *G. lucidum* ve *S. crassa* özütleri referans antibiyotikten daha yüksek etki göstermiştir. *B. subtilis* üzerine dört mantar türünde inhibisyon göstermiştir fakat bu etki referans antibiyotikğin etkisinden daha düşüktür. *S. aureus* üzerine dört tür makrofungusunun da etki gösterdiği gözlenmiştir. *Tricholoma sp.* mantar türü hariç diğer tüm mantarlar referans antibiyotikten daha yüksek aktivite göstermiştir. Mantar özütlerinin antioksidan aktivitesi ise; üç konsantrasyonda ($0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,50 \text{ mg.mL}^{-1}$ and $1,00 \text{ mg.mL}^{-1}$) DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) üzerinden serbest radikal süpürücü etki tayini, demir iyonları üzerinde metal şelatlama aktivitesi, β -karoten, likopen, total fenol ve linoleik asit peroksidasyonu deneyleri ile tanımlanmıştır. *P. arrhizus*, *S. crassa* ve *G. lucidum* mantarlarının metanol özütlerinin DPPH süpürücü etkisi etanol özütlerinden daha yüksek çıkarken *Tricholoma sp.*'nin etanol özütünün DPPH giderimi metanol özütünden daha yüksek çıkmıştır. *P. arrhizus*'un metanolik ekstraktı etanolik ekstraktından daha yüksek fenolik içeriğe sahipken diğer üç mantarın etanol özütü metanol özütünden daha yüksek fenolik içeriğe sahiptir. Çalışmamızda ki mantar örneklerinin hem metanol hem de etanol özütlerinde β -Karoten ve Likopen miktarları az miktarda bulunmuştur. Linoleik asit peroksidasyonu *G. lucidum* ve *Tricholoma sp.* 'nin metanol ekstraktlarında gözlenirken *Tricholoma sp.* ve *P. arrhizus* mantarlarının etanol ekstraktlarında görülmüştür. Mantar örneklerinin etanol ve metanol özütlerindeki toplam flavonoid içeriği *S.crassa* dışındaki mantarlarda birbirine yakın değerlerde bulunmuşken

S.crassa 'nın metanol ekstraktında daha fazla miktarda flavonoid içerdiği tespit edilmiştir. *P. arhizus* ise en yüksek toplam flavonoid içeriğine sahip mantar türüdür. Genel anlamda metanol ekstraktları daha yüksek metal şelatlama kabiliyeti göstermiştir.

Anahtar kelimeler: *Ganoderma lucidum*, *Pisolithus arrhizus*, *Tricholoma sp.*, *Sarcosphaera crassa* makrofungusları, antimikrobiyal aktivite, antioksidan aktivite

ABSTRACT

The history of using plants to treat diseases is as old as the human history. Most of the medicines available today are estimated to be originally derived from plant sources. In contrast to the extensive utilisation of higher plants as a source of natural pharmaceuticals, only minute amount of the some bryophytes are screened in terms of their anti-infective and antioxidant properties until now. In this context antimicrobial and antioxidant activities of *Ganoderma lucidum*, *Pisolithus arrhizus*, *Tricholoma sp.*, *Sarcosphaera crassa*, macrofungi species were studied within the project. Macrofungus were collected and subjected to ethanol and methanol extraction after air drying. Antimicrobial activity of macrofungus extracts were identified by determining the disc diffusion method. Antimicrobial activities of the extracts were tested against *Bacillus subtilis* RSKK 244, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 04019. As a result of the study, antimicrobial effects that is higher than the reference antibiotic, of *P. arhizus* and *Tricholoma sp* samples were found against *C. albicans* and *C. glabrata*. In addition, *P. arhizus*, *G. lucidum* and *S. crassa* extracts showed inhibition that is higher than the reference antibiotic, against *E.coli*. All macrofungus extarcts inhibited *B. subtilis* but, these values are not more effective than reference antibiotic. All extracts (except *Tricholoma sp.*) showed inhibition that is higher than the reference antibiotic, against *S.aureus*. The antioxidant activity of macrofungus extracts were tested in three concentrations (0,25 mg.mL⁻¹, 0,50 mg. mL⁻¹ and 1,00 mg.mL⁻¹) and total phenolic compounds in the extracts were determined. Antioxidant activities of the samples were identified by DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radical scavenging assay, metal chelating activity on ferrous ions , β -caroten, licopen, total phenol, total flavonoid and linoleic acid peroxidation inhibitory assays. The results of DPPH radical scavenging activity were found to be methanol extracts of *P. arhizus*, *S. crassa* and *G. lucidum* were higher than ethanol extracts while ethanol extract of *Tricholoma sp.* was higher tahn methanol extract. Methanol extract of *P. arhizus* was higher phenolic compounds than ethanol extract while ethanol extract of other three macrofungus were higher phenolic compounds. β -caroten and licopen were found in small amounts in ethanol and methanol extracts of used macrofungus. Linoleic acid peroxidation was observed methanol extracts of *G. lucidum* and *Tricholoma sp.*, ethanol extracts of *P. arhizus* and *S. crassa*. Total flavonoid contents of samples of macrofungi were found the same values except *S. crassa*. Total flavonoids amount of

methanol extract of *S. crassa* higher was determined. *P. arrhizus* has the highest total flavonoid contents. In general higher than methanol extracts showed metal chelating ability.

Keywords: *Ganoderma lucidum*, *Pisolithus arrhizus*, *Tricholoma sp.*, *Sarcosphaera crassa* macrofungus, antimicrobial activity, antioxidant activity.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Bitkiler alemi yüz milyonlarca yıl süren evrimleşme süreci içerisinde inanılmaz sayıda ve çeşitlilikte cins ve türlerin var olmasına şahit olmuştur. Tıbbi bitkilerin tarihi insanlık kadar eskidir. Eski çağlarda hastalıkların tedavisi konusunda diğer canlıların davranışlarının incelenmesi ve taklit edilmesi ilaçların oluşumunda büyük önem taşımaktadır. Hayvanların çeşitli bitkileri kullanarak kendilerini tedavi etmeleri insanları da bitkilere yönlendirmiştir. Bitkilerin bu özelliklerinin kaynağı araştırılmış ve içeriğindeki çeşitli materyallerin bazı fizyolojik aktivitelere sahip olduğu gözlenmiştir. Bunlara örnek olarak; anti-mikrobiyal, anti-viral, analjezik, anksiyolitik, anti-depresan, anti-inflamatuar, anti-kolinesteraz, anti-oksidan, amoebisidal, anti leishmanial, anti-platelet, antiproliferatif, pro-apoptotik, akıl hastalıkları, diyabet, karaciğer koruyucu, HIV-1 integras inhibitörü aktiviteleri verilebilir (1).

Günümüzde bilim ve teknolojiye ilerlemelere rağmen doğal kaynakların bilinçsizce tüketimi ve karşılaşılan ekonomik güçlükler, doğal kaynakların birçok amaçta kullanımlarını zorunlu kılmıştır. Enfeksiyöz hastalıklarla mücadelede bugüne kadar gerçekleştirilen doğal ve sentetik antibiyotiklerin mikroorganizmaların direnç kazanmaları sonucu etkisiz kalmaları ve çeşitli yan etkilerinin bulunması araştırmacıları yeni ve değişik antimikrobiyal maddeler keşfetmek için doğaya yöneltmiştir (2, 3). Bitkilerin bakteri ve funguslara karşı inhibisyon etkisi gösteren bazı kimyasal maddeler ürettikleri bilinmektedir (2).

Yenilebilen mantarlar, çok eski çağlardan beri yiyecek olarak tüketilmektedir (4). İlk kavimler, deneme yanılma yoluyla yenilebilen ve zehirli mantarları ayırmışlardır ve zamanla mantarlar hakkında bilgi sahibi olmuşlardır (5). Mantarlar besin içeriği bakımından; düşük kaloriye sahiptir ve esansiyel aminoasitler, karbonhidratlar, lifler, önemli vitaminler ile mineraller bakımından zengindir. Mantarlar aynı zamanda Doğu ülkelerinde asırlardır ilaç şeklinde kullanılmaktadır (4). Tıbbi mantarların ortaya çıkış tarihi ise geleneksel Doğu terapilerine kadar uzanır. Japonya, Çin, Kore gibi Uzakdoğu ülkeleri ve diğer Asya ülkeleri modern klinik uygulamalarında kurutulmuş mantar materyallerinin günümüzde de güvenle kullanmaya devam etmektedir (6). Makro mantarların tıbbi amaçlı kullanımı, özellikle Asya

lkelerinde çok eski bir gelenek olmasına rağmen batı ülkelerinde kullanımı ancak son çeyrek asırda dikkate değer bir artış göstermiştir (7).

Tıbbi mantarlar, normalde daha çok toz edilerek veya sıcak su ekstreleri yapılarak tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Sıvı konsantreler veya kurutulup toz edilmiş mantarları içeren kapsüller, diyetek besin olarak kullanılırlar ve sağlığa potansiyel katkıları vardır (4). Sıvı konsantreler halinde veya kuru toz haline getirilmiş mantar kapsüllerinin, diyet maddesi veya sağlıklı yaşamı destekleyecek besin maddesi olarak güvenle kullanılabileceği bildirilmiştir (8).

Mantarlar, hayvansal besinlerden daha az ancak birçok bitkisel besinden daha çok protein içeren, kolay sindirilebilir bir protein kaynağıdır. Mantarlar, esansiyel tüm amino asitleri içerir ancak metionin, sistin ve sülfürlü amino asitleri az miktarda bulundurur. Mantarlar bol miktarda P ve K, daha az miktarda ise Fe ve Ca olmak üzere, tüm mineralleri gelişimlerinin her aşamasında bulundururlar. Özellikle tiamin, riboflavin, niasin, biotin ve askorbik asit gibi vitaminlerin de kaynağıdırlar. Ayrıca mantarlar zengin bir folik asit kaynağı olduğundan kansızlık tedavisinde kullanılabilir.

Bazı mantar türleri yüksek oranda β -karoten ve ergosterol içerir. Bu bileşikler UV ışınlara maruz kaldıklarında aktif D vitaminine dnşrlar (9). Bunun yanı sıra *Cantharellus cibarius* (2,9-5,8 $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$) yüksek miktarda D 2 vitamini içermektedir(10). Mantarlar; yağ asitleri, gliseritler (mono-, di- ve tri-), steroller, sterol esterler ve fosfolipitler vb. tüm ana lipit bileşenlerini içerir. Ancak yağ içerikleri genelde düşük olup, kurutulmuş mantarlarda yaklaşık % 2-8 oranındadır (4).

Mantarlar; protein, polisakkarit bileşikleri (polisakkarit-K, polisakkaritpeptit ve lentinan), ikincil metabolitler (terpenler, alkaloitler ve laktonlar) ve enzimler (laktaz, glikoz oksidaz ve peroksidaz) gibi terapötik etkinliğe sahip birçok biyokimyasal madde içerirler. Mantarlar bazı fenolik bileşikler, flavanoitler, tokoferoller, askorbik asit, kuinonlar, terpenoitler ve fenil propanoit türevi antioksidan etkili bileşikleri sentezleyebilir. Antitümör etki gösteren kalvasin, volvotoksin, flammutoksin, lentinan ve porisin bileşikleri yalnızca makro mantarlardan izole edilmiş çok önemli antioksidan maddelerdir. Bu bileşikler aynı zamanda antiviral özellik de göstermektedirler (5).

Ticari değer taşıyan mantarların, besinsel özelliklerinin yanı sıra çok sayıda tedavi edici tıbbi etkileri keşfedilmiştir (11). Son zamanlarda yeni tedavi yöntemleri üzerine yapılan bilimsel çalışmalarda kullanılan çok sayıda mantarın; antitümör, antiinflamatuvar, bağışıklık sistemini destekleyici ve antibiyotik etki gibi birçok terapötik etkiye sahip olduğu bulunmuştur (12). Mantarların ayrıca; hipertansiyon, hiperkolesterol ve kanser gibi kronik hastalıklara karşı koruyucu bir yiyecekler olarak kullanıldıkları bildirilmiştir (13).

Mantarların bilinen genel tıbbi özellikleri;

- 1- Antimikrobiyal etki
 - 2- Antioksidan etki
 - 3- Hepatoprotektif etki
 - 4- Antidiyabetik etki
 - 5- Bağışıklık sistemini düzenleyici etki
 - 6- Antitümör etki
 - 7- Kolesterol düşürücü etki
- şeklinde sınıflandırılabilir.

Yukarıda da bahsedildiği gibi mantarlar antimikrobiyal, antiviral, analjezik ve antiinflamatuvar aktivitesine ek olarak içeriğinde bulundurduğu çeşitli biyolojik olarak aktif maddelerden dolayı antioksidan aktiviteye sahip olabileceği bakımından da umut vaatetmektedir. Bu nedenle makrofunguslarının antioksidan aktivitelerinin araştırılması gerekli hale gelmiştir.

Bu proje de bazı mantar özütlerinin patojen mikroorganizmaları inhibe etme gücü ve antioksidan özelliklerine bağlı olarak doğal ve yeni antibiyotiklerin üretilmesine yönelik kayda değer bir ön çalışma olması hedeflenmiştir. Bunlara ek son yıllarda, endüstriyel uygulamalarda kısa süreli olarak kullanılabilen ve çevreye geri dönüşümü olmayan petrol temelli polimerler yerine, doğal kaynaklardan elde edilen ve biyolojik olarak bozunabilen biyopolimerler tercih edilmektedir. Kitin; selülozdan sonra doğada en fazla bulunan ikinci yenilenebilir önemli bir biyopolimerdir. Kitin türevi olan kitosan ise doğal olarak üretilmesi, biyolojik olarak parçalanabilmesi, toksik olmaması özellikleri nedeniyle ilaç, gıda ve hücreyi koruma veya onarmaya yönelik çalışmalarda tercih edilme sebebidir. Bu biyopolimer daha çok yengeç ve karides gibi kabuklu deniz canlılarının kabuğundan (Crustacea) elde edilmektedir. Fakat bu canlıların mevsimsel tedarikinin zorluğu, kitosanın eldesinde kimyasal yöntemin kullanılması, düşük miktarda elde ediliyor olması ve maliyetinin

yüksek olması nedeniyle yeni kitosan kaynaklarına yönelik arayış artmaktadır. Türkiye kaynaklı bu makrofungus türlerinin kullanılması ile elde edilecek polimerin durumunun ortaya çıkarılması bir diğer hedefimizdir. Bu hedefimize ulaştığımız takdirde başka makrofungus türleride önemli bir kitosan kaynağı olarak değerlendirebilmesinin önü açılacaktır. Mevcut antibiyotiklere hızla direnç kazanan patojen mikroorganizmalara yönelik yapılan yeni antibiyotiklerin keşfi ya da suni antibiyotiklerin üretilmesi artık tüm dünyada önem arz eden çalışmaların başında gelmektedir. Ayrıca pek çok canlı türü reaktif oksijenler tarafından oluşturulan oksidatif türlere karşı kendilerini korumak için savunma sistemi geliştirmiştir. Son çalışmalar, oksidatif yıkıma karşı savunmada ve kanser, damar tıkanıklığı farklı insan hastalıklarında ve yaşlanma sürecinden korunmada bitkilerin antioksidan özelliklerinin de etkin olacağını göstermektedir. Özellikle doğal kaynaklı antioksidan türlerin geliştirilmesi ve kullanılması günümüzde önemli araştırma konuları arasında yerini almıştır. Makrofungusların bazı hastalıkların tedavisinde uzun yıllardır kullanıldığı dikkate alınırsa, patojen mikroorganizmalar üzerinde inhibisyon etkiye ve antioksidan özelliğe sahip makrofungusu türlerinin tespit edilip, etken maddelerinin saflaştırılarak analiz edilmesinin ilaç endüstrisine yönelik çalışmalar içersinde önemli bir yer teşkil etmesi kaçınılmaz olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Besinsel açıdan fonksiyonel gıdaların ve fizyolojik açıdan yararlı ilaçların kaynağı olan makrofungusların kullanılması Mısır, Roma, Yunan, Çin gibi eski medeniyetlere dayanmaktadır (12). Günümüzde ise makrofungusların besin ve tıbbi amaçlı kullanımı özellikle Asya ülkelerinde çok eski bir gelenek olmasına karşın Kuzey yarımkürede ancak son yirmi yılda dikkate değer bir artış göstermiştir. Bu durumun bir göstergesi olarak, dünya genelinde 1991 yılında tıbbi amaçlı kullanılan makrofungusların pazar değeri 1.2 milyar dolar iken 2001 yılında 6 milyar dolara yükselmiştir (14,15). Dünyada bilinen yaklaşık 10.000 makrofungus türü içinde tıbbi etkileri olabilecek türlerin oranı sadece % 5'tir ve bu türler hakkındaki bilgi birikimi de maalesef oldukça azdır (14,16).

Ökaryotik hücre yapısına sahip heterotrof canlılar olan makrofunguslar hiiflerden oluşan ağsı bir yapıya sahiptirler (17). Birçok et ve süttten daha az ancak birçok sebzedden daha çok protein içeren, kolayca sindirilebilir bir protein kaynağıdır. Mantarlar esansiyel tüm aminoasitleri içerir ancak metiyonin, sistin ve sülfür aminoasitlerini az miktarda bulundurulur. İçeriklerine bakıldığında büyük oranda fosfor ve potasyum, az miktarda demir ve kalsiyum olmak üzere tüm mineralleri gelişimlerinin tüm basamaklarında bulundurulurlar (9). Özellikle tiyamin (B1), riboflavin (B2), niyasin (B3), biyotin (B7) ve askorbik asit (C vitamini) gibi vitaminlerin kaynağı olan makrofungusların folik asit bakımından da zengin olan ve kansızlık tedavisinde kullanılan bazı türleri, fark edilebilir miktarda β - karoten ve ergosterol içerir. Yapılarındaki ham yağlar; yağ asitleri mono-, di- ve trigliserid'ler, steroller, sterol esterleri ve fosfolipidler dahil tüm ana lipid bileşenlerini içerir. Yağ asitleri genelde düşük olup kuru mantarın yaklaşık % 2-8' ini oluşturur. Karbonhidrat ve yağ içeriklerinin pek çok besine göre düşük olması sebebiyle sağlıklı bir beslenme rejimi için aratılan özelliklere sahiptirler (7,18). Çok katlı ve fibriler özellikteki hücre duvarı, miktarı türe ve mevsimsel koşullara göre değişen polisakkarit (yaklaşık % 80), protein(% 5-15) ve lipid'(% 3-10) ihtiva eder. Polisakkaritler arasında kitin, kitosan, glukon, galaktoz, manan ve selüloz en fazla bulunanlarıdır (5) . Yabani veya kültüre edilmiş olarak dünyanın farklı bölgelerinde yetiştirmekte olan mantarlarda bulunan bu gıda

bileşenleri, türe, insan kökenli faktörlere, toprak yapısı ve bölgesine bağlı olarak değişebilmektedir (19).

Bu çalışmada kullanılan ve biyolojik aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiş olan *Ganoderma lucidum*; benzersiz çift tabakalı basidiosporlara sahiptirler. Basidiosporların şekli ve büyüklüğü, baş kısmının yüzey yapısı *Ganodermataceae* üyelerinin belirlenmesi açısından önemli özellikleridir. *Ganoderma* türleri mantarlar alemine dahil, Basidiomycota bölümünden Homobasidiomycetes sınıfına mensup, Aphyllophorales takımından Polyporaceae familyasına (*Ganodermataceae*) giren *Ganoderma* cinsidir (20, 21). Polyporaceae familyasına ait mantar grupları basidiokarplarının alt yüzlerinde sporlar içeren küçük delikli yapılar arz etmeleriyle karakterize olmaktadır. Kore, Çin ve Japonya gibi uzakdoğu ülkelerinde *Ganoderma*'nın bazı türleri tıbbi amaçlı doğal ürünler şeklinde kullanılmaktadır. Yakın zamanda *Ganoderma*'nın kullanımına ilişkin yoğun bir ilgi oluşmuştur. Çalışmalar *Ganoderma* bileşiklerinin medikal anlamda çok önemli tesirleri olduğunu göstermiştir. *Ganoderma lucidum*'dan saflaştırılan ganoderik asitlerin farnesyl protein transferaz üzerinde inhibitör etki oluşturması Ras onkoproteinini katalizlenmesini engellediğini göstermiştir. Yani ganoderik asitler Ras-onkogenine bağlı hücre transformasyonunu engellemektedir (22). *G. lucidum*'dan elde edilen polisakkaritlerin antifibrotik etkileri olduğu ve karaciğerdeki kollegen içeriğini indirgeyerek karaciğer morfolojisinin gelişimine olumlu tesir ettiği bildirilmiştir (23). Benzer bir çalışmada doku transplantasyonunda kullanılan immün sistemi modüle edici ajanların *G. lucidum*'dan elde edilebileceği bildirilmiştir (24). İlave olarak *G. lucidum*, *Ganoderma formosanum* ve *Ganoderma neo-japonicu*'un sıvı ekstraktlarının serbest radikallerin aranmasında ve antihepatotoksik aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir (25). *Pisolithus arrhizus*; tarçın kahvesi renginde, 7-12 µm büyüklüğünde küresel ve dikenli sporlara sahip mikorizal bir mantar türüdür (17). Mikoriza, mantar miselleri ile yüksek bitkilerin kökleri arasındaki karşılıklı yararlanmaya dayanan bir ilişkidir. Bu ilişkide mantar bitkiden karbon ve esansiyel organik maddeleri temin ederken, bunun karşılığında bitkiye su, mineral tuzlar ve metabolitlerin alımında yardımcı olmaktadır. Ektomikoriza ise mikorizanın tarım ve ormancılık açısından önemli bir tipidir. Ektomikorizal mantarlar ekonomik açıdan mantarların en önemli gruplarından biridir. Birçok ekosistemde bu mantarlar topraktaki mikrobiyal kitlenin en önemli üyelerindendir. Ototrof olan konukçu bitki ile heterotrofik organizma arasında besin alışverişi ve ekolojik olarak doğal dengenin korunmasını sağlayan mikoriza, bu yönü ile ekosistemdeki besin döngüsü ve bitki canlılığının devamında büyük bir öneme

sahiptir (18). Ölü adamın ayağı (dead man's foot) olarak bilinen bu sıradışı mantar kırılabilir ve kolayca toz haline dönüşebilir. Geleneksel Çin tıbbında haricen uygulandığında yara iyileşmesi, şişlikleri dindirme ve kanamaları durdurmada ve irin tedavisinde kullanılır. Dahilen uygulandığında ise özofagus ve mide kanamalarını durdurmada kullanılır. Japonya'da *kotsubutake* olarak bilinen bu mantar, akciğerlerde bir ısıtıcı gibi davranarak öksürük, boğazda şişlik ve ağrı ile burun kanamaları tedavilerinde de ilaç olarak kullanılır. Kimyasal içeriğinde bulunan ve bir triterpen olan pisosterolün yedi kanser hücrelerini özellikle lökoma ve melanoma hücrelerini inhibe ettiği rapor edilmiştir (26). Ülkemizde Antalya, Aydın, Balıkesir, Çanakkale, Denizli, İzmir, Kahramanmaraş, Kütahya, Malatya, Manisa, Mersin Muğla bölgeleri olmak üzere geniş bir yayılış alanına sahiptir (27). Basidiomycetes ikincil metabolitlerin zengin kaynağı olarak bilinmektedir (28). *Tricholoma* türlerinde yapılan araştırmalar çok sayıda metabolit içerdiğine ve özellikle bu metabolitlerin terpenoid türevlerinden oluştuğunu ortaya koymuştur (29). Bu sebeple son yıllarda *Tricholoma* cinsi çeşitlerinin fitokimyasal çalışmaları özellikle çeşitli terpenoidler: diterpenler (30) ve triterpenler, polioksitlenmiş steroidler, fenolik monoterpeneoidler, geranil siklohekzenonlar ve diğer indol türevleri gibi bileşenler olarak karakterize edilmiştir (31). *Tricholoma* türlerinden *T. equestre* dikkat edilmesi gereken yenilebilir bir türdür, birçok ülkede tüketilmesine rağmen oldukça toksiktir. Fransa'da *T. equestre* içeren yemekten sonra Miyotoksin varlığından dolayı, çok sayıda ertelenen rabdomyoliz olayları (çizgili kasın erimesiyle görülen akut böbrek yetmezliği) gözlenmiştir (32). "White matsutake" veya "giant" mantarı olarak bilinen *T. giganteum* yenilebilir, oldukça değerli ve nadir bulunan bir mantardır. Yapılan çalışmalarda antitümör etkisi gösteren polisakkaritler ihtiva ettiği gözlenmiştir "Pine-mushroom" (*T. matsutake* Sing.) dünya üzerinde en değerli mantar türlerinden biridir. Cho ve arkadaşları, Pine-mushroom (*T. matsutake* Sing.) mantar türünün sap ve şapka kısmının uçucu bileşenlerinin ve koku verici maddelerinin tespiti çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Şapka kısmında uçucu bileşenlerden metil sinamat, 1-okten-3-ol, [E]-linalol oksit, [E]-2-okten-1-ol ve 3-oktanol sırasıyla majör bileşenler olarak belirlenirken, sap kısmında 1-okten-3-ol majör bileşenken onu metil sinamat, [E]-2-okten-1-ol ve linalol takip etmektedir. Mantarlarda 1-hekzanol, benzaldehit, nonanal, α -terpineol, 2-etil-heksanol, 3-oktanol, 1-okten-3-on, [E]-2-okten-1-ol, 3-oktanon, Linalol, [E]-2-desenal, 2-metil-butanoik asit etil ester, 2-metil-3-buten-2-ol ve fenil-asetaldehit koku verici maddeler olarak tespit edilmiştir (31,33).

Tıbbi ve yenilebilir mantarlar meyve, sebze, hububat ve bitkiler içerisinde bulunan fenolik asit ve flavanoidler gibi insan sağlığı üzerine olumlu etkilere sahip çeşitli biyoaktif bileşikleri de içerirler (34-36). Bugüne kadar makrofunguslar ile yapılan biyolojik aktivite çalışmaları incelendiğinde iki durum ön plana çıkmaktadır. Bunlardan birincisi çalışmaların büyük bir çoğunluğunun doğadan toplanan şapkalar ile yapılmış olmasıdır (37-39). Bu alışmalar sonucunda etkili türler bulunmasına rağmen şapkanın yılın belirli bir döneminde ortaya çıkması veya bazı yıllar ortam koşulları uygun olmadığı için hiç oluşmaması düzenli olarak etkin maddelerin eldesini imkansız kılmaktadır. Bu bakımdan mantara ait miselde ya da miselin yetiştirildiği ortamda etkin madde aramak ve bulunması halinde yılın her döneminde üzerinde çalışma ve yeterince üretme imkanı sağlaması açısından oldukça önemlidir (40,41). Diğer bir önemli husus da yapılan makrofungus çalışmalarının oldukça az sayıda tür ile sınırlı olmasıdır (42-44). Genellikle etken maddeye sahip olduğu anlaşılan az sayıda tür üzerinde detaylı ve çok sayıda çalışma yapılmıştır ve bu durumun sonucunda geride çalışılması gereken çok sayıda makrofungus türü kalmıştır. Ülkemizde yaklaşık 2400 civarındaki makrofungus türleri içinde (7, 27) yenilebilir türlerin kültüre alınması çalışmaları hızlı bir şekilde devam etmektedir.

Yapılan birçok bilimsel çalışma sonucunda değişik makrofungus türlerinin antioksidan, antimikrobiyal, antialerjik ve antitümör aktivitelerinin olduğu rapor edilmiştir (39, 45, 46). Mantarların antimikrobiyal etkileri, fungal yapıda sentezlenen ve genellikle organizmaya özgü bazı fenolik bileşikler, pürinler, pirimidinler, terpenoidler, kinonlar ve fenil proponoid türevi gibi antagonistik maddelerden dolaydır. Organizma yaşadığı ortamda varlığını sürdürebilmek ve çevresindeki rekabetçi türlere üstünlük sağlayabilmek için bu tür kimyasallara ihtiyaç duymaktadır (39). Farklı aminoasit sekanslarıyla antifungal proteinler farklı organizmalar tarafından üretilirler. Tıbbı mantarlar ve diğer mantarlar da çeşitli antifungal proteinler üretirler (47). Ganodermin tıbbı bir mantar olarak bilinen *G. lucidum*‘ dan izole edilmiş antifungal proteindir. *Ganoderma japonicum* mantarının miselinden elde edilen esansiyal yağın kimyasal bileşenlerinin ve antimikrobiyal aktivitesinin incelendiği bir çalışmada *G.japonicum* tüm test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etki gösterdiği bildirilmiştir (48).

Mantarların besin olarak kullanılması ve antibiyotik üretmesinin yanında Polyporaceae üyelerinin bazıları ABD, Kanada, Rusya, Çin ve Kore gibi ülkelerde akciğer, özofagus ve

prostat gibi kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Yine Çin, Japonya, Rusya ve ABD de anti-tümör özelliğine sahip bazı polisakkaritleri taşıyan *G. lucidum*, *Schizophyllum commune*, *Trametes versicolor*, *Lentinus edodes* ve *Flammulina velutipes* gibi bazı mantarların kültürü yapılarak ilgili polisakkaritler elde edilmektedir (49).

Canlıların yaşamlarını devam ettirebilmek için ihtiyaçları olan enerjiyi karşılayabilmeleri, dış kaynaklardan elde edilen besinlerin metabolizmaya girişi ile mümkün olmaktadır. Vücut tarafından alınan besinlerin enerjiye dönüştürülmesi için ise oksijen mutlak gereklidir. Katabolizma sırasında harcanan oksijenin önemli bir dezavantajı, aktivitesi çok yüksek olan ve reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılan zararlı radikallerin açığa çıkmasıdır. Bu radikallerin üretimi stres durumunda artış gösterir ve vücutta birçok hastalığın da sebebinin oluşturur. Bu nedenle stres kaynaklı hastalıklar başta olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde hekimler tarafından antioksidan maddelerin kullanılması tavsiye edilmektedir (50).

Günümüzde kanserle serbest radikaller arasındaki ilişki yapılan deneylerle ispat edilmiştir. Bilindiği gibi süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($HO^{\cdot}$) gibi serbest radikaller; canlı organizmalara ait dokularda, diğer madde ve gruplarla reaksiyon vererek hücrelerde istenmeyen toksik maddeler oluşturabilirler. Açığa çıkan bu zararlı ürünler, çeşitli mekanizmalarla hücre harabiyetini tetikler ve böylece hücre ölümüne neden olurlar (50).

Antioksidanların ilaç ve gıda sanayiinde kullanımı yaygındır ve neredeyse tükettiğimiz her ürüne antioksidan etkili bileşikler katılmaktadır. Bu yolla ilaçlar ve gıdaların bozulması engellenerek, bunların daha uzun süreyle korunması ve saklanması sağlanır (51). Günümüzde gıda sanayiinde özellikle yağ içeren ürünlerinin oksidasyonu ve lipid peroksidasyonunu önlemek amacıyla kullanılan bütillenmiş hidroksi tolueen (BHT), bütillenmiş hidroksi anisol (BHA), gallat türevleri ve tert-bütill hidrokinon (TBHQ) gibi antioksidan maddelerin toksik etkilerinden şüphelenilmektedir. Bu antioksidanların; toksik, kanserojen ve gastrit yapıcı etkilerinden dolayı bebek mamaları ve çocuk gıdalarında kullanılmasına izin verilmemektedir (52). Ayrıca birçok üründe antimikrobiyal etkileri için nitrit (NO_2^-), nitrat (NO_3^-), kükürt dioksit (SO_2), benzoik asit ve sorbik asit kullanılmaktadır. Ancak NO_3^- ve NO_2^- insan metabolizmasının atılım ürünleridir ve vücutta birikerek reaktif azot türlerine (RNS) dönüşebilmektedir. RNS de ROS gibi yüksek reaktiviteye sahip olduğundan, biyomoleküllerle reaksiyona girerek romatizmal hastalıklar, parkinson, kanser ve hücre

harabiyetine sebep olmaktadır (53). Antibakteriyel olarak kullanılan benzoik asit ve benzoik asit türevlerinin ise nörolojik hastalıklara neden olmasının yanı sıra kanserojen olduğu bilinmektedir. Ayrıca gıda sanayiinde kullanılan kimyasal maddelerin büyük büyük bir kısmı toksik, nörodejeneratif ve kanserojen etki gibi istenilmeyen etkilere sahiptirler (52). Bu nedenle; son yıllarda yeni, daha güvenli ve ucuz antioksidan maddelerin bulunması için doğal ürünler üzerinde yaygın çalışmalar yapılmaktadır (54).



Şekil 1. *Ganoderma* cinsine ait bir tür örneği



Şekil 2. *Pisolithus* cinsine ait bir tür örneği

Makrofungusların aktif metabolit bakımından zengin olması, onun antibakteriyel etkisinin yanı sıra antioksidan olarak da kullanılmasını sağlamıştır. Makrofungusların bünyesinde barındırdığı kendine özgü ve çok çeşitli metabolit grupları onların antioksidan ve diğer

terapötik etkilerinden sorumludur. Farmakolojik araştırmalar farklı makrofunguslarının sitotoksik, antifungal, antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteye sahip olduklarını göstermiştir. Makrofunguslarında antioksidan aktiviteyi sağlayan sekonder metabolitlerin fenolik bileşikler, benzil, mono, di, tri, sekiterpenler ve flavonoidler oldukları düşünölmektedir



şekil 3. *Sarcosphaera* cinsine ait bir tür örneği



şekil 4. *Tricholoma* cinsine ait tür örneği

Canlı mekanizmalarda oluşan serbest radikaller, proteinlere, nükleik asitlere, DNA'ya membran lipidlerine ve karbohidratlara etki ederek hücre ölümlerine neden olmaktadır.

Antioksidan bir madde, bu oksidasyonun çeşitli aşamalarında bazı mekanizmalar yoluyla koruyucu özelliklere sahip olan maddelerdir (55).

Oksijen, yaşam için vazgeçilmezdir ancak vücut içinde reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Reaktif oksijen türleri ise metabolizmaya zarar verebilecek bir dizi reaksiyon başlatır. Bu nedenle canlı için bir tehdit unsuru halini alırlar (56). Reaktif oksijen türleri düşük dozlarda çeşitli stres tepkilerinde arabulucu gibi rol oynarken, yüksek dozlarda hücrel zarara yol açar (57). Oksidan ve mutajen özellikte olan bu maddeler DNA, protein ve diğer makromoleküllerde tahribata hatta hücrenin ölümüne yol açarak kronik hastalıkları başlatır (58). Reaktif oksijen türleri şu şekilde sıralanmaktadır;

1. Radikaller

a. Süperoksit radikal (O_2^-)

b. Alkoksil radikal (LO^-)

c. Peroksil radikal (LOO^-)

2- Radikal olmayanlar

a. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

b. Lipid hidroperoksit ($LOOH$)

c. Hipoklorik asit ($HOCl$)

3- Singlet oksijen

Bunların dışında nitrik oksit ($NO\cdot$) ve nitrojen dioksit (NO_2) de sayılmalıdır. İkisi de güçlü oksidanlardır. Nitrojen dioksit nitrik oksitin oksijen ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelir ve oldukça toksiktir. NO_2 'nin düşük konsantrasyonlarda bile araşidonik asit metabolizmasını büyük ölçüde artırdığı gözlenmiştir (59, 60). Nitrik oksit L-arjinin amino asitinden in vivo olarak üretilmektedir. NO kokusuz, renksiz ve az indirgenebilen oksidan bir gazdır. Son yıllarda radikal olan nitrik oksit üzerinde oldukça fazla durulmaya başlanmıştır. Nitrik oksit eşleşmemiş elektronları sayesinde süperoksit, tiol grupları ve nitrojen dioksit ile hızlı reaksiyonlar oluşturmaktadır (59, 61, 62). Hemen hemen her aerobik hücrenin enerji metabolizmasında, oksidasyon sırasında ya da oksidazlar gibi bazı enzimlerin aktivitesi sonucunda oksijen bir elektron alır ve serbest süperoksit radikal anyonu meydana gelir. Ancak direkt olarak zarar vermez (63).

Özellikle yüksek oksijen kullanımı nedeniyle oksidatif strese karşı zayıf olan beyin, aynı zamanda yüksek düzeylerde Fe^{2+} ve diğer divalent katyonları içermekte ve oluşan Fenton-tip

reaksiyonlar reaktif oksijen türleri üreterek nöronlara zarar vermektedir. Nispeten düşük antioksidan savunmasına sahip olan beyin dokusu aynı zamanda oksidatif zararlara karşı dokuyu zayıflatan çoklu doymamış yağ asitlerini de yüksek düzeyde içermektedir. Oksidatif strese maruz kalan beyin dokusunda oluşan hasarların beyin iskemisi, hafıza bulanıklığı, Alzheimer, Parkinson gibi birçok sinirsel bozuklukta önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır (64).

Reaktif oksijen türleri, vücutta lipoksigenaz, siklooksigenaz, ksantin oksidaz, miyeloperoksidaz ve sitokrom P-450 gibi birçok enzimin aktivitesinin sonucu olarak da üretilmektedir (64).

Serbest radikal meydana getiren diğer olaylar ise; kontamine içme sularında bulunan, toksik etkili, halojenlenmiş hidrokarbonlar ve hava kirleticileri olarak bilinen azot oksitlerdir. Karbontetraklorür (CCl_4) ve bromotriklorometan (CBrCl_3) gibi hidrokarbonların oksidatif hasarın başlamasında etkili oldukları bildirilmektedir. Triklorometil, triklorometil peroksil radikalleri gibi oldukça reaktif türler, sitokrom P- 450 monooksijenaz enzim sisteminin çeşitli aminoasit ve doymamış yağlarla hızlı reaksiyonu sonucu CCl_4 'ün metabolizması sırasında üretilmekte ve bunun sonucunda protein denatürasyonları ve lipid peroksidasyonu oluşmaktadır (65).

Serbest radikaller vücudumuzda fizyolojik olaylar sonucunda oluşan doğal ürünlerdir. Genellikle reaksiyonlarda ara ürün olarak ortaya çıkan serbest radikallerin oksijen ile etkileşmesi sonucu serbest oksijen radikalleri oluşur. Bu nedenle başlıca sebep oksijenli solunum yapmamızdır. Hücre içinde en büyük serbest oksijen radikali kaynağı mitokondriyal elektron taşıma zincirinden sızıntıdır. Mitokondri iç zarına yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiği zaman mitokondriyal süperoksit radikal üretimi artar (66).

Bir diğer önemli hücresel kaynak fagositik hücre membranının NADPH oksidaza bağlı serbest radikal üretimidir. Fagositik hücrelerin uyarılması fosfolipaz ve protein kinaz enzimlerinin aktivasyonuna ve plazma membranında araşidonik asit salımına yol açar. Araşidonik asidin enzimatik oksidasyonu ile çeşitli serbest radikal araürünler meydana gelebilir. Araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine 'enzimatik lipid

peroksidasyonu denir', diğerk radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna ise 'non-enzimatik lipid peroksidasyonu' adı verilir (66). Mikrozomal ve plazma membranı tarafından radikal üretiminin önemli enzimleri olan lipoksijenaz ve siklooksijenaz araşidonik asit metabolizmasında görev almaktadırlar (66-68). Aktive olmuş fagositler bakterisidal rollerinin sonucu olarak süperoksit üretirler (69-71). Fagositte edilmiş bakteri solunumsal patlama ürünlerinin etkisiyle öldürölür. Ancak bu oksidan ürünler hücrelerin antioksidan savunma güçlerini aştığında konak hücreye de zarar verirler ve çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol oynarlar (66).

Stres vücutta katekolamin düzeyinin artmasına sebep olur. Katekolaminlerin de otooksidasyonu ile serbest radikal miktarının artması kaçınılmazdır. Bu olay stresin hastalık etkeni olarak rolünün serbest radikal üretimiyle ilgili olduğunu göstermesi bakımından önemlidir (72).

Birçok enzimin katalitik döngüsü sırasında da serbest radikaller ortaya çıkar. Serbest radikal oluşumuna neden olan enzimler oksidatif enzimler olarak adlandırılırlar. Bunlar; ksantinoksidaz, indolamindioksigenaz, triptofandioksigenaz, galaktozoksidaz, siklooksijenaz, lipoksijenaz, monoaminoksidazdır (73).

Az miktarda serbest radikal oluşumu bazı durumlarda, örneğin bakterilerin nötrofiller tarafından oksijen radikalleri ile öldürölmesi gibi, organizmaya yararlı olabilir. Bunun yanında fazla miktarda serbest radikal oluşumu sonucu oluşan oksidatif stres ile hücrede DNA, proteinler, lipidler, karbonhidratlar ve enzimlerin zarar görmesine yol açabilir (74).

Karbonhidrat, lipid, protein ve DNA gibi biyomoleküllerin tüm sınıfları ve tüm hücre komponentleri ile etkileşme özelliği göstererek hücrede yapısal ve metabolik değışikliklere neden olurlar (66, 75). Bu durum biyomoleküllerin yapılarına zarar vermektedir. Bu zararlar hücrenin cinsine, maruz kalınan oksidatif strese ve şiddetine bağılı olarak (72), toksik, mutajenik veya karsinojenik olabilir (74).

Serbest radikallerin en belirgin etkileri lipid peroksidasyonuna neden olarak, Diabetes Mellitus'un da aralarında bulunduğu bir dizi hastalığın ortaya çıkmasında rol oynamalarıdır. Biyomoleküllerin tüm büyük sınıfları serbest radikaller tarafından etkilenir ancak en hassas

olan grup lipidlerdir (55). Hücre membranındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyona neden olurlar (67, 68, 76). Bunun sonucunda membran akışkanlığında bozulma ve permeabilite değişiklikleri meydana gelir (77).

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada koruyucu mekanizmalar vardır. Bu mekanizmaların bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önler. Bu işlevleri yapan maddelere antioksidanlar adı verilir (66, 78-80). Geçmişte yaygın olarak kullanılan sentetik antioksidanlar yerine günümüzde doğal antioksidanların kullanımı önem kazanmıştır. Özellikle, bu sentetik antioksidanların toksik etkilerinin saptanması ve maliyetlerinin yüksek olması, yeni ve ucuz doğal antioksidan kaynakları arayışına itmiştir (81). Birçok bitki antioksidan aktiviteye sahip pek çok bileşeni içermektedirler. Bunlar arasında fenolik bileşikler, C vitamini (askorbik asit), E vitamini (tokoferoller ve toketrienoller), başta β -karoten ve likopen olmak üzere karotenoidler ve biyoaktif peptitler sayılabilir. Bitkisel bir materyalden uygun yöntemlerle antioksidan bileşenler etkin bir şekilde ayrılabilir. Çeşitli materyaller içinde antioksidan bileşenlerin varlığını nitel ve nicel olarak gösteren pek çok yöntem vardır. Son zamanlarda toplam antioksidan aktiviteyi belirlemede DPPH yöntemi ve β -karoten renk açılımı yöntemi bitki özütlerinin anlamlı bir şekilde değerlendirilmesinde önerilmektedir (82-84).

Makrofungusların yapısındaki polisakkaritlerin en önemlilerinden biri olan kitin, Yunancadan türemiş bir kelime olup, doğada selülozdan sonra en fazla bulunan ve N-asetil-D-glukozamin birimlerinden oluşan, hücre yapısını koruyucu ve destekleyici bir bileşendir. Yenilenebilir ve çevre dostu doğal bir biyopolimer olan kitinin (85) birçok türevi bulunmakla birlikte bunlardan en önemlisi deasetillenmiş bir türevi olan kitosandır (86) β -(1,4)-2-asetoamido-2-deoksi-D-glikoz ve β -(1,4)-2-amino-2-deoksi-D-glikoz ünitelerinin bir kopolimeri ve selüloz gibi fiber olan katyonik bir polisakkarit (87) olan kitosan ilk kez 1811 yılında Henri Bracannot tarafından keşfedilmiştir. Bracannot, makrofunguslarda bulunan kitini sülfürik asitte çözmeye çalışmış ancak başarılı olamamıştır. Rouget tarafından, 1859 yılında, derişik potasyum hidroksit çözeltisinde kitini ısıtması ile kitosanı bulmuştur. Ledderhose, 1878 yılında kitinin glikozaminden meydana geldiğini tanımlamıştır. Hoppe-Seyler ise 1894 yılında kitosan terimini kitinden uyarlamıştır. Kitinin birçok alanda yaygın biçimde kullanılmasına karşın sıkı moleküler üstü yapısı ve çözünürlüğünün oldukça sınırlı olması nedeniyle

endüstriyel uygulamalarda kullanımı kısıtlıdır. Kitosanın ise kitin ve selülozdan farklı olarak sahip olduğu amin grubu, çözünme sırasında protonlanarak pozitif yüklenir ve bundan dolayı, negatif yüklü polimerlerle, makromoleküllerle, polianyonlarla etkileşme yeteneği kazanarak birçok biyoaktif madde ile bağlanabilir, ağ veya matriks oluşumu gerçekleştirebilir. Biyoaktif bileşikler, biyoteknolojik ve farmasötik uygulamalarda kullanılabilecek olan basitten karmaşığa kadar çok çeşitli bileşikler olup; peptitler, oligosakkaritler, yağ asitleri, enzimler, suda çözünen mineraller ve biyopolimerler olarak sıralanabilir. Bundan başka, bu biyoaktif bileşiklerden bazılarının nütrisotikal potansiyele sahip ve insan sağlığını destekleyici yararları da mevcuttur (88, 89). Toksik olmayan, biyoyumlu ve biyoparçalanır özellikte (77) ve çözünmesi için zararlı organik çözücülere gerek duyulmadığı için kitosan, son yıllarda birçok farklı sektörde kullanım alanı bulmuştur (90, 91). Yapay deri, ilaç taşıma sistemleri, kozmetik, beslenme ve diyet ürünleri, enzim immobilizasyonu, ağır metal giderimi, tekstil boyalarının giderimi, kağıt üretimi, agronomik uygulamalar, oftalmoloji, fotoğrafçılık gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (89, 92). Özellikle medikal alanda kitosan temelli yara iyileştirme elbiseleri üstüne çalışmalar artmaktadır. Kitosan ve türevlerinin elde edilmesinin kolay bir işlem olmasından ve pH 6.4'ten daha düşük pH'ta yüksek çözünürlüğe sahip olmasından dolayı enkapsülasyon polimeri olarak ilaç taşıma sistemlerinde ve kontrollü ilaç dağılımlarında da kullanılır (93). İlaçların kontrollü dağılımı, son derece önem taşımaktadır. Biyolojik açıdan uyum gösteren kitosan, çeşitli ilaç formülasyonlarında uygun bir matriks olarak karşımıza çıkmaktadır. Kitosan matrikslerin avantajları birçok literatürde bahsedilmiştir (86). Çeşitli ilaçlar, kitosan matriksi içerisine (film, mikrokapsül, kaplanmış tablet vb.) yerleştirilmektedir. Jel oluşturabilmesi, kopolimer gibi çok çeşitli formlarda bulunması da ilaç dağılım sistemlerinde büyük avantaj sağlamaktadır. Midede tahrişi engelleyen antasit ve antiülser aktivitelere sahip olması da ideal materyal haline getirmektedir (94, 95). Ayrıca kalsiyum esaslı birçok materyal ile kompozit oluşturmabilmesi sayesinde ortopedik ve periodontal uygulamalarda da kullanım alanı bulmuştur. Bu şekilde oluşturulan polimerlerin sert doku yerine kullanılabiliyorlukları üzerine araştırmalar yapılmaktadır. Bu tip kompozitlerin avantajı, polimerin hidroksapatit ile kombinasyonunun matris emilidikçe implantta kemiksi gelişim sağlamasıdır. Kalsiyum-kitosan esaslı kompozitler, kemik protezlerinde kaplama yapılarak vücuda implante edilerek kemik hücrelerini güçlendirmektedir. Bu şekilde kalsiyum bileşiklerinin migrasyonu da polimer matrisine bağlanması nedeniyle engellenmektedir (94).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. MATERYAL

3.1.1. Araştırmada Kullanılan Makrofungus Örnekleri

Bu araştırmada kullanılan *Ganoderma lucidum*, *Pisolithus arrhizus*, *Tricholoma sp.*, *Sarcosphaera crassa* makrofungusu örnekleri Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Yard. Doç. Dr. HAKAN ALLI tarafından temin ve teşhis edilmiştir. Arazi çalışması yapılan yerler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Arazi çalışması yapılan lokaliteler.

Makrofungusu örnekleri	Arazi çalışması yapılan lokaliteler
<i>Pisolithus arrhizus</i>	Muğla-Datça, İçmeler deresi
<i>Ganoderma lucidum</i>	Muğla-Köyceğiz-Toparlar mevkii
<i>Tricholoma sp.</i>	Kütahya- Gediz, Abide Mevkii
<i>Sarcosphaera crassa</i>	Kütahya-Tavşanlı-Yeniköy Mevkii

3.1.2. Makrofungus Örneklerinin Ekstraksiyonunda Kullanılan Çözeltiler

Bu aşamada kullanılan örnek maddenin çözücüye oranı 1:10 (mL. mg⁻¹) olacak şekilde ayarlanmıştır.

Bileşenin adı	Miktarı
Etanol	100 rpm
Metanol	100 rpm

3.1.3. Mikroorganizmaların İnokulasyonunda Kullanılan Besiyerleri

Besiyeri 1. Nutrient Broth (Merck)

Bileşenin adı	Miktarı
Nutrient Broth (Merck)	13,0 g
Distile Su	1000 mL

Besiyeri 2. Nutrient Agar (Merck)

Bileşenin adı	Miktarı
Nutrient Agar (Merck)	28,0 g
Distile Su	1000 mL

Ticari olarak alınan besiyerinin 28 g 1000 mL distile su içinde çözüldükten sonra 121⁰C’de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Bakteriyel organizmalar için kullanılmıştır.

Besiyeri 3.

Bileşenin adı	Miktarı
YPD Broth (Merck)	50,0 g
Distile Su	1000 mL

Besiyeri 4.

Bileşenin adı	Miktarı
Yeast Extract Agar (Merck)	65,0 g
Distile Su	1000 mL

Ticari olarak alınan besiyerinin 65 g 1000 mL distile su içinde çözüldükten sonra 121⁰C’de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Mayalar için kullanılmıştır.

3.1.4. Antioksidan Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Tween 40, dimethylsulphoxide (DMSO), ethyl acetate, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), β -carotene, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenyl-sulphonic acid)-1,2,4-triazine (ferrozine), iron (II) chloride (FeCl₂), gallic acid, butylated hydroxyanisole (BHA), 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT), α -tocopherol and linoleic acid (Sigma).

3.2. METOT

3.2.1. MAKROFUNGUS ÖRNEKLERİNİN EKSTRAKSİYONU

Daha önce ezilip toz hâline getirilmiş örnekler tartılarak balon jojeye alındıktan sonra, üzerlerine ekstraksiyon çözücülerinden konularak, örneklerden ekstraktlar elde edilmiştir. Bu aşamada kullanılan örnek maddenin çözücüye oranı 1:10 (mL.mg⁻¹) olacak şekilde ayarlanmıştır. Belirtilen oran tespit edilirken, önce 1:1 (mL.g⁻¹) oranı ile denemelere başlanmış, ancak bu oran kullanıldığında, ekstraksiyon işlemi sonucu elde edilen ekstrakt miktarının yetersiz kaldığı görülmüştür. Deneyler için gerekli olan ekstrakt miktarını elde edebilmek amacıyla çözücü miktarı artırılmış ve sonuçta oran, 1:10 (mL.mg⁻¹) olacak şekilde ayarlanmıştır.

Deneme sırasında;

- 1) Kuru mantar örnekleri toz haline getirilip, eppendorf tüplere konulur.
- 2) 10 g'lık toz örnekler 100 mL çözücü içerisine 25° C 'de 150 rpm' de 24 saat manyetik karıştırıcıda çalkalanır.
- 3) Karışım Whatman No: 4 kağıdından süzülür.
- 4) Sıvı kısma 100 mL metanol ilave edilerek işlem tekrarlanır.
- 5) Kombine edilmiş metanolik ekstraktlar (40 ° C) evaporatörde uçurulur, santrifüj sonucu oluşan süpernatant, antimikrobiyal aktivitenin tespitinde kullanılmak üzere saklanmıştır.

3.2.2. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTENİN BELİRLENMESİ

Bitki özütlerinin antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri Klinik Laboratuvar Standartları Ulusal Komitesi'ne göre disk difüzyon metodu ile test edilmiştir (NCCLS, 1997) (72). Denemeler sonrası çıkan sonuçlar referans diskleri ile karşılaştırılmıştır.

Deneylerde *Bacillus subtilis* RSKK 244, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 04019 suşları kullanılmıştır.

3.2.2.1. Özütlerin disklerle emdirilmesi

6 mm'lik boş, steril antibiyotik disklerine 20 µL özüt emdirilmiştir. Emdirilen örnek miktarının kontrolü için değişik miktarlarda özütler disklerle emdirilmeye çalışılmıştır. Disklerin 30 µL üzerindeki örneği ememediği, örneklerin bir kısmının disklerin dışına taşıdığı ve burada kuruduğu gözlenmiştir. Diskler, 30 µL üzerinde özütü uygun bir şekilde ememediği için bu miktarın kullanılması uygun olmamıştır. Ayrıca yapılan karşılaştırmada 30 µL emdirilmeye çalışılan diskler ile 20 µL emdirilmiş diskler arasında etki bakımından çok fazla bir fark olmadığı gözlemlendiği için disklerle 20 µL özüt emdirilmesine karar verilmiştir. Özütlerin emdirildiği diskler antimikrobiyal etkiyi etkileyecek çözücülerin diskler üzerinde kalmaması için bir gün kurumaya bırakılmıştır.

3.2.2.2. Mikroorganizmaların standardize edilmesi

Disk difüzyon yöntemi kullanmadan önce, bakteri örnekleri 0,5 McFarland standardı ile karşılaştırılarak standardize edilmiştir. Bakteri kültürleri öncelikle izole koloniler elde etmek amacıyla agar ortamına ekilmiş, 37 °C'de 24 saat inkübasyondan sonra 4-5 tane iyi izole olmuş koloni, öze yardımıyla % 0,9'luk serum fizyolojik içine alınmıştır. Hazırlanan bakteri süspansiyonu, daha önce hazırlanmış olan 0,5 McFarland standardı ile karşılaştırılarak süspansiyonun bulanıklığı ayarlanmıştır.

3.2.2.3. Disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal etkinin test edilmesi ve Besiyerlerinin inokülasyonu

Besi yerine mikroorganizma inokülasyonu için mikroorganizma süspansiyonuna steril eküvyon batırıldıktan sonra, besi yerinin her yerine eküvyonla süspansiyon yayılmıştır. Mikroorganizma süspansiyonu yayılan petriler, diskler uygulanmadan önce 5 dakika kurumaya bırakıldıktan sonra, diskler besi yerinin üzerine 10 dakika içinde uygulanmıştır.

3.2.2.3.1. Disklerin yerleştirilmesi

Etken maddeleri içeren diskler, besi yerinin üzerine iyice yerleştirilmiştir. Disklerin tamamının agar üzerine dokunmuş olmasına dikkat edilmiştir. Çalışmada 120 mm'lik steril petri kapları kullanılmıştır ve bu petri kaplarına toplam 1'er adet antibiyotik diski konmuştur.

3.2.2.3.2. İnkübasyon

Diskler uygulanmış petri kapları, inokülasyonu takip eden 15. dakikada inkübe edilmeye başlanmıştır. Bakteriler 37 °C'de 24 saat süre ile, mayalar ise 30 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir.

3.2.2.3.3. İnhibisyon zonlarının ölçümü

İnkübasyon süresi sonucunda oluşan inhibisyon zonları cetvel yardımıyla ölçülerek zon çapları mm (milimetre) olarak kaydedilmiştir. Petri kapları + 4 °C'de saklanmıştır.

Negatif kontrol olarak dimetil sülfoksit (DMSO) emdirilmiş diskler kullanılmıştır. Bu disklerin bütün bakteriler üzerine etkisi incelenmiş; sonuç olarak, çözücü emdirilmiş disklerden çözücüler buharlaştırıldıktan sonra disklerin mikroorganizmalar üzerine etki göstermediği gözlenmiştir. Ayrıca, boş antibiyotik disklerinin de mikroorganizmalar üzerine etkisi olmadığı yapılan denemeler sonucunda gözlenmiştir.

Pozitif kontrol olarak kullanılan Eritromisin ve Nistatin antibiyotik diskleri kullanılmıştır.

3.2.3. ANTİOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ

3.2.3.1. DPPH Üzerinden Serbest Radikal Süpürücü Etki Tayini

Ekstrelerin serbest radikal süpürücü etkileri Blois (1958) metodu (73) kullanılarak spektrofotometrik olarak DPPH serbest radikali üzerinden tayin edilmiştir. % 0,004metanol içerisinde hazırlanmış örnek çözeltisi üzerine DPPH çözeltisi ilave edilerek vortexde

kariştırılmış ve karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilen çözeltilerin 517 nm de absorbens değerleri okunmuştur. DPPH standartı kullanılarak hazırlanmış olan aşağıdaki kalibrasyon denklemini kullanarak reaksiyon ortamındaki DPPH konsantrasyonu (I%) hesaplanmıştır.

$$I\% = ([A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}] / A_{\text{kontrol}}) \times 100$$

Testler üç paralel çalışılmış ve BHA, sentetik antioksidanlar olup pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Sonuçlar IC₅₀ değeri olarak µg. mL⁻¹ cinsinden verilmiştir.

3.2.3.2. Total Fenol Miktar Tayini

Makrofungusu özütlerinin toplam fenolik içeriği Singleton and Rossi (1965) prosedürü temel alınıp modifiye edilen Folin Ciocalteu metoduna göre belirlenmiştir (74). Çalışmanın bu bölümünde, standart olarak kullanılan gallik asit ve diğer numunelerin (makrofungusu özütleri) çözeltileri hazırlanırken, çözücü olarak % 70'lik metanol kullanılmıştır. 0,1 mL numune 100 mL'lik dereceli kapaklı erlene konur ve hacmi distile su ile 46 mL'ye tamamlanır. Daha sonra 0,2 mL %50'lik Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edildikten 3 dakika sonra 1 mL % 2'lik Na₂CO₃'ın sulu çözeltisi ilave edilir ve kariştırıcıda oda sıcaklığında 45 dakika kariştırılır. Bu süre sonunda numunelerin absorbensları 760 nm'de ölçölmüştür. Gallik asit çözeltilerinin absorbens değerlerinden elde edilen kalibrasyon grafiği kullanılarak, her numunenin toplam fenolik madde içeriği mg gallik asite eşdeğer olacak biçimde belirlenmiştir.

3.2.3.3. Metal şelatlama Aktivitesi

Metal şelatlama aktivitesi Decker ve Welch metodu bazı modifikasyonlar kullanılarak tayin edilmiştir (75). Kısaca, 0,5 mL makrofungusu özütü 0,05 mL 2 mM FeCl₂ ve 1 mL 0,5 mM ferrozin ile kariştırılmıştır. Karişım oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra 562 nm'de absorbens değerleri ölçölmüştür.

Ferrozin- Fe²⁺ kompleksinin inhibe yüzdesi aşağıdaki formöle kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Scavenging effect (\%)} = ([A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}] / A_{\text{Kontrol}}) \times 100$$

3.2.3.4. β -Karoten ve Likopen Tayini

β -Karotene Likopen Nagata and Yamashita metoduna göre belirlenmiştir. 100 mg kuru ekstrakt 10 ml aseton:hekzan (4:6 vol/vol) karışımında karıştırılmış ve tek kullanımlık 0.45 μm ; Millipore filtre ile filtrasyon yapılmıştır. Filtre edilen örneğin absorbans değerleri 453, 505 ve 663 nm’lerde ölçülmüştür. β -karotene ve likopen miktarı aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Likopen (mg=100 mL)} = (-0.0458 \cdot A_{663})$$

$$+(0.372 \cdot A_{505})$$

$$-(0.0806 \cdot A_{453})$$

$$\beta\text{-karotene (mg=100 mL)} = (0.216 \cdot A_{663})$$

$$-(0.304 \cdot A_{505})$$

$$+(0.452 \cdot A_{453})$$

Elde edilen sonuçlar mg olarak karotenoid/g şeklinde ifade edilmiştir.

3.2.3.5. Demir-tiyosiyanat Metodu

Fraksiyonların linoleik asit peroksidasyonu üzerine etkileri demir-tiyosiyanat metodu kullanılarak incelenmiştir. Buna göre; 10 mg etanol ve metanol içerisinde hazırlanmış örnek çözeltisi, 10 ml deiyonize su ile çözdürüldükten sonra farklı konsantrasyonlardaki solüsyona (10-20 $\mu\text{g/mL}$) 2.5 ml linoleik asit emülsiyonu, 2.5 ml potasyum fosfat (0.04 M, pH 7.0) tamponu ilave edildi. Elde edilen karışım 37°C’de 30 gün süreyle bekletilmiştir. Haftada iki kez örnek alınmış ve 0.1 ml test çözeltisi üzerine 3.7 ml %75 (h/h)’lik etanol ve 0.1 ml %30 (a/h)’luk amonyum tiyosiyanat çözeltisi ilave edilmiştir. Bu karışım üzerine 0.1 ml %3.5’lik hidroklorik asit çözeltisi içerisinde hazırlanmış 2×10^{-2} M demir iki klorür çözeltisi konulup 3 dakika sonunda 500 nm’de spektrofotometrede absorbansı okunmuştur

3.2.3.6. Total Flavonoid İçeriği

Total flavonoid içeriği alüminyum klorid kolorimetric metoduna göre yapılmıştır. Metanol

içerisindeki her mantar ekstraktı (2 mL, 0.3 mg/mL) 0.1 ml alimünyum klorid heksahidrat, 0.1 ml 1 M potasyum asetat ve 2.8 ml deiyonize su ile karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 40 dakikalık inkübasyon sonunda 415 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür.

4.Kitin ekstraksiyonu

Liyofilize edilmiş fungal biyokütlelere standart bir metot olan kitosan ekstraksiyon metodu uygulanmıştır³⁴. Bu ekstraksiyon protokolü modifiye bir baz ve arkasından asit muamelesini içermektedir. Baz konsantrasyon etkisini çalışmak için, örnekler üzerinde farklı konsantrasyonlarda sodyum hidroksit solüsyonları, farklı sıcaklık, farklı inkübasyon süreleri test edilmiştir. Asit muamelesinde ekstraksiyon solüsyonu olarak kullanılmak üzere asetik asit ve hidroklorik asit denenmiştir (96). Hidroklorik asit ile verimin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Baz muamelesinde, öncelikle liyofilize örnekler 1M,2M,3M ve 4M NaOH’ le muamele edilmiştir. Çalışmada sıcaklığın ve inkübasyon periyodunun etkisini anlamak için üç farklı sıcaklık derecesinde (95 °C,110 °C ve 121 °C) ve beş farklı inkübasyon periyodunda (10,15,20,25 ve 30 dak.) farklı molaritelerdeki NaOH solüsyonu ile denemeler yapılmıştır. Sonra 12,000Xg 15 dak. santrifüj edilerek ve distile su ile yıkanmış ve tekrar santrifüj edilmiştir. Sonrasında çökeltiler 60 °C’ ve 95 °C’ de 3, 6 ve 12 saat % 2, %6 ve %10’luk hidroklorik asitle muamele edilmiştir. Ve sonra tekrar 12,000Xg 15 dak. santrifüj edildikten sonra çökelti kısmı ayrılmıştır. Kitosan 2 M NaOH muamelesi ile çöktürülmüştür. Her bir adım arasında 40 mesh’lik filtre yardımıyla Ca ve protein çözeltilerinin uzaklaştırılması işlemi yapılmıştır. Katı kısım saf suyla yıkanarak üzerinde kalabilecek olan HCl/NaOH kalıntılarından arındırılarak etüvde 1 gece boyunca 60 °C’de kurumaya bırakılmıştır (97).

Kitosanın saflaştırılmasında, 4g kitosan 160 ml %40’lık NaOH ile muamele edildikten sonra 0.005 g NaBH₄ eklenerek 95 °C’de 4 saat karıştırılmıştır. Süspansiyon soğuduktan sonra kalıntı filtreden geçirilerek süzöntü ile aynı pH olana kadar distile su ile yıkanmıştır. Kalıntı 250 ml asetik asit ile tekrar çözündürülerek elde edilen kitosan solüsyonu 16000 X g 5 dak. santrifüj edilir ve supernatant elde edilmiştir. Supernatant 1 M NaOH ile pH 8-9 arasında tekrar çöktürülerek 16000 X g 5 dak. santrifüj edilerek pellet elde edilmiştir. Kitosanın pH’ı supernatant ile aynı olana kadar distile su ile yıkanmıştır. Sonunda %95’lik etanol ile bir kez yıkanıp ve liyofilize edilmiştir (98).

5. Kitosan tayini

% 85 Saflıktaki Deasetillenmiş Kitosan (Alfa Easer) ve deasetillenmiş mantar örneğinin ATR sistemli TF-IR ile IR spektrumları alınmıştır.

6. Kimyasal Kompozisyon Belirleme

Makrofungus örneklerinin kimyasal bileşimleri (nem, protein, yağ, karbohidrat ve kül) AOAC prosedürü kullanılarak analiz edilmiştir (77). Nem içeriğinin tespiti; öncelikle cam petri kapları 105°C’de sabit tartıma getirilmiştir. Kuru örnekler tartıldıktan sonra (0,05 mg duyarlılıkla) sıcak hava fırınında 105°C’de 6 saat bekletilmiştir. 6 saatin sonunda desikatörde soğutulduktan sonra tartılmıştır. Sabit ağırlık tespit edilene kadar ısıtma ve soğutma işlemleri tekrarlanmıştır.

Kül miktarı tayini; porselen krezeller sabit tartıma getirildikten sonra kuru örnekler tartılmıştır ve krezelerde bulunan örnekler kül fırınında 600 °C’de 2 saat bekletilmiştir. Oda sıcaklığında soğutulduktan sonra sabit tartıma gelene kadar tekrar tartılmıştır.

Organik Madde = Kuru Madde - Ham Kül

Ham yağ tespiti; Eter, kloroform, benzen, toluen gibi organik çözücüler kullanılarak özüte edilmesiyle belirlenir. Özütten eter ve su arındırıldıktan sonra kalan kısım örnekteki ham yağı verir. Yağın yanında yağda eriyen vitaminler, organik asitler, klorofil, lesitinler, alkaloidler, mumlar, reçineler, sterinler ve fosfatidleri de içerdiğinden ham yağ adını alır. Ham yağ tayininde Soxhlet cihazı ve çözücü olarak eter kullanılmıştır. 60 °C’de sabit tartıma getirilmiş 250 mL’lik bir balon kullanılmıştır. Kuru örnekler eter ile soxlet cihazında ekstrakte edildikten sonra çözücü 60 °C’de uçurulmuştur.

Şeker tespiti fenol-sülfürik asit metoduna göre yapılmıştır. Metoda göre; Sukroz tayini; Fenol –sülfürik asit metodu ile yapılmıştır. Metoda göre; saflaştırılan kitosan örneğinin üzerine

sırasıyla 0,5 ml fenol ve 5 ml sülfirik asit ilave edilecektir. Örnekler 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra vortekslenmiştir. 25-30°C 'de 10-20 dk bekletilmiştir. Daha sonra 490 nm'de UV spektrofotometre ile okumalar yapılmıştır. Standart grafikten sukroz derişimi belirlenmiştir (99).

Protein tayini Lowry metoduna göre yapılmıştır. Metoda göre; Kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında Bovine Serum Albumin (BSA) protein standardı kullanılmıştır. BSA stok çözeltileri (2 mg/ml) pH'sı 7,2 olan 0,2 M fosfat tamponu içinde hazırlandıktan sonra örnekler %1'lik (w/v) konsantrasyonda yine fosfat tamponu içinde hazırlanmıştır. Standartlar ve örnekler bir gece hidrate edilmiştir. Protein standartları stok çözeltilerden fosfat tamponu ile seyreltilerek 0, 250, 500, 1000, 1500 ve 2000 µg/ml'lik derişimlerde hazırlanmıştır. Lowry stok çözeltilisini hazırlamak için, Lowry reaktifi A (%2,0 (w/v) Na₂CO₃, %0,4 (w/v) NaOH), B (%1 (w/v) CuSO₄.5H₂O) ve C (%2 (w/v) sodyum potasyum tartarat) 98:1:1 (A:B:C) oranında karıştırılmıştır. Lowry stok çözeltilisinin 3 ml'si ile 300 µl örnek bir tüp içinde karıştırılıp ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra her bir çözeltiliye 1:1 oranında seyreltilmiş 300 µl Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edilerek 30 dakikalık inkübasyondan sonra spektrofotometrede (jenyway UV) 595 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuş ve oluşturulan kalibrasyon eğrisinden polisakkaritlerin içeriğindeki % toplam protein miktarı hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

1. Antimikrobiyal Aktivite

Bu çalışmanın amacı, *Ganoderma lucidum*, *Sarcosphaera crassa*, *Pisolithus arhizus* ve *Tricholoma sp.* özütlerinin antimikrobiyal etkisinin incelenmesidir. Bu amaçla önce disk difüzyon testi uygulanmıştır. Bu testte, özütler steril ve boş antibiyotik disklerine emdirildikten sonra diskler, mikroorganizma kültürleri üzerinde denenmiştir. Mikroorganizma üzerinde etki gösteren özütler, besi yerlerinde inhibisyon zonu oluşturmuştur. Bu inhibisyon zonlarının çapı milimetre olarak kaydedilmiştir ve sonuçlar Tablo 1 ve 2'de verilmiştir. Farklı çözücülerle hazırlanan özütlerin farklı inhibisyon zonları verdiği gözlenmiştir. Buna göre, *Sarcosphaera crassa* A-3562'nin kloroform özütleri hiçbir bakteri üzerine etki göstermezken metanol özütleri üç tür bakteri ve bir maya türünü inhibe etmiştir. *Ganoderma lucidum*'un aseton ve etanol özütleri bakteri ve mayalar üzerinde diğerlerinden daha etkili olmuştur. *Salmonella enteritidis* bakterisine, *Sarcosphaera crassa* A-3562 türünün kloroform özütü hariç diğer özütlerin etkisi olduğu gözlenmiştir. Ve gözlenen etki referans antibiyotiğin neden olduğu etkiden yüksektir. *Bacillus subtilis* RSKK 244 bakterisi üzerine *Sarcosphaera crassa* A-3562'nin sadece metanol özütü etki göstermiştir. *Sarcosphaera crassa* A-3562'nin kloroform, metanol, etanol ve aseton özütlerinin *Candida glabrata* üzerine etkisi gözlenmiştir. Ancak bu etki pozitif kontrol olarak kullanılan referans antibiyotiğin etkisinden çok daha düşüktür. *Ganoderma lucidum*'un aseton özütü sadece *B. subtilis* bakterisini ve etanol özütü ise sadece *C. glabrata* mayasını inhibe etmemiştir. *Ganoderma lucidum*'un metanol özütü *C. glabrata* üzerinde en büyük zonu vermiştir ve bu değer referans antibiyotiğin verdiği zona çok yakındır. Antimikrobiyal maddeler, bakteri ve mantarları öldürücü (letal) veya bunların üremesini baskılayıcı etki gösterirler. Yapılan çalışmada sonuçlar standart antibiyotik testleri ile karşılaştırılmıştır. Mantar özütlerinin etki gösterdiği mikroorganizmalara karşı standart antibiyotik testlerinin etkisine ait veriler de Tablo 1 ve 2'de bulunmaktadır. Ayrıca, yapılan testler sonucunda, negatif kontrollerin (DMSO ve steril boş disk) herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

Tablo 1. *Ganoderma lucidum* özütlerinin inhibisyon zon sonuçları (mm)

Patojenler	Aseton	Etanol	Metanol	Kloroform	DMSO	Boş Disk	Nistatin	Eritromisin
<i>Candida glabrata</i> RSKK 04019	12	NI	25	NI	NI	NI	33	ND
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	10	10	NI	NI	NI	NI	22	ND
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10	16	NI	NI	NI	NI	ND	9
<i>Bacillus subtilis</i> RSKK 244	NI	13	10	10	NI	NI	ND	20
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	10	12	12	13	NI	NI	ND	9

NI: İnhibisyon yoktur.

ND: Çalışılmamıştır.

Tablo 2. *Sarcosphaera crassa* özütlerinin inhibisyon zon sonuçları (mm)

Patojenler	Aseton	Etanol	Metanol	Kloroform	DMSO	Boş Disk	Nistatin	Eritromisin
<i>Candida glabrata</i> RSKK 04019	10	10	20	10	NI	NI	33	ND
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	10	10	NI	NI	NI	NI	22	ND
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	NI	14	10	NI	NI	NI	ND	9
<i>Bacillus subtilis</i> RSKK 244	NI	ø	10	NI	NI	NI	ND	20
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	10	11	11	NI	NI	NI	ND	9

NI: İnhibisyon yoktur.

ND: Çalışılmamıştır.

P.arhizus'un etanol özütleri *C.glabrata* RSKK 04019, *B.subtilis* RSKK 244 ve *S.enteritidis* ATCC 13076 patojenlerine karşı diğer özütlerden daha çok etki göstermiş ve en yüksek zon çapını vermiştir. *Tricholoma spp.*'nin metanol özütleri bakteriler üzerinde diğerlerinden daha etkili olurken aseton ve kloroform özütleri ise mayalar üzerinde diğerlerinden daha etkili olmuştur.

S. enteritidis ATCC13076 ve *E.coli* ATCC 25922 bakterilerine, *P. arhizus* türünün tüm çözücülerdeki özütleri ve *B. subtilis* RSKK 244 bakterisine etanol özütü referans antibiyotikten daha yüksek antimikrobiyal etki göstermiştir. *P. arhizus*'un kloroform, metanol, etanol ve aseton özütlerinin *C. glabrata* RSKK 04019 ve *C.albicans* ATCC 90028 üzerine olan etkisi yine pozitif kontrol olarak kullanılan referans antibiyotiğin neden olduğu etkiden çok daha yüksektir.

Tricholoma spp. 'nin aseton özütü sadece *C.glabrata* RSKK 04019 mayasına ve metanol özütü ise *C.albicans* ATCC 90028 mayasına karşı en yüksek aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. *Tricholoma spp.* 'nin mayalara karşı olan tüm çözücülerdeki özütlerinin antimikrobiyal etkisi referans antibiyotikten daha yüksek aktivite gösterirken bakterilere karşı daha düşük etki göstermiştir.

Antimikrobiyal maddeler, bakteri ve mantarları öldürücü (letal) veya bunların üremesini baskılayıcı etki gösterirler. Yapılan çalışmada sonuçlar standart antibiyotik testleri ile karşılaştırılmıştır. Mantar özütlerinin etki gösterdiği mikroorganizmalara karşı standart antibiyotik testlerinin etkisine ait veriler de **Tablo 3 ve 4'de** bulunmaktadır. Ayrıca, yapılan testler sonucunda, negatif kontrollerin (DMSO ve steril boş disk) herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

Tablo 3. *Pisolithus arhizus* özütlerinin inhibisyon zon sonuçları (mm)

Patojenler	Aseton	Etanol	Metanol	Kloroform	DMSO	Boş Disk	Nistatin	Eritromisi
<i>Candida glabrata</i> RSKK 04019	18,5	21	17,5	11,5	NI	NI	9	ND
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	12,5	16	18,5	17,5	NI	NI	9	ND
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	15,5	10,5	13	10,5	NI	NI	ND	9
<i>Bacillus subtilis</i> RSKK 244	13,5	23	18,5	10,5	NI	NI	ND	20
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	10,5	21,5	12,5	10	NI	NI	ND	9

NI: İnhibisyon yoktur.

ND: Çalışılmamıştır.

Tablo 4. *Tricholoma sp.* özütlerinin inhibisyon zon sonuçları (mm)

Patojenler	Aseton	Etanol	Metanol	Kloroform	DMSO	Boş Disk	Nistatin	Eritromisin
<i>Candida glabrata</i> RSKK 04019	16,5	15	13	13	NI	NI	9	ND
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	17,5	13	16,5	19	NI	NI	9	ND
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	16,5	10,5	19,5	9,5	NI	NI	ND	37
<i>Bacillus subtilis</i> RSKK 244	9,5	15,5	21	9,5	NI	NI	ND	31
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	10,5	13	14,5	9,5	NI	NI	ND	32

NI: İnhibisyon yoktur.

ND: Çalışılmamıştır.

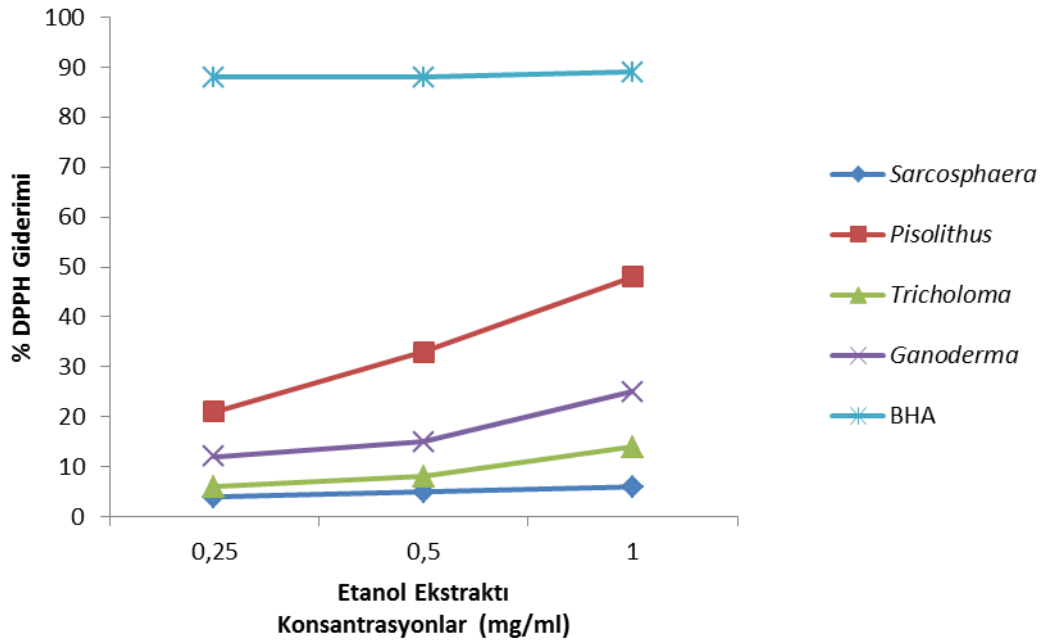
2. Antioksidan Aktivite

2.1. Ekstrelerin Serbest Radikal Süpürücü Etkileri:

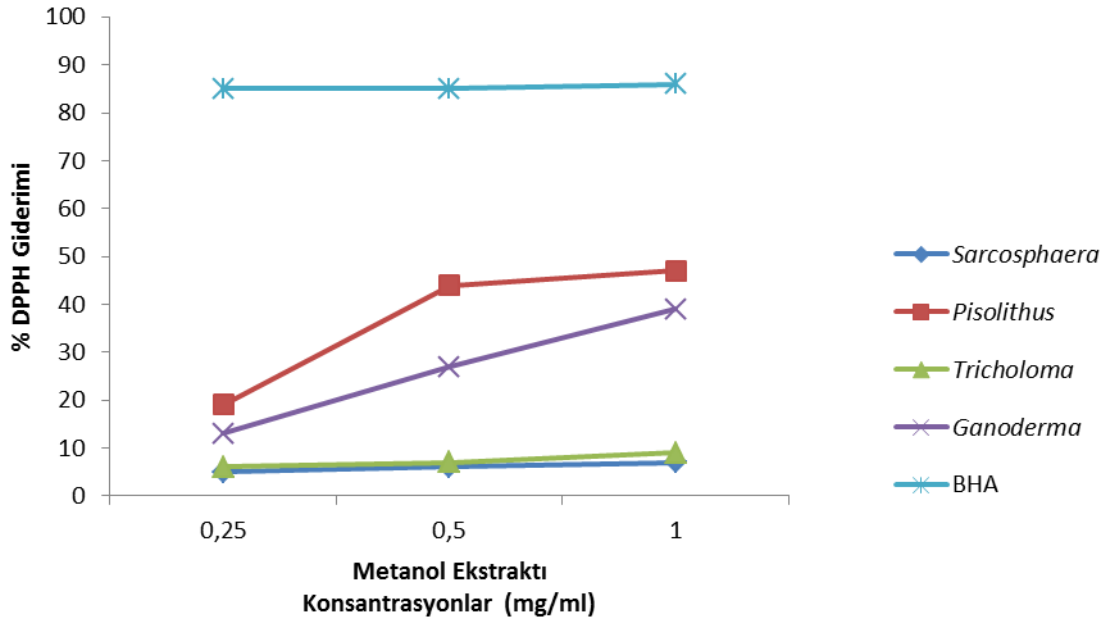
Etanolik fraksiyonlar ve standart (BHA)'ın serbest radikal süpürücü etkileri stabil bir serbest radikal olan DPPH üzerinde test edilmiştir. Serbest radikal süpürücü etki sonuçları 30 dakika içerisinde DPPH'nin %50 sini süpürdüğü konsantrasyon olarak (IC50) hesaplanmıştır. Düşük IC50 değeri yüksek antioksidan aktiviteyi göstermektedir. Bu çalışmada test edilen fraksiyonların ve standartların DPPH üzerinden hesaplanan IC50 değerleri ve serbest radikal süpürücü etki arasındaki ilişki **Tablo 5**'de görülmektedir. Tüm fraksiyonlarda sentetik antioksidan olan BHA'ya göre daha düşük oranda serbest radikal süpürücü etki gözlenmiştir. Buna göre çalışılan mantar türlerinden en düşük IC50 değeri ile standarta en yakın değer *P. arhizus* özütünde bulunmuş olup bu değer en yüksek antioksidan aktiviteye sahip mantar olduğunu ifade ederken hem etanol hem metanol ekstraktlarında en yüksek değer *S. crassa* mantarında bulunmuştur. Dolayısıyla DPPH giderim etkisi en azdır. *P. arhizus*, *S. crassa* ve *G. lucidum* mantarlarının metanol özütlerinin DPPH süpürücü etkisi etanol özütlerinden daha yüksek çıkarken *Tricholoma sp.*'nin etanol özütünün DPPH giderimi metanol özütünden daha yüksek çıkmıştır.

Tablo 5. Makrofungus fraksiyonlarının DPPH radikali üzerindeki serbest radikal süpürücü etkileri

% DPPH GİDERİMİ						
Konsantrasyonlar (mg/ml)						
Mantarlar	0,25 Etanol	0,5 Etanol	1,0 Etanol	0,25 Metanol	0,5 Metanol	1,0 Metanol
<i>S. crassa</i>	4 ± 1	5 ± 0	6 ± 0	5 ± 1	6 ± 0	7 ± 0
<i>P. arhizus</i>	21 ± 1	33 ± 2	48 ± 1	19 ± 1	44 ± 0	47 ± 1
<i>Tricholoma sp.</i>	6 ± 0	8 ± 0	14 ± 0	6 ± 3	7 ± 1	9 ± 1
<i>G. lucidum</i>	12 ± 2	15 ± 1	25 ± 1	13 ± 1	27 ± 2	39 ± 1
BHA**	88 ± 0	88 ± 0	89 ± 0	85 ± 1	85 ± 0	86 ± 0



Şekil 1. Mantar örneklerinin etanol ekstraktlarının % DPPH giderimi



Şekil 2. Mantar örneklerinin metanol ekstraktlarının % DPPH giderimi

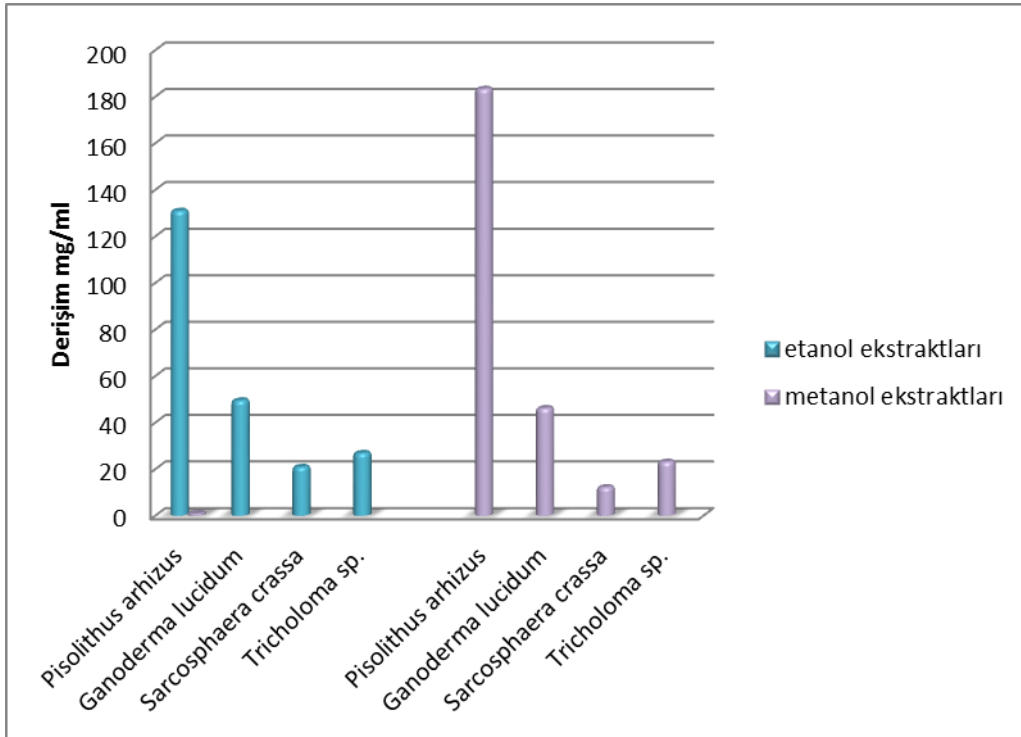
2.2. Total fenol ve total flavonoid miktar tayini

Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak yapılan toplam fenolik bileşik tayininde kullanılan standart bileşik gallik asittir. Toplam fenol miktarı yüksek olan fraksiyonlarda antioksidan aktivite de yüksek olarak bulunmuştur. En yüksek toplam fenolik içeriğe sahip *P. arhizus* türünün serbest

radikal süpürücü etkisi en yüksekken en düşük DPPH giderimine sahip olan *Sarcosphaera crassa*'nın fenolik içeriği de en düşüktür. Buna göre çalışmamızda elde ettiğimiz değerler IC₅₀ değeri ile fenolik içerik arasında doğru orantı olduğunu göstermektedir. **Tablo 6**'ya göre *P. arhizus*'un metanolik ekstraktı etanolik ekstraktından daha yüksek fenolik içeriğe sahiken diğer üç mantarın etanol özütü metanol özütünden daha yüksek fenolik içeriğe sahiptir.

Tablo 6. Mantar örneklerinin etanol/ metanol ekstraktlarındaki total Fenol/Flavonoid miktarları

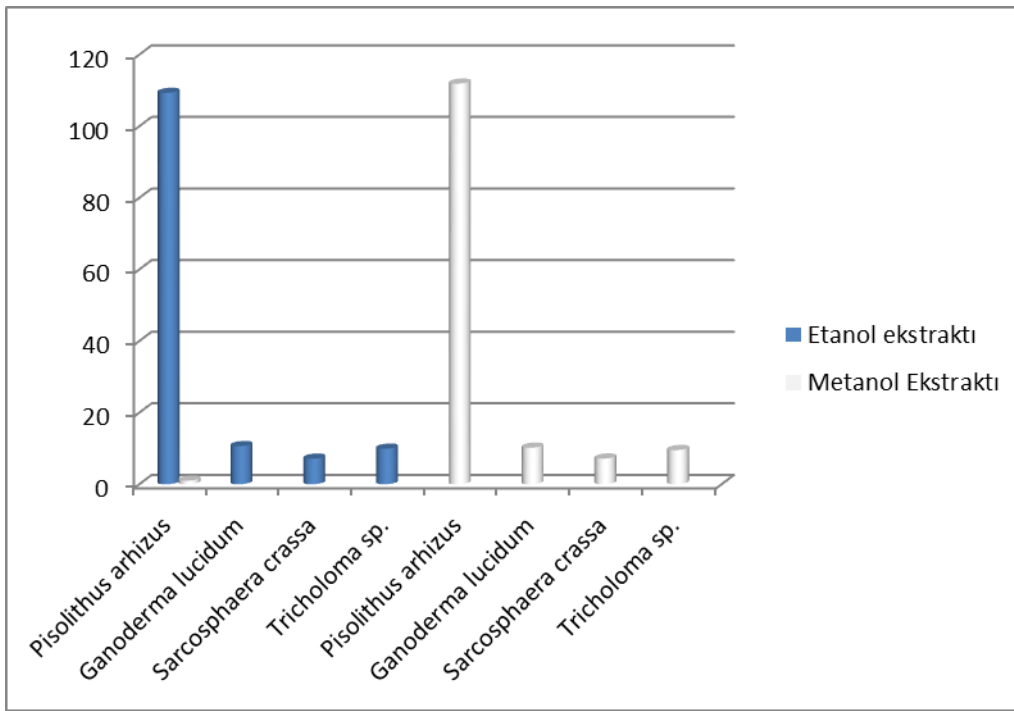
Ekstrakt	Mantar	Total Fenolik İçerik mgGAE/g	Total Flavonoid İçerik mgRE/g
Etanol	<i>P. arhizus</i>	130,96±1,36	109,33±3,44
	<i>G. lucidum</i>	49,52±0,68	10,66±0,69
	<i>S. crassa</i>	20,96±1,90	7,16±0,98
	<i>Tricholoma sp.</i>	26,92±2,72	9,93±0,88
Metanol	<i>P. arhizus</i>	183,36±1,71	111,9±1,59
	<i>G. lucidum</i>	46,21±1,83	10,21±1,19
	<i>S. crassa</i>	12,24±0,61	7,18±0,79
	<i>Tricholoma sp.</i>	23,19±1,22	9,55±0,32



Şekil 3. Mantar örneklerinin etanol/ metanol ekstraktlarındaki total fenol miktarlarının dağılımı

Flavonoidler, fenolik bileşiklerin geniş bir grubunu oluşturmaktadır ve serbest radikalleri

temizleme, metal iyonlarla bileşik oluşturma (metal şelatlama) ve singlet (tekli) oksijen oluşumunu engelleme veya azaltma gibi özelliklere sahiptirler. Total Flavonoid miktarı ile antioksidan aktivite arasında pozitif bir korelasyon bulunduğu pek çok kaynakta ifade edilmektedir. Mantar örneklerinin etanol ve metanol ekstraktlarındaki total flavonoid miktarları **Tablo 6**'de verilmiştir. Tabloya göre mantar örneklerinin etanol ve metanol özütlerindeki toplam flavonoid içeriği *S.crassa* dışındaki mantarlarda birbirine yakın değerlerde bulunmuşken *S.crassa*'nın metanol ekstraktında daha fazla miktarda flavonoid içerdiği tespit edilmiştir. *P. arhizus* ise en yüksek toplam flavonoid içeriğine sahip mantar türüdür.



Şekil 4. Mantar örneklerinin etanol/ metanol ekstraktlarındaki total flavonoid miktarlarının dağılımı

2.3. β -Karoten ve Likopen Tayini

β -Karoten ve Likopenin, singlet oksijen, serbest radikaller, lipid-peroksi radikaller gibi zararlı kimyasalları deaktif etme ve sönmleme yeteneklerinden dolayı güçlü antioksidan kapasitesiye sahiptir. Bu anlamda β -Karoten ve Likopen miktarı antioksidan aktivite ile doğru orantılıdır. Çalışmamızda ki mantar örneklerinin hem metanol hem de etanol özütlerinde β -Karoten ve Likopen miktarları az miktarda bulunmuştur (**Tablo 7,8**).

Tablo 7. Mantar örneklerinin metanol ekstraktlarının β -Karoten- Likopen miktarları (mg/g)

	β - Karoten- Likopen Miktarı (mg/g)			
	Metanol Ekstraktı			
	<i>S.crassa</i>	<i>P. arhizus</i>	<i>Tricholoma sp.</i>	<i>G. lucidum</i>
β - Karoten	0,104 $\pm$ 0,005	0,240 $\pm$ 0,002	0,066 $\pm$ 0,001	0,224 $\pm$ 0,004
Likopen	0,023 $\pm$ 0,004	0,031 $\pm$ 0,004	0,037 $\pm$ 0,003	0,038 $\pm$ 0,002

Tablo 8. Mantar örneklerinin etanol ekstraktlarının β -Karoten- Likopen miktarları (mg/g)

	β - Karoten- Likopen Miktarı (mg/g)			
	Etanol Ekstraktı			
	<i>S.crassa</i>	<i>P. arhizus</i>	<i>Tricholoma sp.</i>	<i>G. lucidum</i>
β - Karoten	0,157 $\pm$ 0,004	0,383 $\pm$ 0,003	0,072 $\pm$ 0,002	0,425 $\pm$ 0,004
Likopen	0,030 $\pm$ 0,004	0,068 $\pm$ 0,005	0,031 $\pm$ 0,004	0,075 $\pm$ 0,003

2.4. Ekstrelerin ve Fraksiyonların Linoleik Asit Peroksidasyonu Üzerine Etkileri

Total antioksidan tayini için kullanılan ferrik tiyosiyanat metodu, linoleik asit emülsiyonunun oksidasyonu sonucu oluşan peroksidin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Yüksek absorbans, peroksidasyon sonucu oluşan peroksit miktarının fazlalığını gösterir. Oluşan peroksit Fe^{2+} 'yi Fe^{3+} 'e yükseltir. Daha sonra Fe^{3+} ilave edilen amonyum tiyosiyanat ile reaksiyona girerek renkli kompleks oluşturur ve absorbans ölçümü yapılır. Sentetik antioksidan olarak BHT kullanılmıştır. Sonuç olarak, absorbans değeri ne kadar düşük olursa antioksidan etkisi ve % inhibisyon (lipit peroksidasyonunun inhibisyonu=linoleik asit peroksidasyonunun inhibisyonu) değeri o kadar yüksek olur. Çünkü, denenen etken maddenin eğer antioksidan etkisi yüksek ise linoleik asit peroksidasyonunu inhibe eder. Bu ilişki ters orantı şeklindedir, antioksidan etkisi yüksek olan etken maddelerin lipit peroksidasyon absorbansı düşer ve bu da % peroksidasyon inhibisyonunun yüksek olması demektir. Buna göre, sonuçları değerlendirdiğimizde genel olarak en iyi % inhibisyon sonuçları 250 ug/ml konsantrasyonlarında gözlenmiştir. Ekstraktlar incelendiğinde metanol ekstraktlarında *Ganoderma lucidum* ve *Tricholoma sp.* mantarlarında gözlenirken, etanol ekstraktlarında ise *Tricholoma sp.* ve *P. arhizus* mantarlarında görülmüştür (**Tablo 9**).

Linoleik asit peroksidasyonunu inhibe etme esasına dayalı yapılan total antioksidan tayini sonucunda mantarın konsantrasyonu arttıkça % inhibisyon değerinin azaldığı gözlenmiştir.

Bunun da sebebinin yüksek konsantrasyonlarda mantarın bir miktar linoleik asit peroksidasyonuna sebep olduğu düşünülmektedir.

Tablo 9. Mantarlardan Elde Edilen Ekstrelerinin Demir-Tiyosiyanat Yöntemi ile Linoleik Asit Peroksidasyonu Üzerine Etkileri

Ekstrakt	Mantar Adı	% İnhibisyon		
		1000ug/ml	500ug/ml	250ug/ml
Etanol	<i>P. arhizus</i>	3,2	4,43	11,58
	<i>G. lucidum</i>	3,69	6,15	8,37
	<i>Tricholoma sp.</i>	0	8,62	12,31
	<i>S. crassa</i>	7,63	10,34	7,88
	BHT	12,34	11,08	10,59
	<i>P. arhizus</i>	26,88	33,85	36,82
Metanol	<i>G. lucidum</i>	38,21	38,91	39,96
	<i>Tricholoma sp.</i>	39,44	41,01	41,55
	<i>S. crassa</i>	34,55	37,35	41,88
	BHT	40,13	36,99	34,9

2.6. Metal Şelatlama

Tablo 10 ve 11'de görüldüğü gibi *S.crassa* türünün etanol ekstraktı en düşük IC₅₀ değerine ve en yüksek % demir şelatlama aktivitesi göstererek en yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir. Konsantrasyon miktarı arttıkça demir şelatlama kabiliyetide artmıştır. Genel anlamda metanol ekstraktları daha yüksek metal şelatlama kabiliyeti göstermiştir.

Tablo 10. Mantar örneklerinin üç konsantrasyonunda (0,25; 0,5; 1.0 µg/ml) % demir şelatlama yeteneği

% DEMİR ŞELATLAMA						
Mantarlar	Etanol (µg/ml)			Metanol (µg/ml)		
	0,25	0,5	1,0	0,25	0,5	1,0
<i>S. crassa</i>	11 ± 1	14 ± 2	22 ± 0	14 ± 12	16 ± 1	18
<i>P. arhizus</i>	1 ± 0	1 ± 0	6 ± 1	10 ± 1	12 ± 1	14
<i>Tricholoma sp.</i>	1 ± 0	2 ± 1	8 ± 1	18 ± 1	19 ± 0	20
<i>G. lucidum</i>	1 ± 1	1 ± 1	3 ± 1	11 ± 1	13 ± 1	17 :

Tablo 11. Mantar örneklerinin demir şelatlama yeteneği için IC₅₀ miktarları (mg/ml)

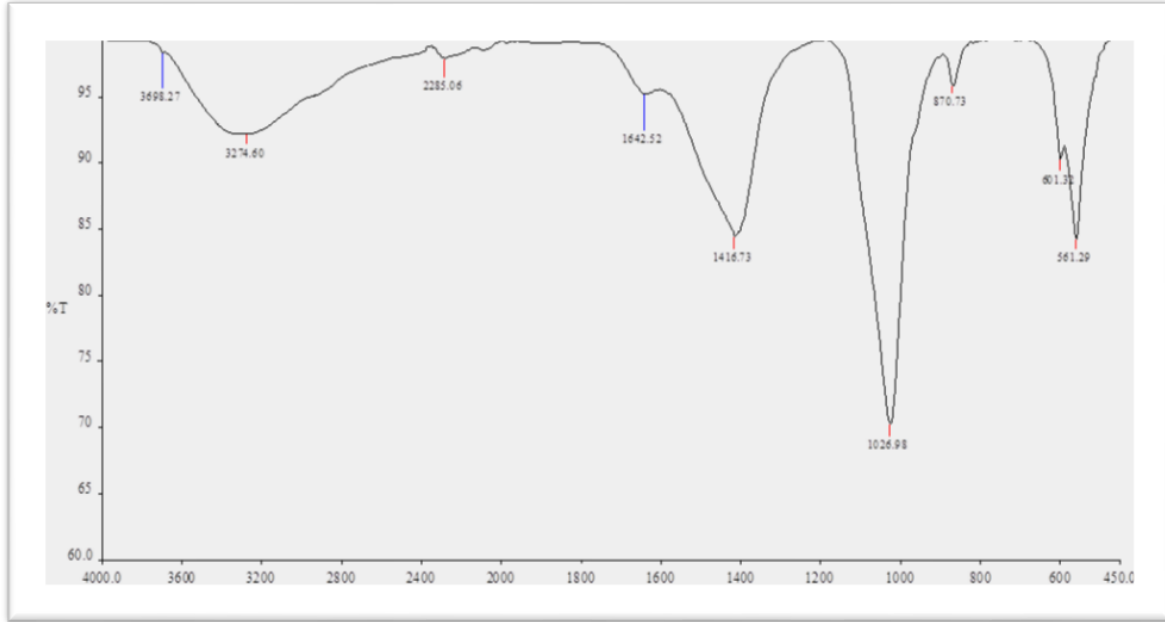
IC ₅₀ (mg/ml)		
Mantarlar	Demir Şelatlama	
	Etanol	Metanol
<i>S. crassa</i>	8,24 ± 0,03	19,02 ± 0,05
<i>P. arhizus</i>	20,93 ± 0,16	21,03 ± 0,11
<i>Tricholoma sp.</i>	15,24 ± 0,12	33,00 ± 0,07
<i>G. lucidum</i>	50,33 ± 0,07	14,11 ± 0,01

3. FT-IR analizi

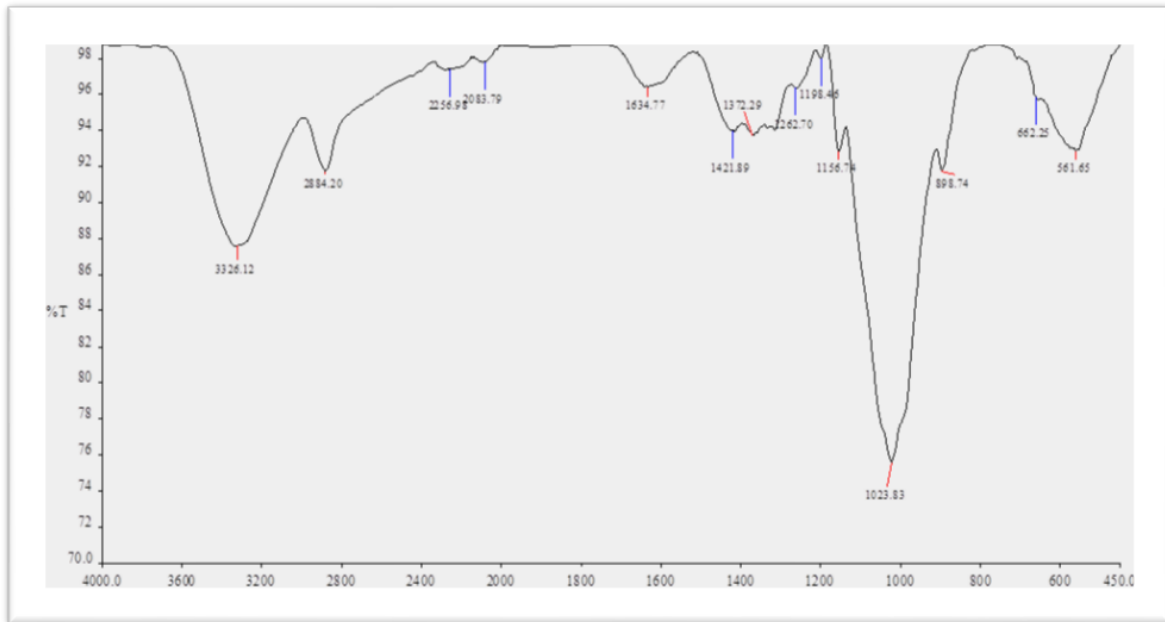
Çalışmalarımızda kullanılan makrofungus türleri içerisinde sadece *G. lucidum* türünden kitosan ekstraksiyonu gerçekleştirilebilmiştir. % 85 Saflıktaki Deasetillenmiş Kitosan (Alfa Easer) ve deasetillenmiş mantar örneğinin ATR sistemli TF-IR ile IR spektrumları alınmıştır. Sırasıyla ticari kitosan ve deasetilenmiş mantar örneklerinde NH'a ait 3326 ve 3275 cm⁻¹'de pikler görülmektedir. Benzer şekilde C=N'e ait 1638 ve 1642 cm⁻¹'de görülen pikler elde

edilmiştir. Her ne kadar iki spektrumda bazı farklılıklar olsa da ticari kitosan ile deasetilasyonu yapılarak mantardan elde edilen kitosan'ın IR spektruları benzerlikler içermektedir.

IR spektrumundan NH ve C=N piklerinin absorbans şiddetlerinden (formül ve literatürü ekle) elde edilen hesaplama göre % 43 civarında deasetilasyon derecesinin olduğu belirlenmiştir.



Şekil 5. *G. lucidum*'dan izole edilen kitosanın IR spektrısı



Şekil 6. Ticari kitosanın IR spektrısı

4. Kimyasal Kompozisyon Analizi

Yapılan deneyler sonucunda *G. lucidum*, *Tricholoma sp.*, *S. crassa*, *P. arhizus* özütlerine ait kimyasal bileşenlerine ait değerleri **Tablo 12**'de verilmiştir.

Table 12. Makrofungus türlerinin kimyasal kompozisyonu (% dry weight)

MANTARLAR	% Protein miktarı	% Şeker miktarı	% Nem	% Yağ	% Kül
<i>G. lucidum</i>	31,44	78,04	4,24	1,81	89,5
<i>Tricholoma sp.</i>	30,91	28,62	7,06	2,46	84,9
<i>S. crassa</i>	23,97	80,21	5,25	2,17	66,0
<i>P. arhizus</i>	30,91	63,98	5,88	2,68	77,1

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmanın amacı, *G. lucidum*, *P. arhizus*, *S. crassa* ve *Tricholoma sp.* özütlerinin antimikrobiyal ve antioksidan etkisinin ve kimyasal kompozisyonunun ve kitosan üretimlerinin incelenmesidir. Bu amaçla antimikrobiyal aktivite için önce disk difüzyon testi uygulanmıştır. Bu testte, özütler steril ve boş antibiyotik disklerine emdirildikten sonra diskler, mikroorganizma kültürleri üzerinde denenmiştir. Mikroorganizma üzerinde etki gösteren özütler, besi yerlerinde inhibisyon zonu oluşturmuştur. Bu inhibisyon zonlarının çapı milimetre olarak kaydedilmiştir ve sonuçlar **Tablo 1-4'**de verilmiştir. Buna göre *C. albicans* ve *C. glabrata* üzerine çalışılan tüm makrofunguslar etki gösterirken *P. arhizus* ve *Tricholoma sp.* makrofungusu türleri referans antibiyotiğin neden olduğu etkiden daha yüksek etki göstermişlerdir. *E. coli* üzerine *P. arhizus*, *G. lucidum* ve *S. crassa* özütleri referans antibiyotikten daha yüksek etki göstermiştir. *B. subtilis* üzerine dört mantar türünde inhibisyon göstermiştir fakat bu etki referans antibiyotiğin etkisinden daha düşüktür. *S. aureus* üzerine dört tür makrofungusunun da etki gösterdiği gözlenmiştir. *Tricholoma sp.* mantar türü hariç diğer tüm mantarlar referans antibiyotikten daha yüksek aktivite göstermiştir.

Antimikrobiyal maddeler, bakteri ve mantarları öldürücü (letal) veya bunların üremesini baskılayıcı etki gösterirler. Yapılan çalışmada sonuçlar standart antibiyotik testleri ile karşılaştırılmıştır. Makrofungusu özütlerinin etki gösterdiği mikroorganizmalara karşı standart antibiyotik testlerinin etkisine ait veriler de **Tablo 1'**de bulunmaktadır. Ayrıca, yapılan testler sonucunda, negatif kontrollerin (DMSO ve steril boş disk) herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

Yamaç ve Bilgili çalışmalarında, on farklı makrofungus türüne ait misellerin antimikrobiyal aktivitelerini incelemişler ve sonuçta *Clavariadelphus truncatus* ve *Trametes versicolor'* un yüksek antibakteriyal etkiye sahip olduklarını belirtmişlerdir (100)

Gerasimenya ve arkadaşları Rusya'nın Moskova kenti yakınlarından topladıkları *P.ostreatus* 'a ait 14 suşun antimikrobiyal aktivite denemelerinde makrofunguslara ait şapka ve misel formlarını kullanmışlar ve sonuç olarak her iki formun etanol ekstratlarından şapkada orta düzeyde antifungal etkinin miselde ise yüksek düzeyde antibakteriyal etkinin var olduğunu rapor etmişlerdir (101).

Efremenkova ve arkadaşları Rusya'nın farklı bölgelerinden topladıkları *Coprinus* genusuna dahil altı farklı türe ait 14 tür üzerinde antimikrobiyal aktivite çalışması yapmışlardır. Bu çalışmada *C. digitalis* tüm suşlara ait misellerin etanol ekstreleri test mikroorganizmaları üzerinde denenmiş ve türüne ait misellerin geniş bir antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve beta laktam grubu antibiyotiklere dirençli *S. aureus* (MRSA) ve glikopeptid türü antibiyotiklere dirençli *Leuconostoc mesenteroides* üzerinde de etkili olduğu rapor edilmiştir (102).

Kalyoncu ve arkadaşları bazı yabani makrofungus miselleri üzerine yaptıkları çalışmada miselleri kullanılan 21 tane makrofungus türlerinin çoğunun antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığı veya zayıf aktivite gösterdiği saptanmıştır. En yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip tür olarak *G.lucidum* (Curtis) P. Karst belirlenmiştir. Bu tür test mikroorganizmalarının çoğu üzerinde farklı düzeylerde inhibisyon etkisi göstermiştir. İnhibisyon gösterdiği mikroorganizmalar üzerindeki etkisi standart antibiyotiklerin bazılarında daha iyi, bazılarında ise yakın değerlerdedir (103).

Tricholoma terreum (Fr) Kummer' den elde edilen ekstrelerin bazı Gram (-) ve Gram (+) bakterilere karşı etkili bir antimikrobiyal aktivite gösterdiğini, fakat kullanılan maya kültürlerine karşı ise antagonistik bir aktiviteye sahip olmadıklarını tespit etmişlerdir (104).

Smania ve arkadaşları *Ganoderma applanatum*'dan izole edilen birkaç triterpenoidin *B.cereus*, *C. diphtheriae*, *E.coli*, *P. aeruginosa*, *S.aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* ve *Streptococcus pyogenes* gibi bazı gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı inhibitör etkisini tespit etmişlerdir (105).

Ganoderma japonicum mantarının miselinden elde edilen esansiyal yağın kimyasal bileşenlerinin ve antimikrobiyal aktivitesinin incelendiği çalışmada *G.japonicum* tüm test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etki göstermiştir. Methicillin dirençli *S.aureus*, *K.pneumonia* ve *Enterobacter cloacae* 'ya karşı kontrol antibiyotiği olan Levofloxasinden oldukça yüksek bakteristatik ve bakteriosidal etki göstererek dikkat çekmiştir (106).

Yapılan birçok yeni araştırmada makrofunguslarının antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Makrofunguslarının aktif metabolit bakımından zengin olması, onun

antibakteriyel etkisinin yanı sıra antioksidan olarak da kullanılmasını sağlamıştır. Makrofunguslarının bünyesinde barındırdığı kendine özgü ve çok çeşitli metabolit grupları onların antioksidan ve diğer terapötik etkilerinden sorumludur. Farmakolojik araştırmalar farklı makrofunguslarının sitotoksik, antifungal, antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteye sahip olduklarını göstermiştir. Makrofunguslarında antioksidan aktiviteyi sağlayan sekonder metabolitlerin fenolik bileşikler, benzil, mono, di, tri, sekiterpenler ve flavonoidler oldukları düşünülmektedir (107).

Çalışmamızda antioksidan aktivitenin tespiti için makrofungusu özütlerinin serbest radikal süpürücü etkileri, total fenol miktarı, metal şelatlama aktivitesi ve linoleik asit peroksidasyon inhibisyonu test edilmiştir.

Etanolik fraksiyonlar ve standart (BHA)'ın serbest radikal süpürücü etkileri stabil bir serbest radikal olan DPPH üzerinde test edilmiştir. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak elde edilebilen stabil organik nitrojen radikalidir. 515 nm'de maksimum absorbanza sahiptir. Az miktarda serbest radikal oluşumu bazı durumlarda, örneğin bakterilerin nötrofiller tarafından oksijen radikalleri ile öldürülmesi gibi, organizmaya yararlı olabilir. Bunun yanında fazla miktarda serbest radikal oluşumu sonucu oluşan oksidatif stres ile hücrede DNA, proteinler, lipidler, karbonhidratlar ve enzimlerin zarar görmesine yol açabilir (108). Karbonhidrat, lipid, protein ve DNA gibi biyomoleküllerin tüm sınıfları ve tüm hücre komponentleri ile etkileşme özelliği göstererek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olurlar (109, 110). Bu durum biyomoleküllerin yapılarına zarar vermektedir. Bu zararlar hücrenin cinsine, maruz kalınan oksidatif strese ve şiddetine bağlı olarak , toksik, mutajenik veya karsinojenik olabilir (111, 108). Serbest radikal süpürücü etki sonuçları 30 dakika içerisinde DPPH'ın %50 sini süpürdüğü konsantrasyon olarak (IC_{50}) hesaplanmıştır. Düşük IC_{50} değeri yüksek antioksidan aktiviteyi göstermektedir (112). Bu çalışmada test edilen fraksiyonların ve standartların DPPH üzerinden hesaplanan IC_{50} değerleri ve serbest radikal süpürücü etki arasındaki ilişki **Tablo 5**'de görülmektedir. Tüm fraksiyonlarda sentetik antioksidan olan BHA'ya göre daha düşük oranda serbest radikal süpürücü etki gözlenmiştir. Buna göre çalışılan makrofungusu türlerinden en düşük IC_{50} değeri ile standarta en yakın değer *P. arhizus* özütünde bulunmuş olup bu değer en yüksek antioksidan aktiviteye sahip makrofungusu olduğunu ifade eder.

Fenol ve flavonoidler: antioksidatif aktivitelerini oksidatif enzimleri inhibe ederek, metal iyonlarıyla şelat oluşturarak, diğer antioksidanlar ile etkileşime girerek ve serbest radikalleri yakalayarak göstermektedirler (113). Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak yapılan toplam fenolik bileşik tayininde kullanılan standart bileşik gallik asittir. Toplam fenol miktarı yüksek olan fraksiyonlarda antioksidan aktivite de yüksek olarak bulunmuştur. En yüksek toplam fenolik içeriğe sahip *P. arhizus* türünün serbest radikal süpürücü etkisi sentetik bir antioksidan olan BHA 'den çok daha düşüktür. Buna göre çalışmamızda elde ettiğimiz değerler IC₅₀ değeri ile fenolik içerik arasında bir korelasyon olduğunu göstermemektedir (Tablo 6).

Demir ve bakır gibi geçiş metalleri serbest radikal oluşturan güçlü birer oksidatif katalist olarak görev yapmaktadırlar. Demir oksidatif reaksiyonları teşvik etmede daha etkilidir (114). **Tablo 10-11**'de de görüldüğü gibi *S. crassa* türü en düşük IC₅₀ değerine ve en yüksek % demir şelatlama aktivitesi göstererek en yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir. Konsantrasyon miktarı arttıkça demir şelatlama kabiliyetide artmıştır.

Diğer makrofungusu türlerinden elde edilen sonuçlar birbirini desteklememiştir. Halbu ki antioksidan aktiviteyi tespit edebilmek için en az üç antioksidan test sonuçları birbirini desteklemeli ve sonuçlar standartlar ile karşılaştırılmalıdır (115). Bu açıdan, bu araştırmadan elde edilen sonuçlara göre *P. arhizus* ve *G. lucidum* türlerinin antioksidan kapasitesi; diğer makrofungusu türlerinden daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır.

Kawaratake (*Coriolus versicolor*), Shiitake (*Lentinula edodes*), Reishi (*Ganoderma lucidum*) ve Maitake (*G. frondosa*) mantarlarının etken maddelerinden elde edilen ilaçlarla bir çalışma yapılmış ve özellikle yaygın kullanımlarından dolayı iki farklı bileşen olan aktif heksoz bileşeni (AHCC) ve MGN-3 bileşenleri incelenmiştir. Bu ilaçların hastalarda tümör yayılımını engellediği ve antioksidan etkilerinden dolayı bağışıklık sistemini güçlendirdiği belirlenmiştir (116).

T. fracticum yenilebilir mantarının antioksidan aktivitesi, serbest radikal giderim kapasiteleri ve aktiviteden sorumlu oldukları ileri sürülen fenolik ve flavanoit yapılı bileşiklerin miktarlarının araştırıldığı bir çalışmada; mantardan elde edilen metanol ekstresinin ve bu

ekstrelerden sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile elde edilen hekzan ve etil asetat ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri β -karoten-linoleik asit ve DPPH serbest radikal giderimi, ABTS katyon radikali giderimi, CUPRAC indirgeme gücü ve metal bağlama yöntemleriyle belirlenmiştir (117).

Chroogomphus rutilus yenilebilir mantarı ile yapılan çalışmada; antioksidan aktivitesi, serbest radikal giderim kapasiteleri araştırılmış, mantardan metanol ekstresi ve bu ekstrelerden sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile elde edilen sırasıyla hekzan, etil asetat ve metanol ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri β -karoten-linoleik asit renk açılımı, DPPH serbest radikal giderimi, ABTS katyon radikali giderimi, CUPRAC indirgeme gücü ve metal bağlama yöntemleriyle belirlenmiştir. Mantarın etil asetat ekstresi β -karoten-linoleik asit yöntemi ile hesaplanan toplam antioksidan aktivite bakımından diğer ekstraktlardan daha yüksek inhibisyon gösterdiği ve buna ilaveten etil asetat ekstresi DPPH serbest radikal giderimi ($74,62 \pm 0,34$), ABTS katyon radikali giderimi ($89,12 \pm 0,07$) ve CUPRAC indirgeme gücü kapasitesi ($3,47 \pm 0,25$) bakımından en yüksek inhibisyonu sağladığı bulunmuştur. Hem β -karoten renk açılımı hem de CUPRAC yönteminde etil asetat ekstresi sentetik antioksidanlardan daha yüksek inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir (118).

Agaricus, *Agrocybe*, *Boletus*, *Ganoderma*, *Geastrum*, *Lactarius*, *Phellinus*, *Pleurotus*, *Polyporus*, *Russula*, *Termitomyces*, *Ascomycetes*, *Morchella* mantar türlerinin antioksidan aktiviteleri; *Agrocybe* ve *Ganoderma* türlerinin ise antikanserojen etkinlikleri bulunduğu artık bilinmektedir. Ayrıca Basidiomycetes sınıfı birçok mantarın antioksidan (*Geastrum saccatum*, *Leucopaxillus giganteus*, *Laetiporus sulphureus*, *Cantharellus cibarius*, *Polyporus gilvus*, *P. sulphureus*, *P. annosus*, *P. radiatus*, *P. pinicola*, *P. volvatus*, *P. fomentarius*, *P. stevenii*, *P. badius*, *Trametes versicolor*, *Lactarius deliciosus*, *Tricholoma portentosum*, *Pleurotus sp.*, *Hygrocybe sp.*, *Polyporus tenuiculus*, *Hygrophorus sp.*, *Schizophyllum commune*, *Russula cyanoxantha*, *Amanita rubescens*, *Suillus granulatus*, *Boletus edulis*, *Pleurotus ostreatus*, *Phellinus rimosus*, *Pleurotus florida*, *P. sajor-caju*, *Ganoderma lucidum*, *Inonotus xeranticus*, *Lentinus edodes*, *Agaricus bisporus*, *Amanita caesarea*, *Dictyophora indusiata*, *Grifola frondosa*, *Hericium erinaceus*, *Tricholoma giganteum*, *Flammulina velutipes*, *Polyporus squamosus*, *Lepista nuda*, *Russula delica*, *Boletus badius*, *Inonotus obliquus*, *Pleurotus cystidiosus*, *Ramaria flava*, *Rhizopogon roseolus*, *Volvariella volvacea*, *Agrocybe aegerita*, *Clitocybe geotropa*, *Leucoagaricus pudicus*) etkisi artık bilinmektedir (119).

Mantarların hücre duvarlarının yapısında bulunan ve birçok biyolojik aktivitesi olduğu bilinen kitosan, kitinin deasetillenmesi ile elde edilir. Deasetillenme derecesi elde edilen kitosanın saflık derecesini ifade eder. Çalışmamızda % 85 Saflıktaki ticari kitosan ve deasetillenmiş mantar örneğinin ATR sistemli TF-IR ile IR spektrumları alınmıştır. Elde edilen hesaplama göre mantar örneğinden % 43 civarında deasetilasyon derecesine sahip kitosanın izole edildiği belirlenmiştir. Mantarlardan kitosan eldesine yönelik birçok literatür bulunmaktadır. Jawerska ve Konieczna (2001) *Absida orchidis*'ten 1,84 g/L, Crestini *et al.* (1994) *Lentinula edodes*'ten 120 mg/L, Tan *et al.* (1996) *Ganoderma butleri*'den 467 mg/L, Arcidiacona ve Kaplan (1992) *Morchella rousii*'den 250 mg/L verimde kitosan elde etmişlerdir. Muzzarelli *et al.* (1994) çalışmasında *Absidia coerulea* 'dan 1800 mg/L kitosan izole ettiklerini rapor etmişlerdir (120).

Bu çalışmada, makrofungusların ortalama kül, nem, şeker, ham yağ ve protein miktarları tespit edilmiştir. Sonuçlara göre en yüksek protein miktarı *G. lucidum* özütünde ve şeker içeriği ise *S. crassa* özütünde sırasıyla % 31 ve % 80 olarak *tespit* edilmiştir. En yüksek ham yağ *P. arhizus* özütünde % 2,68 ve mineral içeriğinin bir göstergesi olan kül miktarı *G. lucidum* ve *Tricholoma sp.* türlerine ait özütlerden sırasıyla % 89,5 ve %84,9 olarak elde edilmiştir. Genel olarak besin değerleri incelenen makrofungusu türleri arasında büyük oranda farklılık göstermemiştir. Mevcut sonuçlara göre, bu çalışmadaki makrofungusu türleri tüketim için iyi bir kaynak olarak önerilebilir.

Bu çalışma göstermektedir ki, gelecekte makrofungusu özütlerindeki etkin maddeler tespit edildiği takdirde, günümüzün büyük problemi olan mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı dirençliliğine çözüm olarak makrofunguslarını da antimikrobiyal ilaç üretiminde iyi ve yeni kaynaklar olarak karşımıza çıkarabilir. Ayrıca günümüzde kanser hastalığı ve kanser riski arttıkça doğal antioksidanlara olan ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır. Araştırmalarda makrofunguslarında antioksidan aktivitenin bulunması ve doğal antioksidan arayışı makrofunguslara olan ilgiyi arttırmaktadır. Daha ileride makrofungusları ile yapılacak olan pek çok araştırma doğal antioksidan bileşiklerinin saptanması ve saf olarak eldesi ile bu bileşiklerin ilaç, kozmetik ve gıda sektöründe kullanılması, böylelikle hücrel savunmayı artırıcı yeni ve daha etkili bileşikler elde edilebilmesini olanaklı kılacaktır. Sonuç olarak makrofunguslar birçok hastalığın oluşumu, ilerlemesi ve tedavisinde umut verici olabilir ve yaşlanma etkeni olan oksidatif stres baskılanarak yaşlanma süreci yavaşlatılarak daha uzun ve daha sağlıklı bir yaşam mümkün olabilir.

KAYNAKLAR

1. Aydın E., Bazı *Salvia* Genusu Üyelerinin *Acanthamoeba Castellani* Tedavisindeki Kullanım Potansiyelleri ve Sitotoksik Aktivitelerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas 2008.
2. Çolak E., Bazı Pleurokarpik Makrofunguslarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Niğde 2010.
3. Yiğit D, Aktaş N, Özgen E..Ceviz (*Juglans regia* L.)'in Antimikrobiyal Aktivitesi, Türk Mikrobiyal Cemiyeti Dergisi 2009; 1-2: 7-11.
4. Öztürk A. ve Çopur ÖU., Mantar Bileşenlerinin Terapötik Etkileri, Bahçe Dergisi, 2009; 38 (1): 19-24.
5. Smith JE., Rowan NJ., Sullivan R., Medicinal Mushrooms: Their Therapeutic Properties and Current Usage with Special Emphasis on Cancer Treatments. Cancer Research, UK, 2002.
6. Manzi P., Gambelli L., Marconi S., Vivanti V., Pizzoferrato L., Nutrients in Edible Mushroom: an Inter-Species Comparative Study. Food Chem, 1999; 65: 477-482.
7. Kalyoncu F., Oskay M., Kalmış E., Bazı Yabani Makrofungus Misellerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi, 2010; 1 (1): 1-8.
8. Chang ST., Buswell JA., Mushroom Nutraceuticals. World Journal of Microbial Biotechnology, 1996; 12: 473-476.
9. Breene W., Nutritional and Medicinal Value of Speciality Mushrooms. Journal of Food Production, 1990; 53: 883-894.
10. Mattila P., Suonpaa K., Piironen V., Functional Properties of Edible Mushrooms Nutrition, 2000; 16: 7-8.
11. Türkoğlu A., Kıvrak İ., Mercan N., Duru ME., Gezer K., Türkoğlu H., Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Morchella conica* Pers. African Journal of Biotechnology, 2006; 5 (11): 1146-1150.
12. Wasser SP., Weis AL., Medicinal Properties Of Substances Occurring In Higher Basidiomycetes Mushrooms: Current Perspective (Review). International Journal of Medicinal Mushrooms, 1999; 1: 31-62.
13. Manzi P., Aguzzi A., Pizzoferrato L., Nutritional Value of Mushrooms Widely Consumed In Italy. Food Chemistry, 2001; 73: 321-325.
14. Kalyoncu F., Oskay M., Kalmış E., Bazı yabani makrofungus misellerinin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi, The Journal of Fungus, 2010; 1 (1), 1-8.
15. Lindequist U., Niedermeyer THJ., Julich WD., The pharmacological potential of mushrooms eCAM, 2005; 2, 285–299,.
16. Mau JL., Lin HC., Chen CC., Non-volatile components of several medicinal mushrooms, Food Research International, 2001;34, 521–526.

17. Demir MS., Çesitli makrofunguslara ait fruktifikasyon, vejetatif misel ve eksopolisakkaritlerin antimikrobiyal aktiviteleri üzerine çalışmalar, (Yüksek Lisans Tezi), Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2007.
18. Diyabalanage T., Mulabagal V., Mills G., DeWitt DL., Nair MG., Health-Beneficial Qualities of the Edible Mushroom, *Agrocybe aegerita*, Food Chemistry, 2008; 108, 97–102.
19. Szefer P., Mineral Components in Foods, In: Szefer P, Nriagu JO (eds) Chemometric techniques in analytical evaluation of food quality, CRC Press, Taylor & Francis, London, 2007.
20. Changb ST., Ganoderma-The leader in production and technology of mushroom nutraceuticals. In Proc 6th Int Symp Recent Adv Ganoderma lucidum Res (ed. B. K. Kim, I. H. Kim and Y. S. Kim). The Pharmaceutical Society of Korea, Seoul, Korea.,1995; 43-52.
21. Wasser SP.,Weis AL.,General description of the most important medicinal higher basidiomycetes mushrooms. 1. Int J Med Mush, 1999; 1, 351-370.
22. Park LS., Oh JW, Yan C., Natural inhibitors for protein prenyltransferase. Planta Med.1998; 64 (4): 303- 308.
23. Park, EJ, Ko G, Kim J., Sohn DH., Antifibrotic effects of a polysaccharide extract ed from Ganoderma lucidum, glycyrrhizin, and pentoxifilline in rats with cirrhosis induced by biliary obstruction. Biol. Pharm. Bull. 1997; 20(4): 417- 420.
24. Van Der Hem LG., Vander Vliet JA, Bocken CF., Kino K., Hoitsma AJ., Tax WJ., Ling Zhi- 8: studies of a new immunomodulating agent. Transplantation 1995;60 (5): 438-443.
25. Lin, J M., Lin CC., Chen MF., Ujiie T.,Takada A., Radical scavenger and antihepatotoxic activity of Ganoderma formosanum, Ganoderma lucidum and Ganoderma neo-japonicum . J. Ethnopharmacol. 1995; 47 (1): 33- 41.
26. The Fungal Pharmacy, The Complete Guide to Medicinal Mushrooms&Lichens of North America, Robert Rogers, RH (AHG),s 338.
27. Solak M.H., Isiloglu M., Kalmıs E., Allı H., Macrofungi of Turkey, Checklist, Üniversiteler Basımevi, İzmir, 2007.
28. Gao JM., Curr. Org. Chem., 2006; 10: 849.
29. An-Ling Zhang, Yan-Li Li, Ya-Tuan Ma, Jin-Ming Gao, Ai-Qun Jia, Phenolic meroterpenoids and steroids from the basidiomycete Tricholoma imbricatum. Biochem. Syst. and Eco., 2009; 37(6): 756–758
30. Tsukamoto, S., Macabalang, A.D., Nakatani, K., Obara, Y., Nakahata, N., Ohta, T., J. Nat. Prod, 2003; 66: 1578.
31. Apaydın M. Tricholoma fracticum (Britzelm.) Kreisel Mantarının aktivitesi ve kimyasal bileşimlerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla, 2011.

32. Ribeiro, B., Rangel, J., Valento, P., Baptista, P., Seabra, R. M. and Andrade, P. B., Contents of Carboxylic Acids and Two Phenolics and Antioxidant Activity of Dried Portuguese Wild Edible Mushrooms. *J. Agr. Food Chem.*, 2006; 54 (22): 8530-8537
33. Cho, I.H., Namgung, H. J., Choi, H. K., Kim, Y. S., Volatiles and key odorants in the pileus and stipe of pine-mushroom. *Food Chem.*, 2008; 106: 71–76.
34. Kim M.Y., Seguin P., Ahn J.K., Kim J.J., Chun S.C., Kim E.H., Seo S.H., Kang E.Y., Kim S.L., Park Y.J., Ro H.M., Chung I.M., Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea, *J Agr Food Chem.*, 2008; 56, 7265–7270
35. Rauha JP., Remes S., Heinonen M., Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds, *Int. J. Food Microbiol.*, 2000; 56, 3-12,
36. Göktürk BN., Baydar H., Debener T., Analysis of Genetic Relationships among *Rosa damascena* Plants Grown in Turkey by Using AFLP and Microsatellite Markers, *Journal of Biotechnology*, 2004, 111, 263-267
37. Dulger B., Yılmaz F., Gucin F., Antimicrobial activity of some *Lactarius* species , *Pharmaceutical Biology*, 2002; 40, 304–306
38. Duman R., Doğan H.H., Ateş A., *Morchella conica* (Pers.) Boudier ve *Suillus luteus* (L.) S.F. Gray makrofunguslarının antimikrobiyal aktiviteleri, *S.U. Fen Ed. Fak. Dergisi*, 2003; 22, 19–24.
39. Solak M.H., Kalmis E., Sağlam H., Kalyoncu F., Antimicrobial Activity of Two Wild Mushrooms *Clitocybe alexandri* (Gill.) Konr. And *Rhizopogon roseolus* (Corda) T.M. Fries Collected from Turkey. *Phytotherapy Research*, 2006; 20, 1085–1087.
40. Hatvani N., Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2001; 17, 71–74.
41. Sarangi I., Ghosh D., Bhutia S.K., Mallick S.K., Maiti T.K., Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* myceliaderived proteoglycans , *International Immunopharmacology*, 2006; 6, 1287–1297
42. Dulger B., Arslan U., *Coriolus versicolor* (L. ex. Fr.) Quel makrofungusunun antimikrobiyal aktivitesi, , *Turkish Journal of Biology*, 1999; 23, 385–392,
43. Wang H., Ng T.B., Eryngin, a novel antifungal peptide from fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii* , *Peptides*, 2004; 25, 1-5
44. Mau J.L., Tsai S.Y., Tseng Y.H., Huang S.J., Antioxidant properties of methanolic extracts of *Ganoderma tsugae*, *Food Chemistry*, 2005; 93, 641-649
45. Boh B., Berovic M., Zhang J., Zhi-Bin L., *Ganoderma lucidium* and its Pharmaceutically Active Compounds, *Biotechnology Annual Review*, 2007; 13, 265–301,.
46. White R.W., Hackman R.M., Soares S.E., Beckett L. A., Sun B., Effects of a Mushroom Mycelium Extract on the Treatment of Prostate Cancer. *Urology*, 2002; 60, 640–644
47. Ng, T.B., Peptides and proteins from fungi. *Peptides* 2004; 25, 1055–1073.

48. Wang, H., Ng, T.B., Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Peptides* 2006; 27, 27–30.
49. Hobbs C., *Medicinal Mushrooms*, Botanica Press, Summertown, Tennessee, 1998; 251
50. Gordon, MH. Dietary Antioxidants In Disease Prevention. *Nat. Prod. Rep.*, 1996; 3: 265-273.
51. Roberfroid M, Colderon PB. Free Radicals and Oxidation Phenomenain in Biological System. In: Roberfroid M, Colderon PB (eds), *University of Catholique De Louvain Brussels*, New York, 1995; 11-32.
52. Türk Gıda Kodeksi Yonetmelği. Resmi Gazete, 1997; 23172.
53. Kotsonis FN, Burdock GA, Flamm WG. Food Toxicology. in "Casarett & Doull's Toxicology 6th Edition" Ed. C. D. Klaassen. . Mcgraw-Hill. New York, 2001; 1049-1087.
54. Kahl R, Synthetic Antioxidants. Biochemical Actions and Interferece with Radiation, Toxic Compound, Chemical Mutagenes and Chemical Carcinogenes. *Toxicology*, 1984; 33: 185-228.
55. Dey A, De N.J Antioxidativepotential Of Bryophytes: Stresstoleranceand Commercial Perspectives: A Review *Pharmacologia* 2012; 3 (6), 151-159
56. Gökpinar Ş., Koray T., Akçiçek E., Göksan T., Durmaz Y. Algol Antioksidanlar, *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 2006; 23, 85-89
57. Martin K.R., Barret J.C. Reaktif Oksijen Species As Double-Edged Swords In Cellular Processes:Low-Dose Cell Signaling Versus High-Dose Toxicity, *Hum.Exp.Toxicol.*2002; 21, 71-75
58. Kamer D. Bryofitler’ In Ekolojisi, Lisans Bitirme Tezi Ankara Üniversitesi Çankırı Orman Fakültesi, Çankırı 2006.
59. Aslan R., Dündar Y. Bir Fizyolojik Eleman Ve Radikal Olarak Azot Oksit. *Hayvancılık Araştırma Dergisi* 1998; 8: 34–38.
60. Robison Tw, Murphy Jk, Beyer Ll, Richters A, Forman Hj. Depression Of Stimulated Arachidonate Metabolism And Superoxide Production In Rat Alveolar Macrophages Following In Vivo Exposure To 0.5 Ppm No2. *J. Toxicol. Environ. Health* 1993; 38: 273–92.
61. Gutteridge Jmc. Lipid Peroxidation And Antioxidants As Biomarkers Of Tissue Damage. *Clin. Chem* 1995; 41/12:1819–1828
62. Lohinai Zm, Szabo C. Role Of Nitric Oxide In Physiology And Patophysiology Of Periodontal Tissues. *Med. Sci. Monit* 1998; 4: 1089–1095.
63. Song, O. Oxidative Stress: A Theoretical Model Or Biological Reality?. *C.R. Biologies*. 2004; 327: 649-662.
64. Meydani, M. Antioxidants And Cognitive Function. *Ilsı. Nutrition Reviews*,2011; 59(8); S75-S82.
65. Chen, H. And Tappel, A.L. Protection Of Multiple Antioxidants Against Heme Protein Oxidation And Lipid Peroxidation Induced By Cbrcl3 In Liver, Lung, Kidney, Heart, And Spleen. *J. Agric. Food Chem.*1996; 44(3), 854-858.

66. Akkuş İ. Serbest Radikaller Ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, Konya, 1995.
67. Freeman, Ba., Crapo, Jd. Free Radicals And Tissue Injury. Lab Invest, 1982; 47,412-425.
68. Huysal, K. Tip Iı Diabetlilerde Eritrosit Glutasyon Redüktaz, Glutasyon Peroksidaz, Süperoksit Dismutaz, Katalaz Aktiviteleri, Hemoglobin Glikozilasyonu Ve Lipid Peroksidasyonunun İncelenmesi. Atatürk Üni. Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Erzurum 1999; 81
69. Weiss Js, Lobuglio Af. Phagocyte-Generated Oxygen Metabolites And Sellüler Injury. Lab. Invest. 1982; 47, 5–16.
70. Panes J, Grander Dn. Neutrophils Generate Oxygen Free Radicals İn Rat Mesenteric Microcirculation After Abdominal İrradiation. Gastroenterology 1996; 111, 981–989.
71. Smith Sm, Holm-Rutili L, Michael Ap Et Al. Role Of Neutrophils İn Hemorrhagic Shock-İnduced Gastric Mucosal Injury İn The Rat. Gastroenterology 1987; 93, 466–471.
72. Karakus Ayas B. Deneysel Olarak Ülser Olusturulan Ratlarda Lobar_A Pulmonar_A (L.) Hoffm. _S_ML_ L_Kenden Elde Ed_Len Metanol Ekstreler_N_N Ant_Oks_Dant Enz_M Akt_V_Teler_ Üzer_Ne Etk_S_ Yüksek Lisans Tezi Erzurum, 2007.
73. Çavdar C., Sifil A., Çamsarı T. Reaktif Oksijen Partikülleri Ve Antioksidan Savunma. Türk Nefroloji Diyaliz Ve Transplantasyon Dergisi,1997; 3-4: 92-95.
74. Nordberg, J. And Arnér, E.S.J. Reactive Oxygen Species, Antioxidants, And The Mammalian Thioredoxin System. Free Radical Biol. Med. 2001; 31: 1287–1312.
75. Cheeseman, Kh., Slater, Tf. An İntroduction To Free Radical Biochemistry. Br Med Bull. Jul 1993; 49(3), 481-93.
76. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Role Of Free Radicals And Catalytic Metal İons İn Human Disease. Methods Enzymol.1990; 186, 1-85.
77. Kavas, G.Ö. Serbest Radikaller Ve Organizma Üzerine Etkileri. Türkiye Klinikleri, 1989; 9: 1-8.
78. Yanbeyi, S. Aspirin Ve Antioksidant Buthylated Hydroxyanisole'ün Tavşanlarda Eritrosit Total Katalaz, Süperoksit Dismutaz Ve Glutasyon Peroksidaz Aktiviteleri Üzerine Etkileri. Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Samsun 1999; 88.
79. Dikici, İ. Akut Viral Hepatitlerle İnterferon Tedavisi Görmüş Kronik Viral Hepatitlerde Oksidatif Stresin Araştırılması. Selçuk Üni. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Konya 1999; 73
80. Ames, B.N., Shigenaga, M.K. And Hagen, T.M. Oxidants, Antioxidants, And The Degenerative Diseases Of Aging. Proc. Natl. Acad. Sci., Sep 1, 1993; 90(17), 7915-7922.
81. Akıllıoğlu, HG, Yalcın E. Tahıl protein hidrolizatlarının antioksidan aktiviteleri. Gıda 2010; 35 (3), 227-233
82. Dapkevicius, A., Venskotonis, R., van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania, J. Sci. Food Agric., 1998; 77, 140-146.

83. Burits, M., Asros, K., Bucar, F., The antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia afra*, *Artemisia abyssinica* and *Juniperus procera*, *Phytother. Res.*, 2001; 15, 103-108,
84. Koleva, I.I., van Beek T.A., Linssen, J.P.H., de Groot, A., Estatieva, L.N., Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods, *Phytochem. Anal.*, 2002; 13, 8-17,
85. ZHANG M., Haga A., Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyx mori*) pupa exuvia, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2000; 27, 99-105,
86. Illum L., Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient, *Pharm. Res.*, 1998; 15, 1326–1331,
87. Demir A., Seventekin N., Kitin ve Kitosanın Genel Kullanım Alanları, *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2009; 2, 94
88. KİM S.K., Mendis E., Bioactive compounds from marine processing byproducts: a review. *Food Research International*, 2006; 39, 383-393,
89. RÎNAUDO M., Chitin and chitosan: Properties and applications, *Progress in Polymer Science*, 2006; 31, 603-632,
90. Muzzarelli RAA., Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives, *Cell. Mol. Life Sci.*, 1997; 53, 131–140
91. Synowiecki J., Al-khatteb Nadia A. A., Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, March, 2003; 43, 2, 145-171
92. Shahidi F., Abuzaytoun R., Chitin, chitosan, and coproducts: chemistry, production, applications, and health effects, *Adv Food Nutr Res.*, 2005; 49, 93-135,
93. Janes K.A., Calvo P., Alonso M.J., Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001; 47, 83–97
94. Queen HA., Electrospinning Chitosan-based Nanofibers for Biomedical Applications, (M.Sc. Thesis), Graduate Faculty of North Carolina State University, Textile Engineering, (2006).
95. Sahin U.K., Gürsoy N.C., Tekstil endüstrisinde kitin ve kitosan uygulamaları, *Tekstil Teknik*, 2005; 176-245
96. Miyoshi H., Shimura K., Watanabe K., Kasuki O., Characterization of some fungal chitosans, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1992; 56, 1901-1905,
97. Barros L., Calhelha R.C., Vaz J.A., Ferreira I.C.F.R., Babtista P., Estevinho L.M., Antimicrobial activity and bioactiv extracts. *Euro. Food Res. Technol.*, 2007; 225, 151-156
98. Lena D.G., Annibate A.D., Giovannozzi-Sermanni G., Influence of the age growth conditions on the mycelial chitin content of *Lentinus edodes*, *J. Basic Microbiol.*, 1994; 34, 11-16
99. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, 1956; 28, 350–356

100. Yamaç M., Bilgili F., Antimicrobial activities of fruit bodies and/or mycelial cultures of some mushroom isolates. *Pharmaceutical Biology*, 2006; 44 (9): 660–667
101. Gerasimenya V.P., Efremenkova O.V., Kamzolkina O.V., Bogush T.A., Tolstych I.V., Zenkova V.A., Antimicrobial and antitoxic action of edible and medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. Extracts, *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2002; 4, 127-132
102. Efremenkova O.V., Ershova E.Y., Tolstych I.V., Zenkova V.A., Dudnik Y.V., Antimicrobial activity of medicinal mushrooms from the Genus *Coprinus* (Fr.) S. F. Gray (Agaricomycetidae), *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2003; 5, 37- 41
103. Kalyoncu F., Oskay M., Kalmış E., Bazı Yabani Makrofungus Misellerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi, *Mantar Dergisi/The Journal of Fungus*, Nisan 2010; 1(1)1-8
104. Dülger, B., Yılmaz, F., Gücin, F. *Tricholoma terreum* (Fr.) Kummer“Cincile” makrofungusunun antimikrobiyal aktivitesi. *Çev- Kor*, 1999; 30 (8), 13-17.
105. Gao Y.H., Tang W.B., Gao H., Chan E., Lan J., Li X.T., Zhou S.F., Antimicrobial activity of the medicinal mushroom *Ganoderma*. *Food Reviews Inter*, 2005; 21 (2): 211-229.
106. Liu D., Hu Z., Liu Z., Yang B., Tu W., Li L., Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil isolated from the cultured mycelia of *Ganoderma japonicum*, *Journal of Nanjing Medical University*, 2009; 23(3):168-172
107. Mothana R.A.A., Jansen R., Julich W.D., Lindequist U., Ganomycin A and B, new antimicrobial farnesyl hydroquinones from the basidiomycete *Ganoderma pfeifferi*, *J. Nat.Prod*, 2000; 63:416–418
108. Salin ML and Mccord JM. *Journal of Clinical Investigation*, 1975; 56: 1319-1323.
109. Davies KH. Protein Modification By Oxidants. *Biochem. Soc.Trans.*, 1993; 21: 346-352.
110. Brody AR, Hill LH, Adkins B. Jr, O'Connor RW. *American Review of Respiratory Disease*, 1981; 123: 670-679.
111. Çanakçı CF, Çiçek Y, Çanakçı V. Reactive Oxygen Species and Human Inflammatory Periodontal Diseases. *Biocem (Moscow)*, 2005; 70: 619-628.
112. Aruoma OI and Cuppett SL. *Antioxidant Methodology in Vivo and in Vitro Concept*. AOCS Press, Champaign, Illinois, 1997.
113. Halliwell B. Drug Antioxidant Effects. *Drugs* 1991; 42 (4): 569 - 605.
114. Bertram GK. *Basic and Clinical Pharmacology*. Eighth Edition. A Lange Medical Book, 2001; 18: 311-25.
115. Del Meastro RF. An Approach to Free Radicals in Medicine and Biology. *Acta Physiol Scand*, 1980; 492: 153 – 68.
116. The Use of Mushroom Preparations in Malignancies. Thomas Jefferson University Hospital (2006).

117. Apaydın M. Determination of Antioxidant Activity and Chemical Compositions of *Tricholoma Fracticum* (Britzelm.) Kreisel Mushroom, Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Muğla, 2011.
118. Çayan F. HPLC-DAD Analysis of Chemical Composition of Mushroom *Chroogomphus Rutilus* (Schaeff.) o.k. Mill and Investigation of Its Biological Activity. Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Muğla, 2011.
119. Üstün O. Nutritional Value and Biological Effects of Macrofungi. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2011; 68 (4): 223-40.
120. Nitar Nwe, Tetsuya Furuike and Hiroshi Tamura, Production of Fungal Chitosan by Enzymatic Method and Applications in Plant Tissue Culture and Tissue Engineering: 11 Years of Our Progress, Present Situation and Future Prospects, Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai university Suita, Osaka 564-8680 Japan